



# Universidad del Mar

## Campus Puerto Ángel

**Evaluación de la diversidad de invertebrados bénticos en sedimentos de los sistemas lagunares costeros Chacahua-Pastoría y Corralero-Alotengo, Oaxaca, a partir del código de barras genético en muestras ambientales**

### **TESIS**

Que para obtener el Grado de

**Doctora en Ecología Marina**

Presenta

Margoth Liliana Castro Cubillos

Directora

Dra. Valentina Islas Villanueva

Co-Directora

Dra. Alicia Mastretta Yanes

Puerto Ángel, Oaxaca, 2024

## Resumen

Las lagunas costeras tropicales son ecosistemas importantes que sustentan altos niveles de biodiversidad y proporcionan distintos bienes y servicios. El monitoreo de la biodiversidad bentónica y la detección de especies dañinas o invasoras es crucial, particularmente en relación con la variación estacional y espacial de las condiciones ambientales. En este estudio, se utilizó el metabarcoteo de ADN ambiental (ADNe) en dos lagunas costeras tropicales, Chacahua-Pastoría (CH) y Corralero-Alotengo (C) (Pacífico Sur de México), para describir la biodiversidad bentónica (eucariota y procariota) y su dinámica espacio-temporal. La distribución de la diversidad bentónica dentro de las lagunas mostró un patrón muy particular que evidencia una transición del agua dulce al agua de mar. Aunque los dos sistemas de lagunas son similares en términos de la composición de especies de metazoos, microeucariotas, hongos, bacterias y arqueas, los hallazgos de esta tesis indican que son diferentes en riqueza y estructura de taxones, lo que resulta en una partición regional de la diversidad con la salinidad como el factor determinante de la composición de la comunidad en CH. Se detectaron especies nocivas, invasoras, no autóctonas, bioindicadores y de importancia comercial, lo que demuestra el alcance de esta técnica para el monitoreo de la biodiversidad junto con los esfuerzos continuos de construcción de bibliotecas de referencia de especies.

La composición de la comunidad de procariotas de los sistemas lagunares permitió evidenciar diferencias entre CH y C, y entre los mismos en las temporadas de secas y lluvias, mostrando una fuerte correlación con la salinidad en ambos sistemas, más estrictamente en CH. Tanto en CH como en C, se encontró que la diversidad de arqueas es mayor en la zona marina, siendo Euryarchaeota el filo dominante, en el caso de las bacterias fueron Proteobacteria, Chloroflexi y Bacteroidetes en ambos sistemas. La composición taxonómica de hongos estuvo dominada por Ascomycota en más del 50 % en los dos sistemas lagunares durante las dos temporadas de estudio, no se observaron diferencias entre temporadas, regiones y las mismas regiones para C, pero sí para CH entre temporadas y regiones. Lo cual obedece a que en CH hay una mayor regionalización en la concentración salina de la columna de agua. Los factores ambientales que mayor correlación tuvieron con la distribución de la comunidad de hongos fue la salinidad, el OD y la temperatura.

La comunidad de procariotas mostró una fuerte correlación con el endosulfán  $\alpha$ , el HCH  $\alpha$ , el DDT y el endrín, en temporada de secas y en general para la laguna Pastoría, permitiendo diferenciar así los grupos de muestras para las dos temporadas y para las dos lagunas dentro del sistema. Por su parte, la comunidad de hongos tuvo una fuerte correlación con el DDD, HCH  $\beta$ , endosulfán  $\alpha$  y el HCH Lindano. Aunque no se ha demostrado el efecto nocivo de alguno de estos

compuestos sobre la comunidad de hongos y bacterias en estos sistemas, sí se ha confirmado que los pesticidas contienen algunos compuestos que generalmente persisten en el medio acuático y con el tiempo, las descargas continuas pueden formar mayores depósitos de residuos en los sedimentos que podrían modular la composición de estas comunidades a mediano y largo plazo.

Basándose en la cantidad de taxones detectados para moluscos, anélidos y artrópodos, los marcadores moleculares mostraron ser más efectivos que los caracteres morfológicos. Esto puede deberse a que en algunos grupos los estadios de desarrollo inicial, como larvas y juveniles, resultan difíciles de identificar por su morfología, mientras que con su ADN se suele ser menos complicado y a la presencia de organismos incompletos para los cuales no se cuenta con los apéndices o caracteres morfológicos completos que permitan su identificación. Se recomienda hacer uso de marcadores moleculares de diferente tipo, por ejemplo, mitocondriales y nucleares, como los acá usados para lograr detectar una mayor cantidad de grupos taxonómicos y así hacer más eficiente el monitoreo biológico basado en ADN. Así mismo, el metabarcoding de ADN debe ir de la mano con la taxonomía tradicional para mejorar el desarrollo de bibliotecas de referencia de códigos de barras más precisas, que permitan el desarrollo de un inventario de especies y su monitoreo de forma eficiente, especialmente en áreas de gran diversidad con potencial para encontrar nuevas especies.

La presente tesis doctoral, comprende el estudio de la diversidad de organismos eucariotas y procariotas presentes en el sedimento de los sistemas lagunares Chacahua-Pastoría y Corralero-Alotengo. Pretende evaluar la correlación de estas comunidades con los factores ambientales imperantes en los mismos, la efectividad del metabarcoding de ADN frente a la taxonomía tradicional basada en morfología para evaluar la diversidad de metazoos en estos sistemas y el efecto de ciertos pesticidas sobre la comunidad de hongos y bacterias en Chacahua-Pastoría.

Esta tesis está dividida en cuatro capítulos, los cuales son manuscritos originales de investigación.

En el capítulo 1, se evalúa la eficacia de las técnicas de identificación taxonómica tradicional y metabarcoding en la evaluación de la riqueza y abundancia de filos de metazoos en muestras de sedimentos lagunares costeros de los sistemas lagunares Corralero-Alotengo y Chacahua-Pastoría.

El capítulo 2, describe y compara la diversidad de metazoos y microeucariotas en el sedimento y su relación con los parámetros fisicoquímicos, en dos periodos del año diferentes, en los sistemas lagunares costeros Chacahua-Pastoría y Corralero-Alotengo, mediante el uso de secuenciación masiva del código de barras genético en muestras ambientales.

El capítulo 3, describe y compara la diversidad de procariotas (bacterias y arqueas) y hongos en el sedimento de los sistemas lagunares costeros Chacahua-Pastoría y Corralero-Alotengo y su relación con los parámetros ambientales (físicoquímicos), en dos épocas del año a través del uso de código de barras genético en muestras ambientales. También, aquí se correlaciona la diversidad de procariotas y hongos con algunos pesticidas en el sistema laguna Chacahua-Pastoría.

El capítulo 4, contiene el artículo científico derivado del capítulo 2 y publicado en la revista *Scientific Reports*.

También, se adjuntan las conclusiones generales de la tesis y las recomendaciones surgidas durante el desarrollo de esta.

### ***Summary***

Tropical coastal lagoons are important ecosystems that support high levels of biodiversity and provide various goods and services. Monitoring benthic biodiversity and detecting harmful or invasive species is crucial, particularly in relation to seasonal and spatial variation in environmental conditions. In this study, environmental DNA metabarcoding (eDNA) was used in two tropical coastal lagoons, Chacahua-Pastoria (CH) and Corralero-Alotengo (C) (South Pacific of Mexico), to describe benthic biodiversity (eukaryotic and prokaryotic), and its space-time dynamics. The distribution of benthic diversity within the lagoons showed a very particular pattern that evidences a transition from freshwater to seawater. Although the two lagoon systems are similar in terms of species composition of metazoans, microeukaryotes, fungi, bacteria and archaea, our findings indicate that they are different in taxon richness and structure, resulting in a regional partitioning of diversity with salinity as the determining factor of community composition in CH. Harmful, invasive, non-native, bioindicator, and commercially important species were detected, demonstrating the scope of this technique for biodiversity monitoring along with ongoing species reference library construction efforts.

The composition of the prokaryotic community of the lagoon systems allowed us to show differences between CH and C, and between them from dry to rainy conditions, showing a strong correlation with salinity in both lagoon systems, more strictly in CH. In both CH and C, it was found that the diversity of archaea is greater in the marine zone. The dominant bacterial phyla were Proteobacteria, Chloroflexi and Bacteroidetes in both systems; in the case of archaea, it was Euryarchaeota. The taxonomic composition of fungi was dominated by Ascomycota in more than 50% in the two lagoon systems during the two study seasons, no differences were observed between seasons, regions and the same regions for C, but differences were observed for CH between seasons and regions. This is

due to the fact that in CH there is a greater regionalization in the saline concentration of the water column. The environmental factors that had the greatest correlation with the distribution of the fungal community were salinity, DO and temperature.

The prokaryotic community showed a strong correlation with endosulfan  $\alpha$ , HCH  $\alpha$ , DDT and endrin, in the dry season and in general for the Pastoría lagoon, thus allowing the groups of samples to be differentiated for the two seasons and for the two gaps within the system. For its part, the fungal community had a strong correlation with DDD, HCH  $\beta$ , endosulfan  $\alpha$  and HCH Lindane. Although the harmful effect of any of these compounds on the community of fungi and bacteria in these systems has not been demonstrated, it has been confirmed that pesticides contain some compounds that generally persist in the aquatic environment and over time, continuous discharges can form larger deposits of waste in the sediments that could modulate the composition of these communities in the medium and long term.

Based on the number of taxa detected for mollusks, annelids and arthropods, molecular markers were shown to be more effective than morphology; This may be because in some groups the initial development stages, such as larvae and juveniles, are difficult to identify due to their morphology, while with their eDNA it is usually less complicated; also, to the presence of incomplete organisms for which there are no complete appendages or morphological characters that allow their identification. It is recommended to use different types of molecular markers, for example, mitochondrial and nuclear, such as those used here to detect a greater number of taxonomic groups and thus make biological monitoring based on eDNA more efficient. Likewise, eDNA metabarcoding should go hand in hand with traditional taxonomy to improve the development of more accurate barcode reference libraries, allowing for more efficient biomonitoring and species inventory, especially in high diversity areas with potential to find new species.

This doctoral thesis includes the study of the diversity of organisms present in the sediment of the Chacahua-Pastoría and Corralero-Alotengo lagoon systems, including eukaryotes and prokaryotes. It aims to evaluate the correlation of these communities with the prevailing environmental factors in them, the effectiveness of the eDNA metabarcoding compared to the traditional taxonomy based on morphology to evaluate the diversity of metazoans in these systems and the effect of certain pesticides on the fungal and bacteria community.

This thesis is divided into four chapters, which are original research manuscripts.

In chapter 1, the effectiveness of traditional taxonomic identification and metabarcoding techniques is evaluated in the evaluation of the richness and abundance of metazoan phyla in samples of coastal lagoon sediments from the Corralero-Alotengo and Chacahua-Pastoría lagoon systems.

Chapter 2 describes and compares the diversity of metazoans and microeukaryotes in the sediment and its relationship with the physicochemical parameters, in two different periods of the year, in the Chacahua-Pastoría and Corralero-Alotengo coastal lagoon systems, through the use of massive sequencing. of the genetic barcode in environmental samples.

Chapter 3 describes and compares the diversity of prokaryotes (bacteria and archaea) and fungi in the sediment of the coastal lagoon systems Chacahua-Pastoría and Corralero-Alotengo and its relationship with environmental parameters (physicochemical), in two times of the year a through the use of genetic barcoding in environmental samples. Also, here the diversity of prokaryotes and fungi is correlated with some pesticides in the Chacahua-Pastoría lagoon system.

Chapter 4 contains the scientific article derived from chapter 2 and published in the journal *Scientific Reports*.

Also attached are the general conclusions of the thesis and the recommendations that emerged during its development.

## **Dedicatoria**

Esta tesis está dedicada a las personas que han impulsado y acompañado mi espíritu desde niña, a mi madre, a mi abuela y a mi tío. Mi madre quien, a pesar de la adversidad, nunca perdió la fe en mi ni en mis proyectos, la resiliencia la heredé de ti y qué gran herencia. Soy lo que soy por ti, te amo, madre. Mi abuelita que siempre nos ha apoyado y puesto en sus oraciones, gracias. Mi tío que es gran ejemplo de padre, no solo con mis primas, conmigo también; a quién admiro como profesionalista y es ejemplo de perseverancia. A mi hermana Juliana Andrea, por alegrar mis días y los de la familia. Te amo, hermana.

A Winston y a Winona, por enseñarme que el amor no es solo de humanos. Gracias por sostenerme en los días de lluvia y oscuridad.

## **Agradecimientos**

A mi directora de tesis la Dra. Valentina Islas Villanueva, por aceptarme como su alumna y por impulsar desde un inicio este proyecto. Por confiar en mi razonamiento a la hora de tomar decisiones cruciales y por comprender mis procesos. Gracias por la sororidad y por los consejos que como profesionista, científica y mujer me compartió. Le agradezco por permitirme cruzar fronteras y reconocer mi capacidad para trabajar en distintos equipos, aún fuera de México. Admiro su capacidad de adaptación y su trabajo arduo, la admiro como mujer y científica.

A mi codirectora de tesis, la Dra. Alicia Mastretta Yanes, por aceptar la invitación a formar parte del comité tutor y evaluador de este trabajo. Por sus comentarios, siempre tan apropiados y enriquecedores.

Al Dr. Francisco Benítez Villalobos, por su apoyo desde mi ingreso al doctorado y por compartirme sus conocimientos en ecología y estadística. Gracias por escucharme y guiarme en momentos decisivos del proyecto. También, gracias infinitas por aceptarme como parte de su grupo de alumnos y por abrirme las puertas de su casa.

A mis revisores, la Dra. María Luisa Leal, la Dra. Norma Barrientos, el Dr. Edlin Guerra Castro, el Dr. Luis David Maldonado y el Dr. Julio Acosta Calderón.

A mi tutor de estancia en la Universidad de Salford, Inglaterra, el Dr. Joe Taylor, por recibirme como alumna externa en su laboratorio durante mi estancia en el 2018, por transmitirme su conocimiento y por mostrarme un poco de la cultura inglesa. Gracias por la paciencia durante la escritura y revisión del primer artículo derivado de esta tesis.

A las comunidades de habitan alrededor de los sistemas lagunares Chacahua-Pastoría y Corralero-Alotengo, por acogerme durante las jornadas de muestreo y por permitirme desarrollar mi proyecto en sus comunidades. A Máximo Mayren, José Manuel Martino Domínguez y Vicente Pizá Romero.

A las autoridades del Parque Nacional Lagunas de Chacahua por permitir los muestreos dentro del sistema lagunar.

A Sergio Vásquez Mendoza, Eladio Espinosa, Andrés Pacheco por su asistencia durante el muestreo. Al Dr. Rolando Bastida-Zavala y Dra. Norma A. Luján-Barrientos por sus conocimientos sobre la taxonomía de anélidos y moluscos de Oaxaca. A la Dra. Auxilio Esparza, por la guía en la organización del documento de tesis y por los consejos académicos y de vida.

Al licenciado Óscar Carreño por su guía en la elaboración de los mapas del área de estudio de la tesis y del artículo.

A la Dra. Julia Patricia Díaz, por ser mi amiga y hermana. Gracias por el consejo y la escucha en nuestros días en el cubículo de doctorado. La admiro inmensamente como mujer, científica y amiga; reconozco su capacidad de resiliencia, que ha sido ejemplo para mí. Gracias infinitas por abrirme las puertas de su casa, la cual ha sido un refugio en momentos difíciles.

A mi compañero de generación, el maestro Abraham Villa Melchor, por ser mi amigo y hermano desde el día 1 en esta aventura. Por los consejos, los días de pláticas y fiesta (que fueron válvula de escape en días que parecían no tener fin). Gracias por la complicidad.

A mi compañero de doctorado, Kevín Daniel Escudero, por la amistad, las risas y los consejos. A mi amigo Abimael Salinas, por los momentos compartidos al inicio del doctorado y por mantener la amistad, aun cuando la distancia nos separó físicamente. A mis amigos que desde la distancia me han acompañado, Karen Ortega y Sadot Ramos, gracias infinitas. Los tres sabemos lo que significa el poder de nuestra amistad que es hermandad. A María Fernanda y Luis Fernel, gracias por su apoyo y consejo a la distancia. A Karla Escalante, por recibirme en su laboratorio y enseñarme gran parte de lo que soy en el laboratorio y en la academia. A la Dra. Liliana Robledo por la amistad y el consejo en este proceso doctoral. A Carlos Tamayo, por ser amigo y apoyo, por recordarme a la tierrita. A Nereida y a Paulina, por acompañarme y sostenerme en los momentos difíciles.

A los que estuvieron y siguieron su camino, gracias por el cariño y por las enseñanzas.

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnología, por apoyarme con la beca de manutención y de movilidad para realizar mis estudios de doctorado y la respectiva estancia internacional.

Esta colombiana agradece a México y a Oaxaca, por permitirme formarme como doctora. Gracias infinitas.

Gracias a la Universidad del Mar (UMAR), por permitirme cursar este programa de doctorado.

**Evaluación de la diversidad de invertebrados béticos en sedimentos de los sistemas lagunares  
costeros Chacahua-Pastoría y Corralero-Alotengo, Oaxaca, a partir del código de barras  
genético en muestras ambientales**

**Índice**

	<b>Página</b>
Resumen.....	2
<b>Dedicatoria</b> .....	<b>7</b>
<b>Agradecimientos</b> .....	<b>8</b>
<b>Índice</b> .....	<b>10</b>
<b>Índice de figuras</b> .....	<b>13</b>
<b>Índice de tablas</b> .....	<b>15</b>
<b>Capítulo Introductorio</b> .....	<b>16</b>
1.    Introducción general.....	16
1.1.    Estudio de la diversidad marina en el mundo .....	18
1.2.    Lagunas costeras.....	21
2.    Antecedentes .....	27
2.1.    Diversidad a partir de taxonomía tradicional .....	27
2.2.    Identificación de organismos a partir de código de barras en muestras ambientales: ¿Qué se ha identificado?.....	29
3.    Preguntas de investigación .....	33
4.    Justificación .....	33
5.    Zona de estudio .....	34
<b>Capítulo 1</b> .....	<b>38</b>
1.    Introducción .....	38
1.1.    Identificación taxonómica tradicional.....	39
1.2.    Código de barras genético en muestras ambientales: Metabarcoding. ....	39
1.2.1.    Marcadores genéticos: COI, 18S .....	41
2.    Antecedentes .....	43
3.    Hipótesis .....	43
4.    Objetivos .....	43
4.1    Objetivo general .....	43
4.2    Objetivos particulares .....	43
5.    Materiales y métodos.....	44

5.1	Procesamiento de muestras.....	44
	Ubicación de las estaciones y tipo de muestreo.....	44
5.2	Identificación taxonómica tradicional de las muestras usadas .....	44
5.4	Identificación a partir de metabarcoding: Comparación entre marcadores (COI vs 18S) ...	45
5.4.1.	Extracción de DNA y secuenciación .....	45
5.5.	Evaluación de los alcances y limitaciones de las dos técnicas (categoría taxonómica) .	46
6.	Resultados .....	47
6.1.	Identificación taxonómica tradicional (morfológica).....	47
6.2.	Identificación a partir de metabarcoding: Comparación entre marcadores (COI vs 18S)	47
6.3.	Comparación de alcances y limitaciones de las dos técnicas (categoría taxonómica familia).....	50
7.	Discusión de resultados .....	57
<b>Capítulo 2.</b>	.....	<b>60</b>
1.	Introducción .....	60
2.	Antecedentes .....	62
3.	Hipótesis .....	62
4.	Objetivos .....	63
4.1.	Objetivo general .....	63
4.2.	Objetivos particulares.....	63
5.	Materiales y métodos.....	63
5.1.	Área de estudio: Ubicación de las estaciones y tipo muestreo .....	63
5.2.	Extracción de ADN y secuenciación .....	65
5.3.	Bioinformática y análisis estadísticos .....	66
6.	Resultados .....	67
6.1.	Condiciones ambientales de los sistemas lagunares durante los muestreos .....	67
6.2.	Secuenciación.....	70
6.3.	Composición y riqueza taxonómica en los dos sistemas lagunares.....	70
6.4.	Composición y estructura de metazoos marino-costeros y la comunidad eucariota en ambos sistemas lagunares.....	75
6.5.	Variables ambientales y su efecto sobre la distribución biótica en ambos sistemas de lagunas .....	77
7.	Discusión de resultados .....	80
<b>Capítulo 3.</b>	.....	<b>85</b>

1. Introducción .....	85
2. Antecedentes .....	86
3. Hipótesis .....	87
4. Objetivos .....	87
4.1. Objetivo general .....	87
4.2. Objetivos particulares .....	87
5. Materiales y métodos .....	88
6. Resultados .....	90
6.1. Métricas de secuencias .....	90
6.2. Composición taxonómica y diversidad alfa en los dos sistemas lagunares costeros .....	91
6.3. Composición y estructura de las comunidades de procariotas y hongos en los dos sistemas lagunares costeros .....	96
6.4. Distribución de la comunidad de bacterias y hongos en Chacahua y Pastoría y su relación con la presencia de pesticidas en el sedimento de las lagunas.....	100
7. Discusión de resultados .....	104
<b>Capítulo 4.....</b>	<b>111</b>
<b>1. Monitoring of benthic eukaryotic communities in two tropical coastal lagoons through eDNA metabarcoding: a spatial and temporal approximation .....</b>	<b>111</b>
CONCLUSIONES GENERALES .....	145
RECOMENDACIONES .....	147
REFERENCIAS.....	148
ANEXOS.....	174

## Índice de figuras

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Ubicación de las estaciones de muestreo en el complejo lagunar.....	37
<b>Figura 2.</b> Análisis de muestras ambientales a partir de “metabarcoding”.....	41
<b>Figura 3.</b> Posición del gen COI en el genoma mitocondrial.. ..	42
<b>Figura 4.</b> Esquema del gen ribosomal 18SrRNA.....	42
<b>Figura 5.</b> Heat-map que representa la presencia-ausencia (P/A) de MOTUs y OTUs de familias de anélidos en el sistema lagunar Chacahua-Pastoría.....	51
<b>Figura 6.</b> Heat-map que representa la presencia-ausencia (P/A) de MOTUs y OTUs de familias de anélidos en el sistema lagunar Corralero-Alotengo. ....	52
<b>Figura 7.</b> Heat-map que representa la presencia (1) -ausencia (0) (P/A) de MOTUs y OTUs de familias de artrópodos en el sistema lagunar Chacahua-Pastoría.....	54
<b>Figura 8.</b> Heat-map que representa la presencia-ausencia (P/A) de MOTUs y OTUs de familias de artrópodos en el sistema lagunar Corralero-Alotengo. ....	55
<b>Figura 9.</b> Heat-map que representa la presencia-ausencia (P/A) de MOTUs y OTUs de familias de moluscos en el sistema lagunar Chacahua-Pastoría. ....	56
<b>Figura 10.</b> Heat-map que representa la presencia-ausencia (P/A) de MOTUs y OTUs de familias de moluscos en el sistema lagunar Corralero-Alotengo. ....	57
<b>Figura 11.</b> Zona de estudio y estaciones de muestreo en los dos sistemas lagunares estudiados. ....	64
<b>Figura 12.</b> Diagramas de caja y bigotes para las cinco variables ambientales analizadas. ....	68
<b>Figura 13.</b> Diagramas de caja y bigotes para las cinco variables ambientales analizadas. ....	69
<b>Figura 14.</b> Abundancia relativa de MOTUs de fillos de metazoos en las bibliotecas de secuencias de amplicones del gen COI generadas a partir de sedimentos recolectados de los sistemas lagunares Corralero-Alotengo y Chacahua-Pastoría a lo largo de estaciones, regiones y zonas lagunares.. ....	71
<b>Figura 15.</b> Abundancia relativa de MOTUs de fillos de micro-eucariotas en las bibliotecas de secuencias de amplicones del gen COI generadas a partir de sedimentos recolectados de los sistemas lagunares Corralero-Alotengo y Chacahua-Pastoría a lo largo de estaciones, zonas y regiones lagunares. ....	72
<b>Figura 16.</b> Correlación de Pearson para riqueza (S) de MOTUs de metazoos y las cinco variables ambientales medidas en A.) C: Corralero-Alotengo y B.) CH: Chacahua-Pastoría. ....	73
<b>Figura 17.</b> Correlación de Pearson para riqueza (S) de MOTUs de microeucariotas y las cinco variables ambientales medidas en A.) C: Corralero-Alotengo y B.) CH: Chacahua-Pastoría. ....	74

<b>Figura 18.</b> Diagramas de caja para comparaciones de diversidad alfa (S) de comunidades de metazoos y microeucariotas entre los dos sistemas lagunares estudiados.....	75
<b>Figura 19.</b> NMDS para comunidades de metazoos y microeucariotas identificadas en los sistemas lagunares Corralero-Alotengo y Chacahua-Pastoría en ambas temporadas.....	76
<b>Figura 20.</b> CCA para comunidades de metazoos identificadas en el sistemas lagunar Chacahua-Pastoría y sus características ambientales (profundidad, salinidad, temperatura, pH, OD) durante cada temporada. Chacahua-Pastoría.....	78
<b>Figura 21.</b> CCA para comunidades de metazoos identificadas en el sistema lagunar Corralero-Alotengo y sus características ambientales (profundidad, salinidad, temperatura, pH, OD) durante cada temporada. Corralero-Alotengo. ....	78
<b>Figura 22.</b> CCA para comunidades de microeucariotas identificadas en el sistemas lagunar Chacahua-Pastoría y sus características ambientales (profundidad, salinidad, temperatura, pH, OD) durante cada temporada.....	79
<b>Figura 23.</b> CCA para comunidades de microeucariotas identificadas en el sistema lagunar Corralero-Alotengo y sus características ambientales (profundidad, salinidad, temperatura, pH, OD) durante cada temporada.....	79
<b>Figura 24.</b> Abundancia absoluta de ASVs de filos de bacterias y arqueas obtenidos a partir de bibliotecas de amplicones del gen 16S generadas a partir de sedimentos recolectados del sistema lagunar Chacahua-Pastoría.....	92
<b>Figura 25.</b> Abundancia absoluta de ASVs de filos de bacterias y arqueas obtenidos a partir de bibliotecas de amplicones del gen 16S generadas a partir de sedimentos recolectados del sistema lagunar Corralero-Alotengo. ....	93
<b>Figura 26.</b> Diagramas de caja para comparaciones de diversidad alfa-riqueza (S) de comunidades de procariotas (bacterias y arqueas), en los sistemas lagunares .....	93
<b>Figura 27.</b> Abundancia relativa de ASVs de filos de hongos obtenidos a partir de bibliotecas de amplicones del gen 16S generadas a partir de sedimentos recolectados de los sistemas lagunares. .	95
<b>Figura 28.</b> Diagramas de caja para comparaciones de diversidad alfa-riqueza (S) de comunidades de hongos, en los sistemas lagunares Chacahua-Pastoría y Corralero-Alotengo. ....	96
<b>Figura 29.</b> NMDS para comunidades de bacterias y arqueas identificadas en los sistemas lagunares Corralero-Alotengo y Chacahua-Pastoría en ambas temporadas.....	97
<b>Figura 30.</b> CCAs para la comunidad de procariotas y sus características ambientales en los sistemas lagunares Corralero-Alotengo y Chacahua-Pastoría durante cada temporada. ....	98

<b>Figura 31.</b> NMDS para comunidades de hongos identificadas en los sistemas lagunares Corralero-Alotengo y Chacahua-Pastoría en ambas temporadas. ....	99
<b>Figura 32.</b> CCAs para la comunidad de hongos y sus características ambientales en los sistemas lagunares Corralero-Alotengo y Chacahua-Pastoría durante cada temporada. ....	100
<b>Figura 33.</b> CCAs para la comunidad de bacterias y arqueas y la concentración de pesticidas en el sistema lagunar Chacahua-Pastoría durante la temporada de secas y lluvias. ....	101
<b>Figura 34.</b> CCAs para la comunidad de bacterias y arqueas y la concentración de pesticidas en el sistema lagunar Chacahua-Pastoría durante la temporada de secas y lluvias. ....	102
<b>Figura 35.</b> CCAs para la comunidad de hongos y la concentración de pesticidas en el sistema lagunar Chacahua-Pastoría durante la temporada de secas y lluvias. ....	103
<b>Figura 36.</b> CCAs para la comunidad de hongos y la concentración de pesticidas en el sistema lagunar Chacahua-Pastoría durante la temporada de secas y lluvias. ....	104

### Índice de tablas

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Metabarcoding en sedimentos marinos y costeros. ....	31
<b>Tabla 2.</b> Parámetros fisicoquímicos en el sistema lagunar Chacahua-Pastoría para temporada de lluvias y secas. ....	36
<b>Tabla 3.</b> Cantidad de OTUs identificados por taxonomía tradicional por filo en cada sistema lagunar. ....	47
<b>Tabla 4.</b> Cantidad de secuencias y MOTUs asignados para los dos sistemas lagunares en las dos temporadas analizadas, con tres marcadores distintos (COI, 18S-V4 y 18S-V9). ....	48
<b>Tabla 5.</b> Cantidad de MOTUs identificados con taxonomía molecular con el gen COI por filo en cada sistema lagunar. ....	48
<b>Tabla 6.</b> Cantidad de MOTUs identificados con taxonomía molecular con el gen 18S-V4 por filo en cada sistema lagunar. ....	49
<b>Tabla 7.</b> Cantidad de MOTUs identificados con taxonomía molecular con el gen 18S-V9 por filo en cada sistema lagunar. ....	50
<b>Tabla 8.</b> Resumen de parámetros ambientales por Sistema lagunar, temporada y región. ....	70

## Capítulo Introductorio

### 1. Introducción general

El estudio de la diversidad mundial de especies, tanto terrestres como marinas, ha estado focalizado en determinados grupos taxonómicos lo que hace que el análisis de esta sea heterogéneo. Sin embargo, desde algún tiempo atrás se ha entendido que la comprensión de los ecosistemas requiere del estudio de todos los componentes que los conforman, desde la estructura genética de las poblaciones hasta las especies, los hábitats y la integridad de los ecosistemas (Achterberg 2014). Sumado al poco conocimiento sobre la diversidad marina en general, existen diversos factores que pueden inducir a la disminución de esta, entre ellos se encuentra el incremento de la población mundial que a su vez ejerce presión sobre los ecosistemas marinos y costeros del planeta (CONABIO-CONANP-TNC-PRONATURA 2007).

Algunos estudios han vinculado la pérdida de la diversidad de determinados ecosistemas con el incremento del riesgo de adquirir diferentes enfermedades, esta relación recibe el nombre de efecto de dilución (Ostfeld y Keesing 2000a, b). Básicamente, la pérdida de la biodiversidad está acompañada por la destrucción y fragmentación del hábitat, la contaminación, la invasión de especies exóticas y la explotación directa de recursos por humanos (Ostfeld 2009). La disminución de poblaciones y de especies localmente adaptadas no solo afecta la capacidad de los ecosistemas marinos de producir alimento para los seres humanos, sino que también influye en su estabilidad y en la capacidad de resiliencia de este en un medio ambiente marino cambiante. Al restaurar esta diversidad a través de programas de pesca sostenible, control de contaminantes, mantenimiento de hábitats prioritarios y creación de reservas marinas, se puede mejorar la productividad y garantizar los bienes y servicios que estos ecosistemas otorgan al ser humano (Worm *et al.* 2006). Cabe destacar que los descubrimientos recientes de nuevas especies se han presentado en ambientes marinos y que estos organismos son relevantes en la prospección química y biológica (Kodzius y Gojobori 2015).

Dentro de los ambientes marinos, las especies eucariotas juegan un papel relevante, aunque en su mayoría están representadas por organismos pequeños (menores a 1 mm), crípticos y muchos de ellos aún son desconocidos para la ciencia (Leray y Knowlton 2016). El ambiente marino generalmente se divide en dos ámbitos: bentos y pélagos. Al bentos, corresponden organismos que viven o se encuentran asociados al fondo de los cuerpos de agua. De acuerdo con su hábitat específico, estos se pueden clasificar en hiperbentos (sobre el substrato), epibentos (superficie del sedimento) y endobentos (enterrados en el substrato). El pélagos a su vez se subdivide en neuston, organismos que viven en la interfase agua-aire (Marshall 2009); plancton, organismos que flotan pasivamente y que no pueden moverse independientemente de las corrientes ya sean plantas (fitoplancton) o animales

(zooplankton) (Hays *et al.* 2005), y neuston que hace referencia a individuos que se desplazan activamente independientes de las corrientes (Boero *et al.* 1996). Entre estas zonas existe un acoplamiento particular, el cual juega un papel importante en la producción y estructura biológica del sistema (Marcus y Boero 1998). Estos ambientes presentan interacciones tróficas complejas y una amplia diversidad de hábitats que sirven de área de refugio, reproducción, alimentación y crecimiento de gran número de especies de vertebrados e invertebrados (Zamorano *et al.* 2010). Por lo general, las comunidades benthicas están dominadas, en gran parte, por una alta diversidad de invertebrados que representan el mayor número de filos animales (Pawlik 1992). Los invertebrados constituyen uno de los grupos más diversos en los sistemas lagunares costeros, siendo los moluscos los más importantes por su abundancia, además sirven como bioindicadores de calidad de agua y de contaminación.

Por otra parte, México es uno de los cinco países más diversos a nivel mundial, su ubicación privilegiada entre dos océanos le permite poseer gran diversidad biológica y ecosistémica. No obstante, a diferencia de la biodiversidad terrestre, la biodiversidad marina del país ha sido poco estudiada, aun cuando se encuentra rodeado por cuatro mares principales: Pacífico, golfo de California, golfo de México y el Caribe (CONABIO-CONANP-TNC-PRONATURA 2007, Lara-Lara 2008).

De los 32 estados que comprenden la República Mexicana, el estado de Oaxaca es considerado el de mayor biodiversidad en cuanto a flora y fauna terrestre se refiere (González-Pérez *et al.* 2004). Sin embargo, el conocimiento sobre la biodiversidad del ambiente marino es aún insuficiente, puesto que la mayoría de los estudios realizados en la costa se han estado concentrado en las Bahías de Huatulco y Puerto Ángel, las cuales se encuentran bien caracterizadas (López-Pérez *et al.* 2012). Aun así, existen otras zonas que pueden tener igual o mayor número de especies. Aunado al poco conocimiento sobre la diversidad de otras zonas costeras, se presentan investigaciones sesgadas hacia grupos de interés específicos lo que conlleva a una descripción heterogénea de la diversidad (López-Pérez *et al.* 2012). Además, el uso de técnicas como la identificación taxonómica tradicional toman bastante tiempo, lo que genera complicaciones en el monitoreo de la biodiversidad en regiones de alta riqueza de especies (Hajibabaei *et al.* 2016).

Pero ¿cómo se miden los cambios en la diversidad de una zona específica? En respuesta a esta pregunta, existen varios índices numéricos utilizados para describir y cuantificar su estatus. Este concepto en una comunidad cubre dos aspectos fundamentales, la riqueza o número de especies y la regularidad con la que se distribuyen estos organismos, es decir su abundancia relativa (Bandeira *et al.* 2013). Existen tres tipos diferentes de diversidad, estas son alfa, beta y gamma. La diversidad

alfa, se mide localmente, en una zona de poca extensión y dentro de las unidades de muestreo como un conteo del número de especies o unidades taxonómicas; la beta se define como el grado de cambio en la composición de la comunidad o el grado de diferenciación de la comunidad con relación a un complejo gradiente de ambiente o un patrón de ambientes. Por su parte, la diversidad gamma se relaciona con la variedad en un conjunto de unidades de muestreo (Tuomisto 2010). Los índices más utilizados para medir la diversidad alfa son el índice de Shannon-Wiener y el índice de Simpson (Janos y Laszlo 2000).

#### 1.1. Estudio de la diversidad marina en el mundo

Durante los últimos años, el estudio de la diversidad marina en el mundo ha cobrado gran relevancia, esto debido al esfuerzo constante de la comunidad científica. Se han creado organizaciones que recaudan información como el OBIS (Ocean Biodiversity Information System), el cual actúa como centro de intercambio abierto de información y datos sobre la diversidad marina para la ciencia, la conservación y el desarrollo sostenible (Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO 2024). También, algunas revistas científicas han concentrado trabajos relevantes sobre la diversidad marina en números especiales como el de *Austral Ecology: Analysing Marine Biodiversity Data* (Anderson *et al.* 2021). Se citan trabajos relevantes en los que se sugieren métodos para el análisis de la estructura de comunidades marinas y costeras (Clarke 1993, Warwick y Clarke 2001), el estudio de la diversidad bentónica en estuarios y ambientes costeros (Borja *et al.* 2000), en corales (Huston 1985) y en ambientes béticos (Gray 2000), por ejemplo.

##### 1.1.1. Especie biológica

Se conoce como especie biológica a aquellos grupos de poblaciones naturales que se cruzan real o potencialmente y que están aisladas reproductivamente de otros grupos similares (Mayr 1969). Sin embargo este concepto tiene dos desventajas, no aplica en organismos asexuales y no es práctica en poblaciones alopátricas (Aldhebiani 2017).

##### 1.1.2. Especie morfológica

De acuerdo con este concepto, una especie es una comunidad o una serie de comunidades relacionadas, cuyos caracteres morfológicos están, de acuerdo con la opinión de un especialista, suficientemente definidos para otorgarle un nombre específico. Este concepto puede aplicarse a organismos sexuales y asexuales. Sin embargo, las características morfológicas son subjetivas y dependen de la opinión de un experto en rasgos claves. Además, algunas veces las especies son morfológicamente indistinguibles pero claramente pertenecen a diferentes linajes (Regan 1925, Aldhebiani 2017).

### 1.1.3. Especie genética

Desde este punto de vista, una especie es un grupo de poblaciones naturales entrecruzadas y compatibles, que se encuentra genéticamente aislado de otros grupos similares. Con base en esta definición, la especiación resultaría ser la acumulación de cambios en los genes en dos linajes que producen aislamiento y protección de la integridad de los dos grupos genéticos que tienen destinos evolutivos independientes (Magurran 2004, Baker y Radley 2006).

### 1.1.4. Diversidad de especies

Según Whittaker (1960), la diversidad de especies de un área geográfica dada se divide en dos componentes: uno es la diversidad dentro de las comunidades en dicha área y el otro es el cambio en la composición de especies entre comunidades (Whittaker 1972, Pereyra y Moreno 2013).

- Diversidad biológica

Se define como la variedad de diferentes formas de vida en el planeta provenientes de cualquier fuente, incluidos los ecosistemas terrestres y acuáticos, otros ecosistemas acuáticos y los complejos ecológicos de los que hacen parte. Comprende la diversidad dentro de cada especie, entre las especies y la de los ecosistemas (El Convenio sobre la Diversidad Biológica 2024). Se mide en términos de riqueza de especies o cantidad de especies en un área determinada y abundancia de organismos de estas especies (Rawat y Agarwal 2015).

- Diversidad funcional

La diversidad funcional puede definirse como la variedad de capacidades y/o funciones que los organismos ejecutan dentro de las comunidades y ecosistemas (Petchey y Gaston 2006). También, se entiende como aquellos componentes de la biodiversidad que influyen en cómo los ecosistemas operan o funcionan. La diversidad funcional influye en la dinámica del ecosistema, la estabilidad, la productividad, el equilibrio de nutrientes, entre otros (Tilman 2001).

Para medir la diversidad funcional, primero se deben identificar los rasgos funcionales a tener en cuenta, estos deben ser características que influyen en el desempeño de los organismos y están relacionados con procesos en el ecosistema, la estabilidad del mismo, las interacciones biológicas y en alguna medida la modificación del hábitat (Petchey y Gaston 2006, Córdova-Tapia y Zambrano 2015). Estos rasgos funcionales se pueden clasificar en duros y suaves, los primeros miden la función de interés y suelen estar relacionados con la fisiología de los organismos, por lo general son complicados de medir. Los rasgos suaves por su parte, evalúan la función de manera indirecta y son menos difíciles de obtener (Violle *et al.* 2007). Las características morfológicas pueden considerarse como rasgos suaves, ya que estos son indicadores de como los organismos usan los recursos (Violle

*et al.* 2007, Córdova-Tapia y Zambrano 2015). Después de identificar los rasgos funcionales se deben crear grupos, basados en la similitud de los caracteres biológicos y ecológicos. Para elegir los grupos funcionales deben seguirse 5 pasos: 1) Definir el tipo de grupo funcional que se va a evaluar, 2) seleccionar los criterios de inclusión de las especies en el grupo a analizar, es decir definir la comunidad biológica, 3) elegir las funciones a considerar, 4) elegir los rasgos morfológicos, fisiológicos o ecológicos que reflejan las funciones y 5) elegir y aplicar métodos multivariados objetivos a la matriz especie \* rasgos (S\*T) producida (Fonseca y Ganade 2001).

Sin embargo, la clasificación de especies en grupos funcionales tiene ciertas limitaciones, depende de los rasgos funcionales seleccionados, no detecta cambios ontogénicos, insensible a cambios en la ecología alimentaria o usos de hábitat, supone que la variación interespecífica es mayor que la variación intraespecífica y supone equivalencia funcional dentro de los grupos. Por otro lado, dentro de sus ventajas se encuentra que es flexible y permite agregar tantos rasgos funcionales como se requiera, la similitud taxonómica no es requisito para establecer similitud funcional, el efecto de los grupos funcionales sobre el ecosistema es mayor que el de la riqueza de especies, ayuda a entender patrones de ensamblaje de comunidades, es un método rápido, ayuda a encontrar equivalencias funcionales e identifica especies potencialmente claves para el sistema (Córdova-Tapia y Zambrano 2015).

- Diversidad genética

La diversidad genética también definida como polimorfismo genético, es la variación en una secuencia de ADN entre individuos o cromosomas distintos de una especie o población (Ellegren y Ellegren 2016). El polimorfismo genético varía entre especies y entre genomas e influye directamente en la evolución y en la conservación de especies. La diversidad genética es necesaria para que haya evolución, existe una amplia relación entre la heterocigosidad y la adaptabilidad de las poblaciones. La pérdida de esta diversidad puede ser causada por endogamia, lo que reduce la aptitud reproductiva (Reed y Frankham 2003, Ellegren y Ellegren 2016).

- Diversidad filogenética

La diversidad filogenética se define como la diversidad evolutiva (PD), es una medida de biodiversidad basada en las relaciones evolutivas entre especies y representa uno de los componentes de la biodiversidad. Esta diversidad es relevante en conservación puesto que, se relaciona con procesos de extinción, invasión biótica, funcionamiento del ecosistema y servicios ecosistémicos (Winter *et al.* 2012).

Para calcular la diversidad filogénica, primero se deben entender algunos conceptos, como los siguientes:

*Árbol filogenético*: representa la hipótesis sobre las relaciones evolutivas entre las especies o entidades. Las relaciones evolutivas están representadas gráficamente en las ramas que conectan los nodos. El nodo interno (raíz) representa la ancestralidad común hipotética de todas las especies que se originan de ese nodo, los nodos terminales representan especies o taxas estudiados. Un clado, por su parte es un grupo de especies con un solo ancestro común (grupo monofilético) (Winter *et al.* 2012).

*Longitud de la rama*: la longitud de la rama que conecta dos nodos puede ser proporcional a la divergencia evolutiva entre los nodos. Las longitudes de las ramas se basan en la divergencia temporal (Winter *et al.* 2012).

## 1.2. Lagunas costeras

Las lagunas costeras son cuerpos de agua salobre o marinos poco profundos, separados del mar por una isla de barrera, un arrecife o un banco de arena y conectados con el océano por entradas de marea restringidas. Pueden estar encerradas parcial o totalmente, dependiendo de la extensión de la barrera, lo que impide a veces el intercambio de agua entre la laguna y el océano a causa de la acumulación de sedimento por acción de las mareas y la deriva litoral. Generalmente se ubican en costas bajas y están orientadas de forma paralela a la costa, de acuerdo con las condiciones climáticas de la zona, presentan un rango de salinidad amplio que va desde sistemas de agua dulce hasta hipersalinos. Estas ocupan alrededor del 13 % de las áreas costeras en todo el mundo y a menudo se ven afectadas por la influencia natural y antropogénica (Kjerfve 1994, Whitfield 2011).

Las lagunas costeras contribuyen a la productividad de las aguas costeras puesto que soportan gran cantidad de hábitats incluidas las marismas, los manglares y las praderas de pastos marinos. Por su tasa de descarga de agua relativamente baja, son hábitats favorables para los productores primarios y favorecen a su vez a la producción secundaria. No obstante, si la producción primaria excede la demanda de los consumidores puede causar eutrofización, lo que conlleva a reducir los niveles de oxígeno, la penetración de la luz, causar estrés y muerte de los organismos, cambios en la estructura de la comunidad y una posible pérdida de diversidad (Anthony *et al.* 2009).

### 1.2.1. Tipos de lagunas costeras

Geomorfológicamente, las lagunas costeras se formaron donde las bocas de los valles o tierras de baja altura se sumergieron durante las últimas etapas de la transgresión marina en el cuaternario tardío. Durante este proceso hace 6000 años se logró el nivel del mar actual. El crecimiento de bancos de arena o de barreras arrastradas por acción de las olas ha encerrado algunos de estos cuerpos de agua.

La forma y tamaño de estos sistemas depende de la configuración de la línea de costa existente en el lugar de formación, las esquinas y las barreras que la rodean, las cuales pueden modificarse por erosión interna y por la deposición (Bird 1994). Las lagunas costeras se clasifican en tres tipos geomorfológicos basados en el intercambio de agua con el océano: obstruidas, restringidas y con filtración.

*Obstruidas:* Están conformadas por una serie de cuerpos de agua elípticos interconectados, presentan una única entrada de agua del mar. Las oscilaciones de marea en estas lagunas se reducen en un 5 % en comparación con la marea costera adyacente, presentan largos periodos de inundación, forzamiento del viento dominante y eventos de estratificación intermitente a causa de la radiación solar y la escorrentía. Por lo general, en regiones áridas o semiáridas son permanente o temporalmente hipersalinas (Kjerfve 1994, Whitfield 2011, Duck y da Silva 2012).

*Restringidas:* Son cuerpos de agua anchos, paralelos a la costa, poseen dos o más canales de entrada. La circulación de la marea está bien definida, los vientos influyen de forma directa, la columna de agua está bien mezclada y presentan salinidades salobres a oceánicas. Los periodos de inundación son más cortos que los de las lagunas obstruidas (Kjerfve 1994, Whitfield 2011).

*Con filtración:* Tienen múltiples canales de entrada, estos dan origen a un cuerpo de agua alargado paralelo a la costa. Muestran un número amplio de entradas de marea, fuertes corrientes de marea y salinidades similares a las oceánicas (Kjerfve 1994, Whitfield 2011).

#### 1.2.2. Factores climáticos e hidrológicos

Las lagunas costeras están presentes en diferentes partes del planeta, desde las zonas polares donde se congelan en invierno y se descongelan en verano, en zonas húmedas templadas donde son alimentadas por las lluvias y por la escorrentía de las cuencas, con regímenes estuarinos. Hasta las zonas tropicales donde reciben agua fluvial y sedimentos como limos y arcillas que le dan turbidez al agua. En las zonas áridas la salinidad de estos cuerpos de agua puede ser superior a la del agua de mar (35 ppm) (Bird 1994).

Las características hidrológicas de las lagunas costeras están determinadas por el clima, su configuración, la naturaleza de las dimensiones de la entrada de agua por el mar, la precipitación y el equilibrio entre la entrada de agua dulce de los ríos, la evaporación, el afluente de agua salada del mar, el rango de mareas y la ventilación de las mareas (Bird 1994, Duck y da Silva 2012). Cuando las descargas de los ríos influyen en gran medida, se desarrollan sistemas estuarinos o deltaicos. En lugares donde la influencia marina es dominante, se desarrollan las lagunas (Duck y da Silva 2012).

### 1.2.3. Parámetros geofisicoquímicos y biológicos

La profundidad promedio en las lagunas costeras es de 2 m, pero pueden encontrarse profundidades mayores en canales y algunos agujeros. Debido a su poca profundidad y a la acción de las olas, solamente se presenta estratificación en zonas profundas. Estos cuerpos de agua se caracterizan por presentar condiciones micromareales donde los rangos de marea promedio son menores a 2 m. En estos, los rangos de marea más grandes producen movimientos advectivos lo que genera reducción en la deposición de sedimento y acelera la erosión de algunas estructuras. El comportamiento de las lagunas costeras puede variar considerablemente aun cuando posean morfologías de cuenca similares a otras. Así mismo los procesos fisicoquímicos en estos sistemas se ven influenciados por el tamaño y la configuración de las entradas de marea, la extensión y desarrollo de las cuencas hidrográficas limítrofes, el volumen de entrada de agua dulce, la profundidad del agua y las condiciones del viento. Cambios en la precipitación y la evaporación, la escorrentía, la filtración de agua subterránea y las variaciones de flujo en la fuerza del viento explican las diferencias en el transporte advectivo (horizontal) en estos sistemas. Además, la hidrología de estos puede cambiar debido a tormentas, mareas de viento, inundación, reconfiguraciones de la entrada, recuperación de terrenos, construcción de presas y diques, barreras artificiales y por el dragado de canales. La salinidad puede verse afectada por pulsos de agua inyectados por huracanes y por cambios estacionales en la afluencia de los ríos, la temperatura por su parte, por condiciones meteorológicas ya que son cuerpos de agua poco profundos (Kennish y Paerl 2011).

La zona fótica o eufótica, donde penetran los rayos del sol y hay disponibilidad de luz para la fotosíntesis, en estos cuerpos de agua alcanza la mayor parte del fondo marino, donde el bentos se encarga de generar una gran fracción de la producción primaria total del sistema (Lara-Lara 2008). Además, las altas tasas de metabolismo de los productores primarios bentónicos median los procesos de ciclo de nutrientes y esto trae como consecuencia un fuerte acoplamiento béntico-pelágico. La turbidez y el crecimiento del fitoplancton pueden atenuar la cantidad de luz que llega al fondo de la laguna. Sin embargo, si existe una cantidad adecuada de luz pueden crecer pastos marinos y algas bentónicas y como consecuencia la producción primaria béntica puede exceder la producción del fitoplancton. Debido a la tasa de residencia, relativamente larga, los nutrientes se reciclan muchas veces antes de ser expulsados al océano; esto puede favorecer el sobre enriquecimiento de nutrientes y la eutrofización acelerada (Kennish y Paerl 2011). Los nutrientes son transportados a las lagunas por aguas superficiales, subterráneas o por intercambio con el océano (Anthony *et al.* 2009).

#### 1.2.4. Hábitats (planctónico y bentónico)

*Planctónico:* Se le llama plancton a los organismos que viven a merced de la corriente en los diferentes cuerpos de agua. Sin embargo, no todos los organismos planctónicos están asociados estrictamente a la columna de agua, existen algunos que consisten en las fases dispersivas de la reproducción de especies asociadas al fondo, estos reciben el nombre de “meroplancton”. Dentro del plancton se encuentran dos grupos, el fitoplancton y el zooplancton. El fitoplancton contiene a organismos fotosintéticos con tallas menores a los 2  $\mu\text{m}$  (nanoplancton) hasta tallas mayores a los 50  $\mu\text{m}$  (microplacton), estos pueden ser unicelulares y forman filamentos. Por su parte, el zooplancton está compuesto por animales microscópicos que se alimentan de algas y bacterias y que a su vez son consumidos por pequeños peces e invertebrados (Hamilton y Duggan 2014).

*Bentónico:* Se entiende por bentos al conjunto de organismos que vive o se encuentra asociado al fondo de los cuerpos de agua. De acuerdo con su hábitat específico, estos se pueden clasificar en hiperbentos, epibentos y endobentos. Los primeros, tienen capacidad de nado y realizan migraciones verticales sobre el sustrato, los segundos habitan sobre la superficie del sustrato y los últimos viven enterrados en el sustrato. Según la talla también se pueden clasificar en macrofauna (> 500  $\mu\text{m}$ ), meiofauna (entre 500 y 63  $\mu\text{m}$ ) y microfauna (<63  $\mu\text{m}$ ) (Pech y Ardisson 2010).

La meiofauna es considerada como el ensamble de metazoos bénticos que se distingue de la macrofauna por su tamaño pequeño. Como parte de la meiofauna se encuentran organismos móviles y algunas veces apto-sésiles (animales adheridos al sustrato pero que pueden cambiar de posición). Los límites en el tamaño de la meiofauna se definen basándose en el ancho de malla de tamices, como límite superior se utiliza el de 500  $\mu\text{m}$  y como límite inferior el de 63  $\mu\text{m}$ , según esto la fauna que pasa por el tamiz grande pero que queda retenida en el pequeño es considerada como meiofauna (Giere 2009). La meiofauna es importante en las redes alimenticias, en el intercambio de nutrientes entre el bentos y la columna de agua y en la estabilización del sedimento (Giere 2009, Brannock *et al.* 2014, 2016b). Su distribución está ampliamente relacionada con características ambientales como la granulometría del sedimento, la salinidad, la temperatura, la materia orgánica, los flujos hidrodinámicos y algunos procesos “bottom-down” como la bioturbación (Giere 2009, Lin *et al.* 2014, Rohal *et al.* 2014). Además su abundancia varía de forma espacial y temporal (Brannock *et al.* 2016b).

#### 1.2.5. Materia orgánica, tipos de sedimentos y su relación con la distribución de los organismos

En las lagunas costeras, los sedimentos juegan un papel importante en el reciclaje de materia orgánica y en la biogeoquímica de los metales traza. En sedimentos con buenas concentraciones de oxígeno, el carbono orgánico se descompone rápidamente en la interfaz agua-sedimento. Altas concentraciones

de carbono orgánico evitan la penetración de oxígeno en el sedimento debido a la utilización del O<sub>2</sub> por las bacterias para descomponer la materia orgánica. Por su parte, bajo condiciones hipóxicas la degradación de materia orgánica sedimentaria emplea metales traza como oxidantes secundarios y produce la reducción de hierro y manganeso en consecuencia a la movilización y difusión ascendente de estos metales a los sedimentos óxicos donde se precipitan como óxidos o como carbonatos. En escenarios bajo condiciones sulfato reductoras, ciertos metales tienden a formar sulfuros insolubles, el Cu está fuertemente asociado con la diagénesis de la materia orgánica en el sedimento durante su entierro (Ruiz-Fernández *et al.* 2009).

El ingreso de flujo de agua dulce a las lagunas costeras trae consigo material terrígeno, el cual se distribuye en el cuerpo de agua generando un gradiente. Asociado al cambio en la granulometría de los sedimentos también se presentan cambios en la fauna, siendo más evidentes en meiofauna que en macrofauna, debido a que esta prefiere hábitats más estables (Palacín *et al.* 1991). Algunos estudios realizados en lagunas costeras en el Mediterráneo, han demostrado que aunque el tipo de sedimento está relacionado con la densidad de organismos, hay otras variables ambientales que forman gradientes, limitan la distribución y determinan el patrón de las comunidades meióbénticas (Palacín *et al.* 1991). Estos factores pueden estar asociados a los detritos, las bacterias y a la química agua-sedimento; los sedimentos orgánicos floculentos y estables de las lagunas son mejor aprovechados por los animales a diferencia de los sedimentos gruesos (Mcarthur *et al.* 2000). En la interfaz agua-sedimento se llevan a cabo distintas reacciones físicas, químicas y biológicas que llevan a la formación de fases, alteración de minerales y a cambios en la composición del agua. Las reacciones de oxidación de materia orgánica son llevadas a cabo por bacterias que usan diferentes aceptores de electrones, estas reacciones están controladas por factores externos como la temperatura, la sedimentación, la materia orgánica, la química e hidrodinámica del fondo, la bioturbación y el riego. Un claro ejemplo del efecto de las bacterias en la diagénesis temprana es el caso de los estromatolitos. Estos son producidos por biopelículas de cianobacterias, durante la diagénesis los granos de carbonato (Whitton 2012). En lagunas costeras, los procesos diagenéticos tempranos son importantes en el ciclo biogeoquímico de los nutrientes, estos regulan la cantidad de nutrientes enterrados y los reciclados en la columna de agua (Spagnoli *et al.* 2004).

En el caso de la meiofauna, la materia orgánica influye en su abundancia y en cambios temporales mientras que la salinidad lo hace en su estructura. Altas densidades de organismos meiofaunales en los sedimentos de las lagunas pueden explicarse por la presencia de grandes cantidades de materia orgánica con alto contenido nutricional. Sin embargo, la presencia de bajas abundancias de meiofauna en sedimentos con alta acumulación de materia orgánica también puede

tener un efecto negativo sobre las comunidades, todo depende de la calidad de la misma (Gambi *et al.* 2003). La macrofauna bentónica marina modula la composición de sedimentos y los procesos biogeoquímicos mediante la bioturbación, la cual tiene efecto sobre la funcionalidad del ecosistema como la alteración de procesos microbianos que influyen en la degradación de materia orgánica, el intercambio de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> y nutrientes en el sedimento y en la superficie del agua (Valdemarsen *et al.* 2018).

La diagénesis temprana genera productos reducidos y crea gradientes y flujos químicos (Anschutz y Lecroart 2007). Cambios en la composición del sedimento, dados por procesos temporales como el incremento de fitodetritos generan variaciones en el consumo de oxígeno en el sedimento, en el crecimiento y la tasa de reproducción de animales bénticos, incrementa la actividad de ciertos grupos de bacterias y la actividad y la biomasa de organismos meiofaunales y microfaunales. La actividad de la macrofauna puede ayudar a mejorar la penetración de oxígeno y mejorar el flujo de solutos en la interfaz agua-sedimento (Spagnoli *et al.* 2004). No obstante, la distribución vertical de la meiofauna puede verse afectada por la presencia de fitodetritos en la superficie del sedimento (Galéron *et al.* 2001). La bioturbación en la capa superior del sedimento como resultado de la sobrepoblación de macrofauna puede contribuir a que los organismos infaunales descendan en el mismo. Por su parte, la presencia de organismos infaunales contribuye a la preservación de materia orgánica en sedimentos marinos (Galéron *et al.* 2001).

La cantidad de materia orgánica se relaciona con el tamaño del grano de sedimento, altas concentraciones de materia orgánica se presentan cuando incrementa la cantidad de lodo, sedimentos finos suelen estar asociados a alto contenido orgánico. Altas concentraciones de sedimentos fangosos pueden causar eutrofización en el sistema y reducir la diversidad de organismos. Sin embargo, cuando los sedimentos son homogéneos surge incertidumbre sobre la composición de la diversidad (Magni *et al.* 2004, Bertrán *et al.* 2016). En sedimentos gruesos las concentraciones de oxígeno tienden a ser altas, a medida que se reduce el tamaño de grano la capa de discontinuidad del potencial redox se acerca a la superficie lo que hace que los organismos se rodeen de condiciones casi anóxicas; bajo estas condiciones pueden habitar algunos bivalvos infaunales provistos de sifones que les permiten tener conexión con agua oxigenada en la superficie del sedimento (Akberali y Trueman 1985). La materia orgánica sedimentaria controla la composición, estructura y distribución de comunidades macrofaunales. Por ejemplo, los poliquetos dominan sedimentos ricos en materia orgánica, cuando existe enriquecimiento de materia orgánica adicional tienden a aparecer grupos oportunistas y posteriormente se genera agotamiento de oxígeno y colapso macrofaunal béntico. En sedimentos con menor concentración de materia orgánica tienden a reducirse los poliquetos y comienzan a dominar los moluscos y crustáceos (Magni *et al.* 2004). Algunos estudios han demostrado que los nematodos

se distribuyen en mayor medida en los 3 primeros centímetros de sedimento, los copépodos harparticoideos en el primer centímetro del sedimento al igual que algunos poliquetos (Opheliidae). Otros poliquetos megafaunales se distribuyen entre 1-5 centímetros de profundidad, algunos moluscos bivalvos y crustáceos tanaidaceos de 1-3 centímetros de profundidad en el sedimento y los isópodos en el 1 centímetro (Galéron *et al.* 2001). En el caso de los nematodos, el incremento de sedimentos limosos favorece su aparición en los sistemas (Semprucci *et al.* 2014).

Es importante tener en cuenta que dentro de la materia orgánica que se deposita en el sedimento, también se encuentra el ADN de los organismos que allí han vivido. De este, se ha comprobado que el extracelular puede suministrar el 20 % de los requerimientos anabólicos procariotas diarios de fósforo orgánico en sedimentos costeros. Esta puede ser una fuente importante de nutrientes para el metabolismo heterotrófico bentónico (Corinaldesi *et al.* 2007, 2008).

#### 1.2.6. Bienes y servicios ambientales de las lagunas costeras

El valor de los bienes y servicios proporcionados por las lagunas costeras se encuentra entre los más altos de los sistemas naturales; debido al reciclaje de nutrientes, cosecha directa, recreación y valor estético (Basset *et al.* 2013). Las lagunas costeras proporcionan diferentes tipos de hábitats, como manglares, pantanos y praderas marinas (Newton *et al.* 2018). Estos hábitats funcionan como áreas de desove y, reproducción, zonas de alimentación y vías de migración para vertebrados e invertebrados (Heck *et al.* 1995, Franco *et al.* 2006). A pesar de la clara importancia de estos ecosistemas y sus servicios, la biodiversidad de las lagunas costeras no está bien caracterizada, particularmente en regiones tropicales. Para muchos sistemas de lagunas, se carece de datos básicos de biodiversidad y se sabe poco sobre el impacto de la variación espacial y temporal en las comunidades dentro de los sistemas de lagunas altamente heterogéneos (Balzano *et al.* 2015).

## 2. Antecedentes

### 2.1. Diversidad a partir de taxonomía tradicional

#### 2.1.1. Lagunas costeras en México, diversidad y su relación con las características ambientales

El litoral mexicano comprende cerca de 11592.76 km de línea de costa y dentro de esta se distribuyen diferentes ecosistemas. De los 32 estados que comprenden el territorio nacional, solamente 17 tienen límites costeros. En cuanto a las lagunas costeras, México cuenta con alrededor de 15000 km<sup>2</sup> distribuidos en 130 sistemas (Alvarez-Arellano y Gaitán Morán 1994, Lara Domínguez *et al.* 2011). De los ecosistemas bénticos se destaca que los encontrados en las lagunas costeras fueron de los primeros en ser estudiados en el país, especialmente aquellos asociados a bancos ostrícolas. Se considera a estos sistemas como diversos, al igual que al ambiente marino inmediato (Lara-Lara

2008). En promedio se calcula que para cada laguna la cantidad de especies de peces varía entre 50 y 100, la de moluscos entre 50 y 90 y la de crustáceos entre 40 y 70. La riqueza íctica de los sistemas estuario-lagunares de México es una de las más altas registradas para zonas tropicales del planeta, alrededor de 400 especies. Estos sistemas contienen, en su mayoría, dentro de sí bosques de manglar que albergan aves, reptiles y mamíferos (Contreras y Castañeda 2004). En cuanto a la diversidad lagunar costera, riqueza de especies, Contreras y Castañeda (2004) citan algunos sistemas lagunares del país como los siguientes:

*Reserva de la biosfera El Vizcaíno, (BCS):* alberga 308 especies de vertebrados terrestres y marinos (4 anfibios, 43 reptiles, 192 aves y 69 mamíferos).

*Sistema lagunar Agiabampo (Sonora):* con 265 especies de moluscos y 70 de aves.

*Laguna de Términos (Campeche):* contiene 176 especies de moluscos, 83 especies de crustáceos decápodos, 122 de peces, 22 de copépodos, 138 de aves y 123 de poliquetos.

En México, algunos estudios han evaluado la relación entre los parámetros ambientales de los sistemas lagunares costeros y la distribución biológica en los mismos. La salinidad y la temperatura suelen ser los factores con mayor incidencia en la distribución biológica en estos sistemas. Este es el caso de algunas comunidades de peces en la laguna Carretas-Pereyra en Chiapas (Velázquez-Velázquez *et al.* 2008) y el sistema lagunar Chacahua-Pastoría en Oaxaca (Esparza y Guerra Mendoza 2010), comunidades de moluscos bentónicos en los sistemas lagunares Chacahua-Pastoría y Corralero-Alotengo (Zamorano *et al.* 2010) y Agua Dulce/ El Ermitaño en Jalisco (Landa-Jaime 2003), la comunidad micro-fitoplanctónica de las lagunas Chantuto-Panzacola y Carretas-Pereyra en Chiapas y los crustáceos en la laguna Mecoacán en Tabasco (Domínguez *et al.* 2003).

- *Chacahua-Pastoría y Corralero-Alotengo: Diversidad bentónica (y organismos con etapas planctónicas)*

En la zona marina y costera del estado de Oaxaca se han identificado 1765 especies de invertebrados, de estas la mayoría corresponde a moluscos, crustáceos y anélidos (Bastida-Zavala y García-Madrigal 2022). Para las lagunas costeras de este estado, los muestreos se han focalizado en hábitats específicos, tales como raíces de mangle, o a grupos puntuales distinguidos por el observador con artes de pesca poco selectivas como redes de arrastre, las cuales no permiten distinguir en qué capa del sedimento o de la columna de agua se encuentran los organismos recolectados. En cuanto a los crustáceos, para Corralero-Alotengo, se ha estudiado la distribución, abundancia y composición de postlarvas de camarones como *Farfantepenaeus brevisrostris*, *F. californiensis*, *Litopenaeus*

*vannamei* y *L. stylirostris* (Sánchez-Meraz y Martínez-Vega 2000). En estudios realizados en Chacahua-Pastoría, se han encontrado organismos bénticos pertenecientes a grupos de poliquetos, cumáceos, tanaidáceos, isópodos y anfípodos (Pantaleón-López *et al.* 2005). Para estas dos lagunas, se ha reportado la presencia de 43 especies de moluscos entre las que dominan los bivalvos *Mytella strigata* y *Tagelus longisinuatus* (Zamorano *et al.* 2010).

## 2.2. Identificación de organismos a partir de código de barras en muestras ambientales: ¿Qué se ha identificado?

La metodología del código de barras permite identificar especies usando fragmentos de ADN estandarizados, es decir, pequeñas partes del genoma encontradas en un grupo amplio de taxa. Los especímenes de los cuales se obtienen las secuencias de ADN, depositadas en una base de datos publica, están bien identificados y se encuentran en una colección de historia natural (Hajibabaei *et al.* 2007, Cristescu 2014). La amplificación de una secuencia de código de barras a partir de muestras ambientales, permite evaluar la biodiversidad de una región a través del material genético que se encuentra disuelto en una muestra específica. En la determinación de la biodiversidad se suele emplear esta metodología con muestras de ADN del ambiente o ADNe (environmental DNA), el cual es material genético obtenido directamente de muestras ambientales como suelo, sedimento, agua, entre otros, sin algún signo obvio de la fuente del material (Thomsen y Willerslev 2015). De esta forma, se conoce la composición de las comunidades de esa muestra aun cuando los organismos ya no se encuentren presentes en la región, o son difíciles de capturar o de identificar visualmente, pero que han dejado una pequeña fracción de material genético que puede ser amplificado (Hajibabaei *et al.* 2012).

Con la amplificación de regiones que sirven como código de barras genético en estas muestras de ADN ambiental, por medio de técnicas de secuenciación masiva, se puede lograr determinar la composición casi absoluta, a nivel de género y especie, en las mismas (Hajibabaei *et al.* 2011). Algunos métodos parten de la utilización de la muestra ambiental en su totalidad, es decir del grupo de organismos y de la matriz en la que ellos se desarrollan, por ejemplo, muestras de sedimentos de las que se extrae el ADN de este sin la necesidad de distinguir componentes. Sin embargo, otras técnicas requieren de la separación entre el medio y los organismos, por ejemplo las llamadas sopas de organismos de las cuales se extrae ADN de una mezcla de partes o individuos completos (Yu *et al.* 2012, Lobo *et al.* 2013). Las técnicas tradicionales, emplean términos específicos cuando en la identificación del organismo no se es posible llegar hasta el máximo nivel taxonómico (especie), uno de ellos es la Unidad Taxonómica Operacional (OTU). Un OTU, puede referirse a un individuo o a

un nivel taxonómico, el cual ha sido agrupado por similitud. En el código de barras metagenómico, se emplean los MOTUs o Unidades Taxonómicas Operacionales Moleculares, las cuales se identifican por medio de la identidad de las secuencias de ADN. La identidad de la secuencia de un organismo, no necesariamente tiene que corresponder con la identidad de OTU dada por otros modelos como los morfológicos, por ejemplo (He *et al.* 2015).

Para la identificación de metazoos en muestras ambientales, se ha usado el gen que codifica a la proteína mitocondrial de la sub unidad I de la citocromo oxidasa (COI), aproximadamente 500 pb (Hajibabaei *et al.* 2012, Shokralla *et al.* 2014). Este se ha utilizado en genética de poblaciones y estudios filogeográficos, aunque existen algunos grupos en los que la amplificación de los fragmentos asociados a este gen resulta compleja, como por ejemplo los nematodos marinos (Derycke *et al.* 2010). Sin embargo, para los grupos en los que COI no da suficiente claridad, o presenta problemas, se amplifican otros genes como, por ejemplo, el 18S (Bittleston *et al.* 2015). Esta técnica ha sido utilizada en la identificación de hongos asociados a sedimentos (Schmidt *et al.* 2013), meiofauna presente en sedimentos marinos (Brannock y Halanych 2016), muestras de agua de ambientes marinos (Brannock *et al.* 2016a), describir la comunidad planctónica eucariota en zonas de luz para aguas tropicales y templadas (Vargas de *et al.* 2015), estudiar la comunidad meiobéntica en sedimentos costeros y estuarinos (Chariton *et al.* 2010, Brannock *et al.* 2014, 2016b, Lallias *et al.* 2015), caracterizar a la comunidad béntica en sedimentos de zonas profundas (Guardiola *et al.* 2015), identificar organismos eucariotas presentes en placas de asentamiento cerca de arrecifes de ostras (Leray y Knowlton 2015), entre otros tipos de muestras ambientales.

En el caso de los sedimentos en ecosistemas acuáticos, en las zonas marinas y costeras, el estudio de los organismos que allí habitan ha sido limitado, algunas veces por la difícil tarea de acceder a zonas profundas o simplemente porque no se cuenta con suficiente información, tiempo o dinero para hacerlo (Guardiola *et al.* 2015). Sin embargo, con ayuda de técnicas como el *metabarcoding* su estudio se ha facilitado y son variados los trabajos que utilizan esta técnica para describir la diversidad en sedimentos (Chariton *et al.* 2010, Guardiola *et al.* 2015, Lallias *et al.* 2015, Brannock *et al.* 2016b, Sinniger *et al.* 2016, Lobo *et al.* 2017, Wangensteen *et al.* 2018). En los últimos años, el desarrollo de cebadores específicos a partir de los preexistentes o de nuevas secuencias consenso ha permitido que la identificación sea más específica. Sin embargo, aún existen diferentes enfoques en relación con el tipo de gen que se quiera amplificar y por ende al juego de iniciadores con el que se amplifique el ADN y la región del gen objetivo. En sedimentos y para metazoos bénticos generalmente se usa el gen COI y el 18S (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Metabarcoding en sedimentos marinos y costeros. Pares de bases (pb).

Lugar	Técnica	Gen amplificado y primers usados	Long. fragmento	Tipo de sedimento	Organismos encontrados	Referencia
España (océano Atlántico y mar Mediterráneo)	Metabarcoding en muestras ambientales	<b>Gen:</b> 18S rRNA, región V7. 18S_allshort F: TTTGTCTGSTTAATTSCG 18S_allshort R: GCAATAACAGGTCTGTG <b>Gen:</b> COI jgHCO2198 R: TAIACYTCIGGRTGICCRAARAAYCA mlCOIintF-XT F: GGWACWRGWTGRACWITITAYCCYCC	18S: 110 pb COI: 313 pb	Sedimentos de fondos marinos duros.	Cantidad de secuencias no asignadas más alta en fragmentos amplificados con COI que con 18S. Asignación de especies más confiable con COI.  Los dos marcadores fueron capaces de detectar macroorganismos (macro fauna y algas grandes), 17 filos macroscópicos. Sin embargo, en el caso de la meiofauna y la microfauna resultó más efectivo el 18S.	Wangenstein <i>et al.</i> 2018
Portugal	Metabarcoding a partir de sopa de organismos (macrobentos).	<b>Gen:</b> COI Lobo F1: KBTCHACAAAYCAYAARGAYATHGG Lobo R1: TAAACYTCWGGRTGWCCRAARAAYCA	658 pb	Sedimento estuarino.	Poliquetos, malacostracos y bivalvos.	Lobo <i>et al.</i> 2017
Atlántico, Ártico, Antártida, Indico, Pacífico Noroccidental, Mediterráneo	Metabarcoding en muestras ambientales.	<b>Gen:</b> 18S rRNA, región V1 y V2. R22mod: CCTGCTGCCTTCTTRGA SSU_F04: GCTTGTCTCAAAGATTAAGCC	250-500 pb	Sedimentos de zonas profundas. Lodo y arena.	Nematodos, platelmintos, artrópodos, moluscos, stramenofilos, gastrotricos y anélidos.	Sinniger <i>et al.</i> 2016
Golfo de México, Estados Unidos.	Metabarcoding en muestras ambientales	<b>Gen:</b> 18S rRNA, región V9. 1380F: XXXXXCCCTGCCHTTTGTACACAC 1510R: CCTTCYGCAGGTTACCTAC	260 pb	Sedimentos de la zona submareal. Fango, limo y arena.	76 % = no metazoos, 18 % metazoos, 3.1 % hongos, 2.7 % no se asignaron.  Grupos dominantes: Stramenofilos (diatomeas), anélidos, artrópodos, nematodos.	Brannok <i>et al.</i> 2016

Reino Unido	Metabarcoding en muestras ambientales	<b>Gen:</b> 18S rRNA SSU. SSU_F04: GCTTGTCTCAAAGATTAAGCC SSU_R22: GCCTGCTGCCTTCCTTGA	450 pb	Sedimento estuarino.	Microeucariotas. Nematodos, artrópodos y platelmintos.	Lallias <i>et al.</i> 2015
Mediterráneo	Metabarcoding en muestras ambientales	<b>Gen:</b> 18S rRNA, región V7. 18S_allshort F: TTTGTCTGSTTAATTSCG 18S_allshort R: GCAATAACAGGTCTGTG	100-110 pb	Sedimentos de cañones submarinos	Anélidos, artrópodos, nematodos	Guardiola <i>et al.</i> 2015
Sídney (Australia)	Metabarcoding en muestras ambientales	<b>Gen:</b> 18S rRNA All18SF: TGGTGCATGGCCGTTCTTAGT All18SR: CATCTAAGGCATCACAGACC	200-500 pb	Sedimentos de zonas estuarinas contaminadas y libres de contaminantes.	54 filos eucariotas. Metazoos: poliquetos, platelmintos, nematodos, artrópodos y moluscos.	Chariton <i>et al.</i> 2010

### 3. Preguntas de investigación

#### **Capítulo 1:**

- 1) ¿Qué tan efectivas son las técnicas moleculares de identificación taxonómica de nueva generación frente a la taxonomía tradicional para evaluar la diversidad de invertebrados béticos en los sistemas lagunares Chacahua-Pastoría y Corralero-Alotengo?
- 2) ¿Existen diferencias entre los grupos identificados según el marcador genético usado (COI y 18S)?

#### **Capítulo 2:**

- 1) ¿La diversidad de metazoos y micro-eucariotas en el sedimento difiere entre los sistemas lagunares Chacahua-Pastoría y Corralero-Alotengo? Sí es así, ¿qué grupos taxonómicos dominan y qué causa tal diferencia?
- 2) ¿Cómo las variaciones en los parámetros fisicoquímicos, ocasionados por los cambios en las condiciones climáticas de la región, modifican la composición y estructura metazoos y microeucariotas béticos en los sistemas lagunares costeros Chacahua-Pastoría y Corralero-Alotengo?

#### **Capítulo 3:**

- 1) ¿La diversidad de microorganismos (procariotas y hongos) en los sistemas lagunares Corralero-Alotengo y Chacahua-Pastoría es similar?
- 2) ¿Qué parámetros ambientales modulan la composición y estructura de la diversidad de procariotas y hongos en los sistemas lagunares Corralero-Alotengo y Chacahua-Pastoría?

### 4. Justificación

El ambiente marino resulta ser, para la mayoría de los países costeros, una de las principales fuentes de recursos, ya sea por la cantidad y diversidad de alimento que este proporciona, por su papel en el transporte de carga marítima y por ser fuente de diferentes tipos de energía (Halpern *et al.* 2008). Sin embargo, el conocimiento de la biodiversidad marina en el mundo y en México en particular, aún es incipiente con relación a lo que se sabe de la diversidad terrestre. Además, las fuertes presiones que se ejercen sobre los ecosistemas marinos han llevado a la reducción de distintos grupos de organismos y a la afectación de gran número de ambientes, aun cuando no se tienen registros de la diversidad de

los ambientes afectados (CONABIO-CONANP-TNC-PRONATURA 2007). El estado de Oaxaca es considerado como el estado más rico en diversidad faunística y florística terrestre de México; sin embargo, en cuanto a los ecosistemas marinos aún quedan muchos interrogantes puesto que los pocos estudios que se tienen sobre la misma están centralizados en pequeñas zonas y en grupos taxonómicos específicos (López-Pérez *et al.* 2012). Para este estado, existen zonas que aún no presentan estudios sobre su diversidad y si los hay están incompletos. Por ello resulta relevante establecer investigaciones sobre zonas que potencialmente podrían tener gran diversidad de especies, conocer su línea base y poder generar conocimiento que permita emprender planes de manejo futuro para estos ambientes.

Dentro de los sistemas menos estudiados del estado de Oaxaca, se encuentra el Parque Nacional Lagunas de Chacahua, el cual recibió su decreto de formación en 1937, pero irónicamente, son escasos los estudios realizados en él y sumado a esto, se presentan problemas como el poblamiento humano acelerado, la sobre explotación pesquera y la ampliación de la frontera agrícola (García-Grajales y Buenrostro-Silva 2014). Por otro lado, la diversidad en el sistema lagunar Corralero-Alotengo es prácticamente desconocida por la ausencia de estudios, sin embargo, alberga una diversidad similar o mayor a la del sistema lagunar Chacahua-Pastoría.

Por lo descrito anteriormente, resulta apropiado realizar estudios que permitan describir la diversidad de los distintos ecosistemas del estado y que estos utilicen metodologías prácticas que permitan identificar los diversos grupos taxonómicos presentes en la zona con una inversión mínima de tiempo con relación al total de grupos identificados. El presente estudio tiene como finalidad describir la diversidad de invertebrados asociados al sedimento en los ecosistemas citados con anterioridad utilizando herramientas moleculares (Metabarcoding). Además, se pretende evaluar la efectividad que tiene el Parque Nacional Lagunas de Chacahua por ser un área protegida, sobre la salvaguarda de la diversidad en comparación con otras que no están protegidas como el sistema lagunar Corralero-Alotengo.

##### 5. Zona de estudio

La zona costera del estado de Oaxaca se encuentra en el Pacífico Oriental Tropical (POT) (Spalding *et al.* 2007), entre la región central y la región sur del Pacífico mexicano. Está ubicada a lo largo de una plataforma continental estrecha en la placa de Cocos y se caracteriza por estar cubierta estacionalmente por la piscina cálida que se forma durante la primavera en Centroamérica y se expande en el verano. El agua tropical superficial con alta salinidad y temperatura llega constantemente a la costa y en inviernos extremos el agua superficial fría y de baja salinidad de la corriente de California se desplaza por todo el estado hasta llegar al golfo de Tehuantepec. A

mediados de invierno y durante la primavera, la corriente de California se intensifica y se desvía hacia el oeste para alimentar a la corriente Norecuatorial, dejando a su vez las aguas de la región. En consecuencia, las *características* oceanográficas de la zona en invierno están determinadas por eventos locales de vientos, calentamiento solar y lluvias. En el verano, la corriente costera de Costa Rica dirige las condiciones oceanográficas de la región (Kessler 2006, López-Pérez *et al.* 2012, Chiappa-Carrara *et al.* 2019).

- Los sistemas lagunares Chacahua-Pastoría y Corralero Alotengo

Dentro de la zona costera de Oaxaca se localizan los sistemas lagunares Chacahua-Pastoría y Corralero-Alotengo, en la región el clima es cálido subhúmedo, con lluvias de junio a agosto, temperatura media anual de 26 °C y con presencia de tormentas tropicales y huracanes frecuentes (Zamorano *et al.* 2010).

*Sistema lagunar Chacahua-Pastoría:* Se ubica dentro del Parque Nacional Lagunas de Chacahua, Oaxaca, localizado entre las coordenadas extremas 15° 57' 0.237''- 16° 03' 05.96'' latitud norte y 97° 31' 57.15''- 97° 48' 01.01'' longitud oeste, en Tututepec, Juquila (Semarnat y Conanp 2014). Posee una superficie aproximada de 32 km<sup>2</sup>, está compuesto por las lagunas Chacahua y Pastoría las cuales se comunican entre sí por un canal de aproximadamente 3 km (Zamorano *et al.* 2012, García-Grajales y Buenrostro-Silva 2014, Amézquita *et al.* 2015). Es el segundo cuerpo lagunar más grande de Oaxaca, la laguna Pastoría es la de mayor tamaño (21 km<sup>2</sup> aproximadamente) y hasta el año 2003 presentaba comunicación permanente con el mar a diferencia de la laguna Chacahua (11 km<sup>2</sup> aproximadamente), lo que les confería características hidrológicas-productivas diferentes (Zamorano *et al.* 2010). Actualmente, la laguna Pastoría se encuentra cerrada por un bloqueo de arena que se ha formado en el canal del Silencio, lo que ha causado disminución en la concentración de oxígeno del sistema y en consecuencia mortandad en algunos de los organismos que ahí habitan (Chaca 2017).

La temperatura en época de lluvias para la laguna Chacahua muestra un gradiente transversal, es decir que esta disminuye de la cabeza a la boca. En verano se presentan las temperaturas ambientales más cálidas, lo que promueve un mayor calentamiento del agua somera. Al igual que en época de lluvias, en secas la temperatura es más baja en la boca de la laguna y más alta en la cabeza. Chacahua es un estuario positivo cuyo aporte de agua dulce en la cabeza permite que la salinidad se mantenga por debajo de la salinidad del agua de mar. En cuanto al oxígeno disuelto superficial, la laguna Chacahua presenta la mayor variación debido al efecto de la marea sobre las masas de agua en la laguna (Esparza y Guerra Mendoza 2010). Pastoría es una laguna mesohalina (salinidad entre 5 y 18) con algunas zonas oligohalina (salinidad menor a 5) (**Tabla 2**).

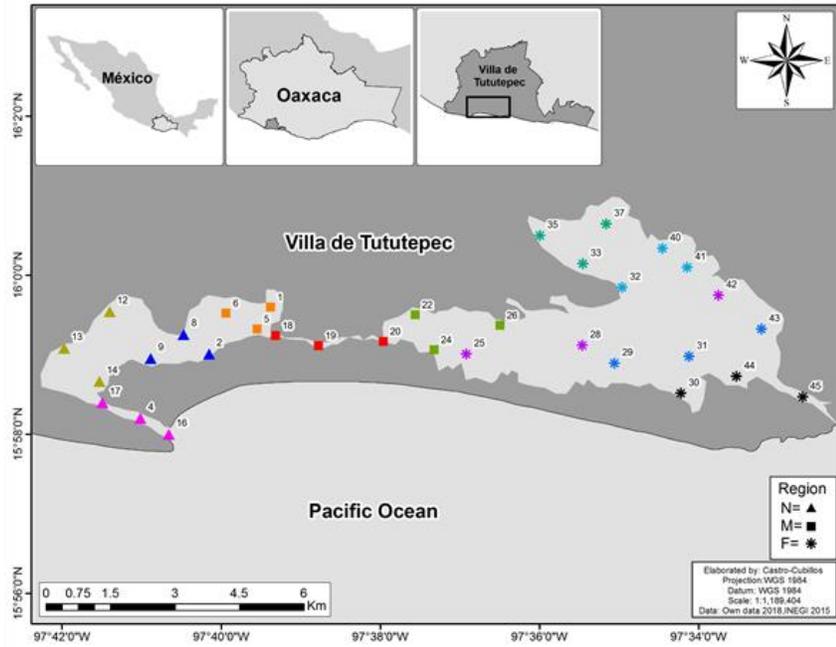
**Tabla 2.** Parámetros fisicoquímicos en el sistema lagunar Chacahua-Pastoría para temporada de lluvias y secas (Esparza y Guerra Mendoza 2010)

Parámetro fisicoquímico	Temporada de lluvias	Temporada de secas
Temperatura (°C)	Chacahua: 29-33.5 Pastoría: 29.5-34.8	Chacahua: 27-34 Pastoría: 29-31
Salinidad	Chacahua: 25-33 Pastoría: 17.74	Chacahua: 25-35 Pastoría: < 25
pH	Chacahua: 8-8.25 Pastoría: 7.25-8	Chacahua: 7.2-8.2 Pastoría: 7.5-8
Oxígeno disuelto (mg/l)	Chacahua: 4.9-8.16 Pastoría: 6.5	Chacahua y Pastoría: 2.5-9.17

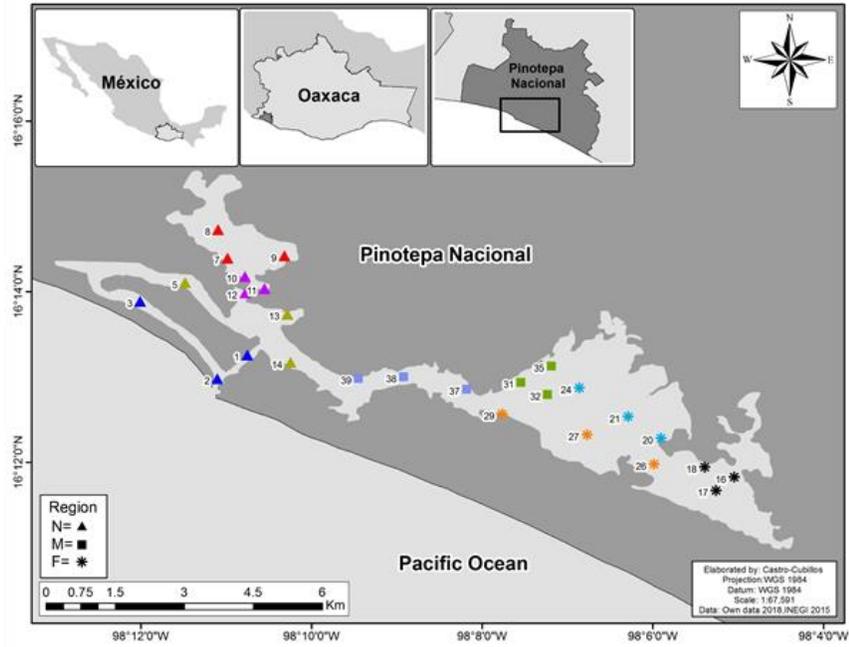
*Sistema lagunar Corralero-Alotengo:* Se encuentra ubicado entre las coordenadas 16°11'-15 y 16° 16' 30'' N y 98° 05' 00'' y 98° 12' 30'' O (Ángel-Pérez *et al.* 2007). Posee una superficie acuática de alrededor de 31 km<sup>2</sup>, se localiza en la parte occidental de la costa de Oaxaca, en el municipio de Pinotepa Nacional. Es el tercer cuerpo lagunar más grande de Oaxaca y se sitúa paralelo a la costa con una longitud aproximada de 17.2 km y una anchura variable de aproximadamente 3.5 km. Se encuentra rodeado por manglares y especies halófitas (Sánchez-Meraz y Martínez-Vega 2000, Zamorano *et al.* 2012).

En este sistema lagunar, la temperatura entre los meses de febrero y mayo se encuentra entre 27.6 °C y 32 °C, de mayo a agosto es constante y en octubre desciende hasta alrededor de 26 °C, posteriormente sube hasta los 30.5 °C y en el mes de febrero vuelve a descender con valores cercanos a los 28 °C. La salinidad por su parte, se encuentra en un rango de 32 a 35 durante todo el año (Sánchez-Meraz y Martínez-Vega 2000).

A.



B.



**Figura 1.** Ubicación de las estaciones de muestreo en el complejo lagunar: A) Chacahua-Pastoría, B) Corralero-Alotengo.

## Capítulo 1

### **Identificación taxonómica tradicional y metabarcoding: alcances y limitaciones en la evaluación de la diversidad de metazoos béticos en Chacahua-Pastoría y Corralero-Alotengo**

#### 1. Introducción

El estudio de la diversidad mundial, tanto terrestre como marina, se ha basado en la identificación biológica de manera morfológica. Sin embargo, la aparición de nuevas técnicas que no se basan en la morfología o que la combinan con otras, ha impulsado el estudio de la diversidad en lugares en los que era prácticamente imposible recuperar organismos intactos y en zonas de difícil acceso. También, ha permitido la identificación de especies crípticas (con características morfológicas similares, pero con composición genética distinta) y la reducción en los tiempos de identificación, lo que permite tener resultados más rápidos y oportunos para la toma de decisiones (Pantó *et al.* 2021). Para un monitoreo más eficiente de la biodiversidad en diferentes ecosistemas es necesario un enfoque de conservación multitaxónico, junto con el uso de herramientas que permitan el monitoreo a gran escala (Park y Razafindratsima 2019). El metacódigo de barras del ADN ambiental (ADNe) permite obtener una gran cantidad de datos para el monitoreo y estudios de caracterización y revelan la estructura y composición espacio-temporal de la comunidad en diferentes sistemas (Taberlet *et al.* 2012, Guardiola *et al.* 2016, Aylagas *et al.* 2018, Wangensteen *et al.* 2018, Mcdevitt *et al.* 2019). Sin embargo, una de las limitaciones que tienen estas técnicas moleculares es que las bases de datos que contienen las secuencias de ADN de los organismos identificados genéticamente hasta el momento no está completa y aunado a esto, la selección del marcador adecuado para la identificación del grupo de interés (Pantó *et al.* 2021).

La biodiversidad de las lagunas tropicales no se ha caracterizado completamente, cuantiosos grupos se han perdido o no son identificables. Por lo tanto, en este contexto, las técnicas moleculares representan una buena forma de identificación y brindan una clara ventaja sobre las tradicionales (Balzano *et al.* 2015). Los sistemas lagunares Chacahua-Pastoría y Corralero-Alotengo, han sido estudiados de forma tradicional durante los últimos años y se ha encontrado una amplia diversidad en lo que a poliquetos, moluscos, crustáceos y peces se refiere (Sánchez-Meraz y Martínez-Vega 2000, Angel-Pérez *et al.* 2007, Martínez-Ramírez *et al.* 2008, Zamorano *et al.* 2010, Bastida-Zavala *et al.* 2013, Sánchez Méndez *et al.* 2015, Chávez-López y Cruz-Gómez 2019). Sin embargo, quedan otros grupos de los cuales no se tiene registro o que se han visto pero no se han podido identificar debido a las limitaciones de las técnicas de identificación antes mencionadas.

### 1.1. Identificación taxonómica tradicional

De acuerdo con el Convenio sobre la Diversidad Biológica (2016), la taxonomía se define como la ciencia que nombra, describe y clasifica organismos, como incluye plantas, animales y microorganismos del planeta (Kotov y Gololobova 2016). Ayuda a reconocer especies y a mapear su distribución basándose en registros de su localidad de origen (Miller *et al.* 2012). Estas asignaciones morfológicas están acompañadas de una terminología específica la cual da el nombre a cada grupo. Se basa en dos principios generales, nominalismo y tipificación. En el primero se establece la existencia de taxones coordinados por niveles, dentro de un nivel estos taxones pueden agruparse o separarse sin afectar su significado taxonómico. Sin embargo, existe una jerarquización de taxones en la cual la familia y el género son uninominales, la especie es binominal y la subespecie es trinominal. Por su parte, la tipificación establece que la asignación de especies debe darse con base en el material estudiado por el autor original, del cual deben existir organismos idénticos (*sintipos*), uno de los cuales debe asignarse como tipo (*holotipo*). Al igual que las especies, los géneros también tienen un tipo definido por una especie y las familias uno definido por un género; así cada categoría taxonómica está definida por un tipo nominal (Alvarado 1966, Kotov y Gololobova 2016).

Tradicionalmente, estas investigaciones taxonómicas se basan en la identificación de rasgos morfológicos de manera profunda y a largo plazo sobre un grupo taxonómico en específico, las cuales suelen ser realizadas por especialistas y llevan bastante tiempo (Sundberg y Arlin 1998, Kotov y Gololobova 2016). Algunas veces se establecen conexiones entre la nomenclatura y las características de los organismos que no son del todo claras, es el caso de las especies cripticas. Las cuales son idénticas en apariencia pero están reproductivamente aisladas y presentan algunas diferencias en cuanto a hábitat, preferencias de hospedador, comportamiento reproductivo, feromonas, estacionalidad, entre otras (Adler 2004). En estos casos, se hace necesaria la implementación de técnicas complementarias a las tradicionales.

### 1.2. Código de barras genético en muestras ambientales: Metabarcoding.

El *barcoding* hace referencia a la metodología por medio de la cual se identifican especies usando fragmentos de ADN estandarizados, es decir, pequeñas partes del genoma encontradas en un grupo amplio de taxa. Los especímenes de los cuales se obtienen las secuencias de ADN, depositadas en una base de datos publica, están bien identificados y se encuentran en una colección de historia natural (Hajibabaei *et al.* 2007, Cristescu 2014). Este método, ha resultado ser bastante eficiente a la hora de identificar especímenes y permite el descubrimiento de especies cripticas o que no se encontraban descritas (Shokralla *et al.* 2014). También, facilita la identificación de especies recién recolectadas en campo y la resolución de ciertos problemas como la eliminación de especies hermanas o que no

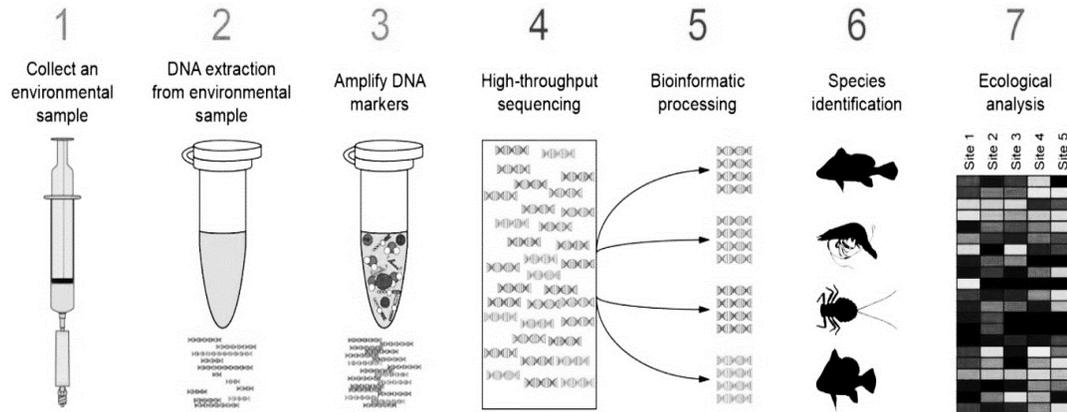
pueden ser diferenciadas por caracteres morfológicos (Miller *et al.* 2016). El primer gen en ser usado como código de barras para eucariotas fue el de la citocromo C oxidasa I (COI), de este se usa una región de 648 pb (Hebert *et al.* 2003). Las secuencias de organismos que han sido debidamente identificados y que tienen una contraparte física, es decir el organismo en resguardo, se encuentran depositadas en la base de datos del código de barras de la vida (BOLD: Barcode of Life Database) (Ratnasingham y Hebert 2007a, Blaxter 2016, Miller *et al.* 2016).

Por su parte, el *metabarcoding* es un método de identificación biológica, basado en la secuenciación de alto rendimiento de múltiples especies en una muestra compleja, posiblemente degradada o de la recolección a gran escala de muestras. Esta técnica se usa en mayor medida con comunidades microbianas, pero también es aplicable en medio y macro fauna (Cristescu 2014). En la determinación de la biodiversidad se suele emplear esta metodología con muestras de ADN del ambiente o ADNe (environmental DNA) (**Figura 2**), el cual es material genético obtenido directamente de muestras ambientales como suelo, sedimento, agua, entre otros, sin algún signo obvio de la fuente del material (Thomsen y Willerslev 2015). Con esta técnica se identifican OTUs y MOTUs, los cuales hacen referencia a Unidad Taxonómica Operacional (OTU) y a Unidades Taxonómicas Operacionales Moleculares (MOTU). Un OTU, puede referirse a un individuo o a un nivel taxonómico, el cual ha sido agrupado por similitud. En el código de barras metagenómico, se emplean los MOTUs, las cuales se identifican por medio de la identidad de las secuencias de ADN. La identidad de la secuencia de un organismo, no necesariamente tiene que corresponder con la identidad de OTU dada por otros modelos como los morfológicos, por ejemplo (He *et al.* 2015).

Algunos estudios basados en código de barras en general y en muestras ambientales, usan un enfoque diferente al de los OTUs y MOTUs, los cuales utilizan un umbral de similitud entre secuencias para agrupar lecturas, generalmente del 3 % lo que significa que estas tienen un 97 % de similitud de secuencia. Por lo tanto, cuando un grupo de secuencias tiene un 97 % o más de similitud, se le asigna un OTU específico. En el caso de los ASVs (Variantes de Secuencia de Amplicón), otro enfoque, se toma en cuenta la similitud entre secuencias y evalúa cambios desde un nucleótido. Las ASVs, son secuencias exactas generadas sin agrupaciones ni bases de datos de referencia y se pueden comparar fácilmente entre estudios si se usa la misma región del gen (García-López *et al.* 2021). Según Cristescu (2014), la correcta aplicación de este método depende de una serie de pasos predefinidos, dentro de los cuales se destacan:

- 1) Diseño del muestreo: aplicación de réplicas para obtener la diversidad de la comunidad.

- 2) Diseño experimental: requiere de réplicas técnicas, extracciones de ADN independientes, al igual que amplificaciones de PCRs. También es necesario el uso de marcadores adecuados y pruebas estadísticas específicas.
- 3) Validación del método (pipeline) bioinformático para eliminar el ruido y agrupar las secuencias en OTUs: implementación de algoritmos para evaluar la calidad de las secuencias, eliminar el ruido, eliminar las quimeras y selección de OTUs. Uso de distancias apropiadas para definir la asignación de especies.
- 4) Interpretación sólida de los datos: validación con censos de diversidad basada en asignaciones taxonómicas tradicionales. Validación contra marcadores independientes.
- 5) Transferibilidad y comparabilidad de datos: bibliotecas de ADN de referencia e inclusión de secuencias obtenidas en bases de datos.



**Figura 2.** Análisis de muestras ambientales a partir de “metabarcodeo”. Tomado de: naturemetrics.co.uk.

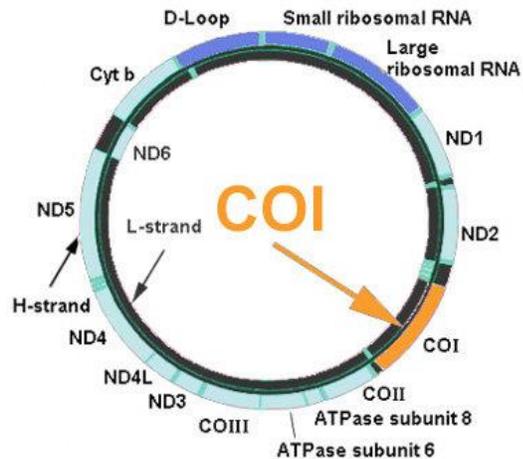
### 1.2.1. Marcadores genéticos: COI, 18S

#### *Gen mitocondrial citocromo oxidasa C subunidad I (COI):*

El ADN mitocondrial (ADNmt) se detectó en 1963, se encontró asociado a proteínas y lípidos en la matriz mitocondrial; su longitud total es de aproximadamente 17000 pb y se encuentra en la mayoría de las células eucariotas. Debido a su herencia materna, su rápida tasa de mutación y la falta de recombinación molecular, es usado en estudios poblacionales y filogenéticos en diferentes grupos taxonómicos (Deepak y Mahadevan 2020). En humanos, el ADNmt contiene 37 genes que codifican

para dos rRNA (RNA ribosomal), 22 tRNA (RNA de transferencia) y 13 polipéptidos (Taanman *et al.* 1999).

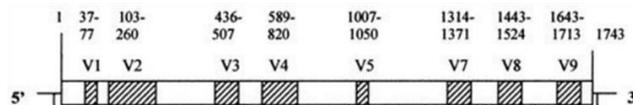
Dentro del genoma mitocondrial, donde se encuentra el núcleo de la producción de energía en las células, se puede hallar un fragmento de 658 pb correspondiente a la sub unidad 1 del gen de la citocromo oxidasa (cox1 o COI), (**Figura 3**) (Pentinsaari *et al.* 2016).



**Figura 3.** Posición del gen COI en el genoma mitocondrial. Tomado de Trivedi *et al.* 2016.

*Gen ribosomal 18S:*

El gen ribosomal 18S tiene atributos similares a los del gen 16S en procariontas, hace parte de la subunidad pequeña del RNA ribosomal en los ribosomas citoplasmáticos. Los genes que codifican para el 18SrRNA son conocidos también como 18SrDNA. Este gen es usado frecuentemente en estudios filogenéticos y de diversidad ambiental (Sorof Uddin y Cheng 2015). El gen 18S se divide en 9 regiones que van desde la V1 hasta la V9 (**Figura 4**). La región V4, es la región variable más grande en eucariotas y con la V9 son las más empleadas en estudios de la biodiversidad (Hadziavdic *et al.* 2014).



**Figura 4.** Esquema del gen ribosomal 18SrRNA. Las franjas negras corresponden a las regiones polimórficas V1 a V9. Tomado de Machouart-Dubach *et al.* 2002.

## 2. Antecedentes

Se han realizado algunos estudios que comparan la taxonomía tradicional basada en morfología, contra la taxonomía basada en marcadores moleculares. Aunque estos no se han llevado a cabo en México, sí han tenido como objeto organismos marinos en sedimentos (Avó *et al.* 2017, Pantó *et al.* 2021), peces en la columna de agua (Azevedo *et al.* 2020) y el monitoreo de los mismos (Polanco Fernández *et al.* 2020b). En cuanto al uso de marcadores moleculares, se ha probado la combinación de distintos genes, de diferentes regiones de los mismos y de distintos primers para incrementar la tasa de identificación de los MOTUs (Stoeck *et al.* 2010a, Machida y Knowlton 2012, Günther *et al.* 2018, Fonseca *et al.* 2022).

## 3. Hipótesis

La diversidad biológica de la zona costera del Pacífico oaxaqueño se estima como amplia en términos de composición y abundancia de especies. Sin embargo, el conocimiento de la presencia de ciertos grupos como los metazoos se limita a filos específicos y se deja de lado a otros de similar importancia ecológica debido al alcance limitado de las técnicas de identificación utilizadas. Se espera que, el uso de técnicas de identificación biológica de taxonomía tradicional y código de barras metagenómico se complementen y evidencien la presencia de otros grupos de metazoos distintos a los anélidos, moluscos y crustáceos, que se describen en los distintos trabajos realizados en la región hasta el momento. También se espera que, con metabarcoding se identifiquen más OTUs /MOTUs con 95 % a 100 % de identidad que con la taxonomía tradicional.

## 4. Objetivos

### 4.1 Objetivo general

Evaluar la eficacia de las técnicas de identificación taxonómica tradicional y metabarcoding en la evaluación de la riqueza y abundancia de filos de metazoos en muestras de sedimentos lagunares costeros de los sistemas lagunares Corralero-Alotengo y Chacahua-Pastoría.

### 4.2 Objetivos particulares

1. Realizar la identificación de OTUs, a partir de taxonomía tradicional, de metazoos bénticos en muestras de sedimento de los sistemas lagunares costeros Corralero-Alotengo y Chacahua-Pastoría.
2. Realizar la identificación de MOTUs, a partir de código de barras metagenómico, de metazoos bénticos en muestras de sedimento de los sistemas lagunares costeros Corralero-Alotengo y Chacahua-Pastoría.
3. Identificar por cada filo el marcador más efectivo en la identificación de metazoos bénticos en los sistemas lagunares costeros Corralero-Alotengo y Chacahua-Pastoría.

4. Comparar la eficacia de cada técnica en identificación de OTUs/MOTUs, a nivel de especie y género, de metazoos bénticos en muestras de sedimento de los sistemas lagunares costeros Corralero-Alotengo y Chacahua-Pastoría.

## 5. Materiales y métodos

### 5.1 Procesamiento de muestras

Ubicación de las estaciones y tipo de muestreo. Ver capítulo introductorio, **Figura 1**. El material biológico se obtuvo de muestras de sedimento de los sistemas lagunares Chacahua-Pastoría y Corralero-Alotengo. Para cada sistema lagunar se tomaron muestras en época de secas y en época de lluvias, 120 en total, 33 para Chacahua-Pastoría y 27 para Corralero-Alotengo; las estaciones se distribuyeron de tal forma que cubrieran la mayor área posible. Las muestras de sedimento de cada una de las lagunas se tomaron con dragas de 2.4 litros de volumen, tipo Petit Ponar®. Lo anterior con el fin de recolectar la macro y meio fauna encontrada en las primeras capas del sedimento. De cada punto de muestreo se tomaron dos dragas de sedimento, una para *identificación taxonómica tradicional* y otra para identificación mediante *metabarcoding*.

*Taxonomía tradicional:* Cada muestra se tamizó en su totalidad a través de tamices de luz de malla de 500  $\mu\text{m}$  y 1000  $\mu\text{m}$ , posteriormente se lavaron con agua corriente para quitar el exceso de materia orgánica. Luego, el material biológico retenido en cada tamiz se preservó en alcohol etílico al 96 % y se separó en distintos grupos taxonómicos (crustáceos, poliquetos, moluscos y otros invertebrados), con la ayuda de un microscopio estereoscópico (Zeiss SteREO Discovery V.8) y equipo de disección.

*Metabarcoding:* Las muestras de sedimento para análisis molecular fueron puestas en bolsas Ziploc® con hielo hasta su traslado al laboratorio, donde fueron homogenizadas con una licuadora de cocina. El homogeneizador fue lavado con hipoclorito y limpiado con alcohol al 90 % antes del procesamiento de la siguiente muestra. Posteriormente, se tomaron submuestras de la muestra homogeneizada y se guardaron en alcohol al 90 % a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , hasta el momento de realizar las extracciones de DNA.

### 5.2 Identificación taxonómica tradicional de las muestras usadas

Cada uno de los individuos de los distintos grupos taxonómicos fue identificado al mínimo taxón posible, usando guías especializadas. En el caso de los moluscos, se seleccionaron los ejemplares con mejor estado de conservación (organismos completos, no erosionados y con tallas  $\leq 0.05\text{ mm}$ ), puesto que se usaron las características de las conchas. La identificación de gasterópodos se hizo siguiendo el criterio de Keen (1971) y Keen y Coan (1974) y Bouchet, P. *et al.* (2017). Para los bivalvos se siguió el criterio de Coan y Valentich-Scott (2012) y para los escafópodos Steiner y Kabat (2001) y

Scarabino y Scarabino (2010). Los ejemplares identificados, fueron ingresados a la Colección de Moluscos del Museo de Historia Natural de la Universidad del Mar (CMMHNUMAR, Clave: OAX-CC-246-2011).

Para la identificación taxonómica de los poliquetos se usaron las claves de identificación disponibles en el libro Poliquetos (Annelida: Polychaeta) de México y América Tropical (De León González *et al.* 2009). En el caso de los crustáceos y demás invertebrados se usaron guías de identificación de la FAO (Fischer *et al.* 1995) y otras especializadas (Darwin 1854, Coan y Valentich-Scott 2014).

#### 5.4 Identificación a partir de metabarcoding: Comparación entre marcadores (COI vs 18S)

##### 5.4.1.Extracción de DNA y secuenciación

Para la extracción de DNA se usaron 10 gramos de sedimento de la muestra previamente homogenizada y se extrajo el DNA con el kit PowerMax® Soil DNA Isolation Kit ® de QIAGEN. La concentración de DNA de cada muestra fue medida con un Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) y corroborada en un gel de agarosa al 1 %.

Mediante PCR se amplificaron las regiones V4 y V9 del gen 18S con los cebadores E1009R y E572F (Comeau *et al.* 2011, Lemay *et al.* 2018), 1391F y EUKB (Stoeck *et al.* 2010b) respectivamente. Para el gen COI, se utilizaron los cebadores jgHCO21 y mlCOIintF-XT (Wangenstein *et al.* 2018). Las amplificaciones de las dos regiones del gen 18S se hicieron a un volumen final de 25 µl, con 0.125 de ADN polimerasa Flexi GoTaq G2 (Promega) 5 U / µl, 0.5 µl de 0.2 mM de cada cebador, 5 µl de buffer 1X, 2 µl de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 µl de dNTPs 10 mM y 1.5 µl de ADN. Para COI, el volumen final también fue de 25 µl, pero se agregaron 3 µl de MgCl<sub>2</sub> y 2 µl de ADN. Las condiciones de PCR fueron diferentes para cada par de cebadores. Los productos de PCR obtenidos para cada uno de los marcadores fueron observados en un gel de agarosa al 2 %.

Para la generación de las bibliotecas con los productos de PCR obtenidos de los tres marcadores se siguió el protocolo de la casa *Illumina* para el gen 16S. En este paso se agregaron los adaptadores *illumina* Nextera XT para etiquetar y diferenciar las muestras (*Illumina* 2013). Posteriormente se secuenciaron las bibliotecas en un secuenciador MiSeq de *Illumina*, en el formato 2 x 300 (Caporaso *et al.* 2012)

##### 5.4.2.Análisis bioinformático

Para el análisis de las secuencias se usó el programa QIIME 1.9.1 y USEARCH 8.1. Para unir las lecturas crudas (forward y reverse), se usó el comando *fastq\_mergepairs*. Los primers se retiraron

con *fastq\_filter*, con este comando también se filtraron las lecturas por calidad. Se descartaron secuencias con longitudes menores a 100 pb para la región V9 del gen 18S, 370 pb para la región V4 del gen 18S y 300 pb para el gen COI. Posteriormente, se eliminaron las secuencias que no presentaban duplicados, se ordenaron y se agruparon los MOTUs con *cluster\_otus*.

En la detección de quimeras se usó UCHIME y en este el comando *uchime\_ref*, con la base de datos Silva (versión 132) (Quast *et al.* 2013) para 18S. Para COI se usó BLAST en una base de datos creada a partir de secuencias COI del genbank (consultado 17/05/2018). Estas secuencias se filtraron para obtener fragmentos de COI completos y fragmentos parciales > 300 pb, que no contuviesen más de dos N consecutivas. De esta base de datos también se eliminaron secuencias idénticas y se agruparon al 99 % usando VSEARCH, antes de organizarlos para procesarse en QIIME. Finalmente, los MOTUs se verificaron de forma individual en la base de datos BOLD (Ratnasingham y Hebert 2007). La asignación taxonómica se hizo con UCLUST, con una similitud de 0.6. Finalmente se agregó la asignación taxonómica y los metadatos a la tabla de MOTUs.

Estos resultados se guardaron en forma de matriz de datos en Excel para su posterior análisis estadístico. Para el análisis de los metazoos se extrajeron los filos correspondientes a este grupo de la matriz de abundancia de MOTUs. La identificación taxonómica para COI se validó solamente entre 97 y 100 % de identidad para el nivel de especie, mientras que para 18S, regiones V4 y V9, solamente con el 100 % de identidad (Wangenstein *et al.* 2018, Schroeder *et al.* 2020). A nivel de género entre el 90 y el 97 %, para COI y entre el 90 y el 99 % para los dos marcadores 18S; a nivel de familia entre el 85 y el 90 % para los dos marcadores (Polanco Fernández *et al.* 2020a).

#### 5.5. Evaluación de los alcances y limitaciones de las dos técnicas (categoría taxonómica)

Para evaluar las diferencias en los grupos identificados con cada técnica, se hizo una matriz de datos con la riqueza de MOTUs general, es decir que aquí se reunieron los MOTUs de todos los puntos de muestreo por laguna y por marcador. Luego, con esta matriz se corrió la prueba de *Kruskal-Wallis* para pruebas no pareadas, con el fin de determinar si existen diferencias en las riquezas de MOTUs entre las técnicas y si estas son significativas (Azevedo *et al.* 2020). Cabe destacar que primero se corroboró que los datos fueran normales con la prueba de *Lilliefors (Kolmogorov-Smirnov)* usando la paquetería Nortest versión 1.0-4 en R.

Por su parte, el análisis SIMPER se hizo con la matriz de riqueza de secuencias de las familias, se hizo un análisis SIMPER, en PRIMER v6, para ver la contribución a la similitud/disimilitud de cada una de las múltiples familias con cada marcador.

## 6. Resultados

### 6.1. Identificación taxonómica tradicional (morfológica)

La evaluación macro y microscópica de cada una de las dragas de sedimento resultó en la identificación de 112 OTUs, representados en 11 filos, 9 clases, 50 familias, 64 géneros y 100 especies. Los filos con mayor número de OTUs fueron Annelida (44), Mollusca (37) y Artrópoda (22) (Anexo 1). Para Chacahua-Pastoría, los filos dominantes fueron Annelida (30), Mollusca (24) y Artrópoda (13); en Corralero-Alotengo los filos con mayor número de OTUs fueron Mollusca (31), Annelida (27) y Artrópoda (13) (**Tabla 3**).

**Tabla 3.** Cantidad de OTUs identificados por taxonomía tradicional por filo en cada sistema lagunar.

Filo	Chacahua-Pastoría	Corralero-Alotengo	No. OTUs totales
Annelida	30	27	44
Artrópoda	13	13	22
Bryozoa	1	1	1
Cnidaria	1	0	1
Chordata	2	1	2
Echinodermata	0	1	1
Foraminifera	1	1	1
Mollusca	24	31	37
Nemertea	1	1	1
Phoronida	0	1	1
Sipunculida	0	1	1
Total general	<b>73</b>	<b>78</b>	<b>112</b>

### 6.2. Identificación a partir de metabarcoding: Comparación entre marcadores (COI vs 18S)

Para los tres marcadores empleados se obtuvo un total de 9,232,815 lecturas crudas, después de filtrarlas por calidad este número se redujo a 3,200,001 de secuencias, de estas se delimitaron 14,547 MOTUs y se asignaron 3,139 MOTUs (**Tabla 4**).

Para COI, se encontraron 14 filos, 78 géneros y 94 especies (**Tabla 5**). En el caso de los marcadores del gen 18S, para V4 se encontraron 19 filos, 177 familias (**Tabla 6**), 252 géneros y 295 especies y para V9 se identificaron 22 filos, 239 familias, 309 géneros y 334 especies (**Tabla 7**).

**Tabla 4.** Cantidad de secuencias y MOTUs asignados para los dos sistemas lagunares en las dos temporadas analizadas, con tres marcadores distintos (COI, 18S-V4 y 18S-V9).

<b>Marcador</b>	<b>Lecturas crudas</b>	<b>Lecturas limpias</b>	<b>MOTUs delimitados</b>	<b>MOTUs asignados</b>
<b>COI</b>	1758686	319457	1182	764
<b>18S-V4</b>	2248247	1576493	3410	797
<b>18S-V9</b>	5225882	1304051	9955	1578
<b>Total</b>	<b>9232815</b>	<b>3200001</b>	<b>14547</b>	<b>3139</b>

**Tabla 5.** Cantidad de MOTUs identificados con taxonomía molecular con el gen COI por filo en cada sistema lagunar.

Filo	Chacahua-Pastoría	Corralero-Alotengo	No. MOTUS totales
Annelida	11	10	13
Arthropoda	23	31	43
Chaetognatha	1	0	1
Chordata	5	8	8
Cnidaria	5	12	12
Echinodermata	0	1	1
Kinorhyncha	0	1	1
Mollusca	11	6	12
Nematoda	6	6	8
Nemertea	1	1	2
Platyhelminthes	0	1	1
Porifera	11	11	15
Rotifera	5	5	5
Sipuncula	2	0	2
Total general	81	93	124

**Tabla 6.** Cantidad de MOTUs identificados con taxonomía molecular con el gen 18S-V4 por filo en cada sistema lagunar.

Filo	Chacahua-Pastoría	Corralero-Alotengo	No. MOTUS totales
Acanthocephala	2	1	2
Annelida	57	41	66
Arthropoda	56	42	68
Bryozoa	5	2	5
Chordata	19	12	21
Cnidaria	18	13	21
Ctenophora	1	0	1
Echinodermata	0	1	1
Entoprocta	1	1	1
Gastrotricha	18	13	23
Gnathostomulida	0	1	1
Kinorhyncha	1	0	1
Mollusca	19	18	24
Nematoda	84	64	97
Nemertea	7	8	12
Platyhelminthes	44	31	57
Porifera	4	2	4
Rotifera	7	6	7
Sipuncula	2	2	2
Total general	345	258	414

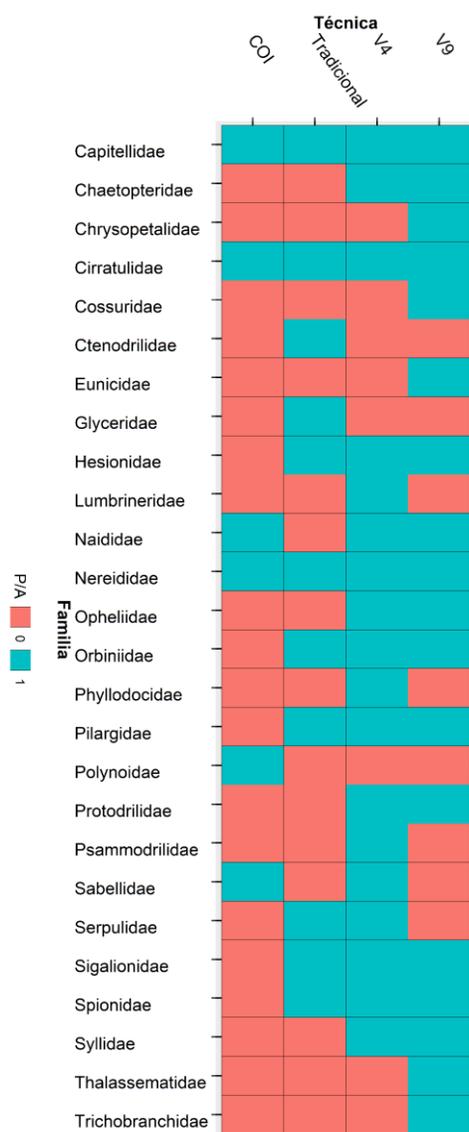
**Tabla 7.** Cantidad de MOTUs identificados con taxonomía molecular con el gen 18S-V9 por filo en cada sistema lagunar.

Filo	Chacahua-Pastoría	Corralero-Alotengo	No. MOTUS totales
Annelida	33	39	48
Arthropoda	57	60	86
Brachiopoda	1	1	1
Bryozoa	7	3	7
Chordata	13	15	18
Cnidaria	11	17	19
Ctenophora	1	2	2
Echinodermata	1	1	1
Foraminifera	0	0	1
Gastrotricha	13	15	18
Gnathostomulida	1	2	2
Mollusca	17	23	27
Nematoda	31	42	49
Nemertea	8	11	14
Phoronida	0	1	1
Platyhelminthes	44	43	62
Polychaeta	10	16	21
Porifera	5	6	8
Rotifera	6	8	9
Sipuncula	1	2	2
Tardigrada	3	3	3
Xenacoelomorpha	3	3	3
Total general	266	313	402

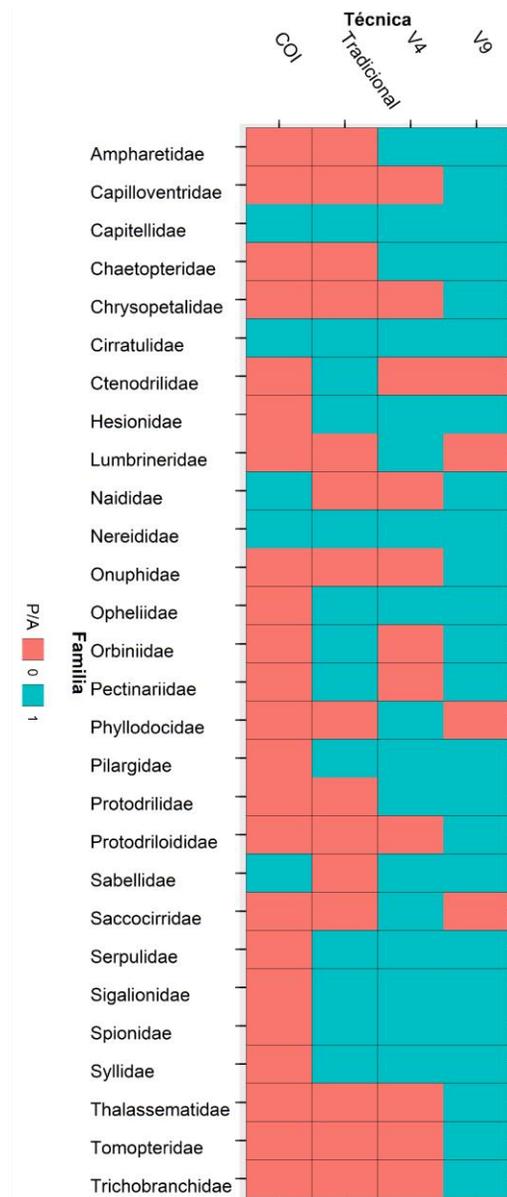
### 6.3. Comparación de alcances y limitaciones de las dos técnicas (categoría taxonómica familia)

Para el sistema lagunar Chacahua-Pastoría fueron identificadas con morfología un total de 11 familias de anélidos, de estas 9 (82 %) fueron identificadas con alguno de los tres marcadores genéticos evaluados. De estas familias detectadas con morfología y marcadores genéticos, 9 se encontraron con V4, 8 con V9 y 3 con COI. Por otro lado, con los marcadores genéticos se encontraron 15 familias que con morfología no se detectaron. En el caso de Corralero-Alotengo, se detectaron 13 familias con taxonomía tradicional, de estas 12 (92 %) se encontraron con alguno de los tres marcadores analizados. De estas familias detectadas con morfología y marcadores genéticos, 10 se encontraron con V4, 12 con V9 y 3 con COI; con los marcadores genéticos se encontraron 15 familias que con morfología no se detectaron.

Se encontraron diferencias significativas en la riqueza de MOTUs de anélidos entre los marcadores tanto en Chacahua-Pastoría (Kruskal-Wallis chi-squared = 21.021, df = 3, p = 0.000104) como en Corralero-Alotengo (Kruskal-Wallis chi-squared = 21.021, df = 3, p = 0.000104). Según el análisis SIMPER, la estructura en la composición de familias de anélidos dada por la identificación con taxonomía tradicional versus los marcadores genéticos en el sistema lagunar Chacahua-Pastoría fue dada por las familias Naididae (11.31 %), Orbiniidae (10.90 %), Capitellidae (10.14 %), Spionidae (9.58 %) y Hesionidae (8.91%) (**Figura 5**). Por su parte, en Corralero-Alotengo fue impulsada principalmente por las familias Spionidae (10.81 %), Orbiniidae (9.14 %), Protodrilidae (8.61 %), Hesionidae (8.18 %), Capitellidae (8.04 %) y Syllidae (5.97 %) (**Figura 6**).



**Figura 5.** Heat-map que representa la presencia-ausencia (P/A) de MOTUs y OTUs de familias de anélidos en el sistema lagunar Chacahua-Pastoría.



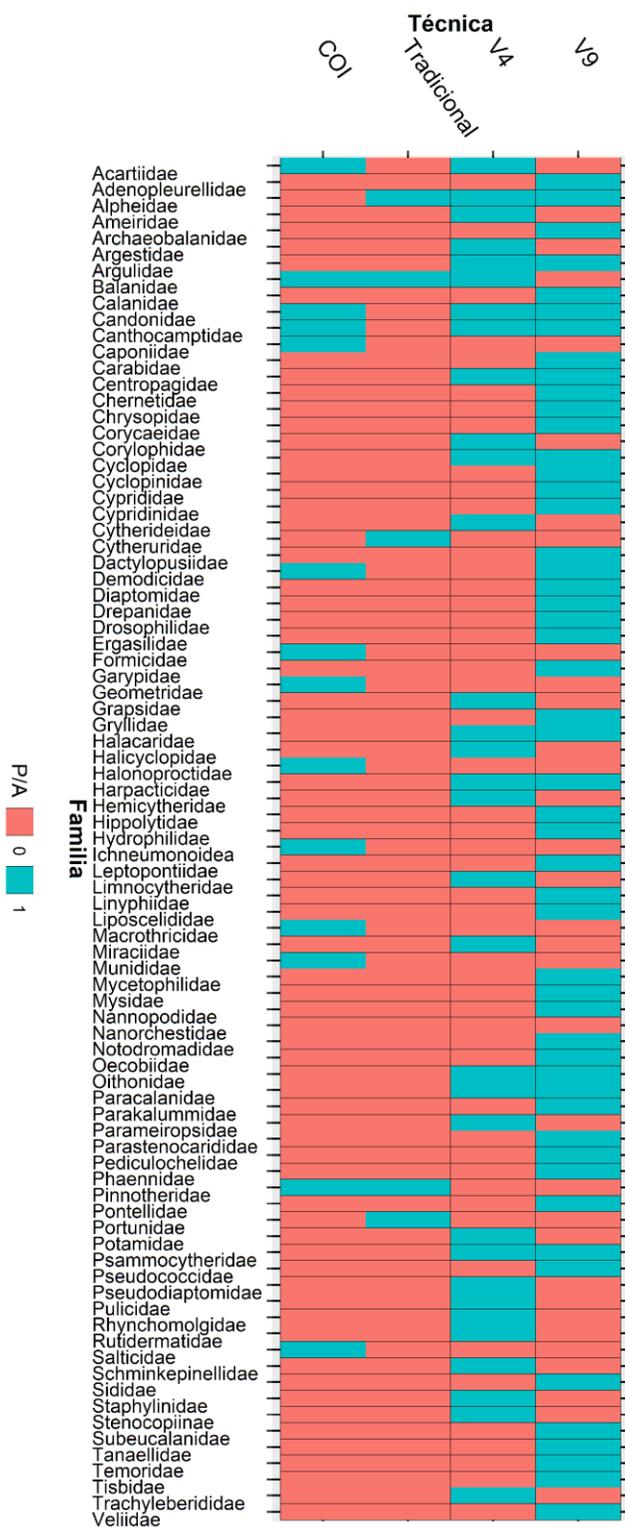
**Figura 6.** Heat-map que representa la presencia-ausencia (P/A) de MOTUs y OTUs de familias de anélidos en el sistema lagunar Corralero-Alotengo.

En el caso de los artrópodos, para Chacahua-Pastoría se detectaron 5 familias con taxonomía tradicional, de estas 3 se detectaron con los marcadores genéticos. De estas familias, 2 se detectaron con V4, 2 con V9 y 2 con COI. Con los marcadores genéticos se detectaron 79 familias que no se encontraron con taxonomía tradicional. Para Corralero-Alotengo, se detectaron 4 familias con morfología y de estas 3 con marcadores moleculares; de estas una se detectó con V4, una con V9 y una con COI; se detectaron 88 familias con marcadores genéticos que no se habían detectado con taxonomía tradicional.

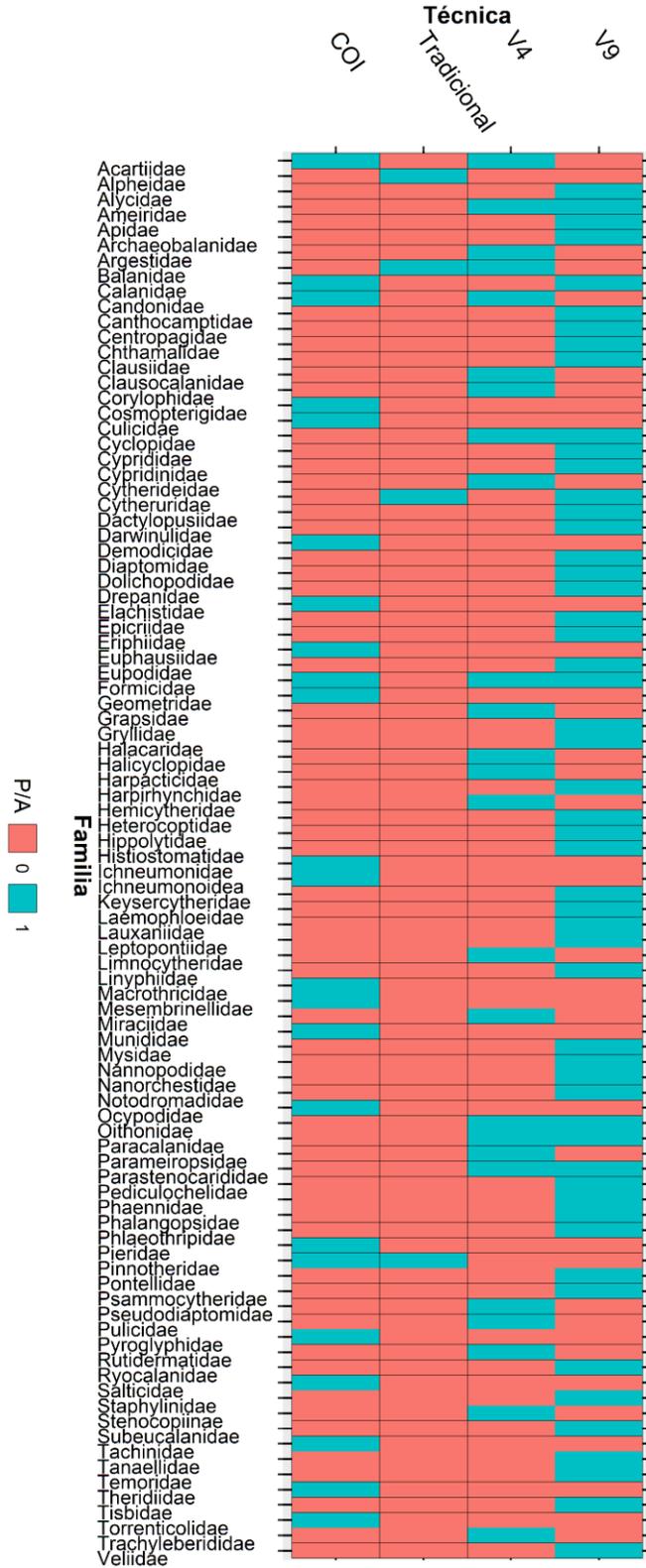
Se encontraron diferencias significativas en la riqueza de MOTUs de artrópodos entre los marcadores tanto en Chacahua-Pastoría (Kruskal-Wallis chi-squared = 60.482, df = 3, p = 4.638e-13) y Corralero-Alotengo (Kruskal-Wallis chi-squared = 60.482, df = 3, p-value = 4.638e-13). El análisis SIMPER mostró que en el caso de los artrópodos en Chacahua-Pastoría, la diferenciación en la composición de familias entre la taxonomía tradicional y los marcadores moleculares fue dada por Geometridae (10.86 %), Cytheruridae (8.51 %), Limnocytheridae (5.97 %), Macrothricidae (3.26 %), Cyclopidae (3.12 %), Paracalanidae (3.12 %), Candonidae (2.67 %), Argestidae (2.17 %), Miraciidae (2.17 %), Canthocamptidae (2.13 %), Portunidae (2.13 %), Halacaridae (1.63 %) (**Figura 7**). En Corralero-Alotengo, las familias responsables de esta diferenciación fueron Geometridae (8.23 %), Balanidae (6.4 %), Paracalanidae (4.66 %), Limnocytheridae (4.08 %), Alpheidae (3.88 %), Cyclopidae (3.11 %), Cytheruridae (3.01 %), Macrothricidae (2.47 %), Ameiridae (2.23 %), Oithonidae (2.23 %), Miraciidae (2.04 %), Stenocopiinae (2.04 %), Formicidae (1.94 %), Calanidae (1.7 %) y Acartiidae (1.5 %) (**Figura 8**).

En el caso de los moluscos 23 familias se detectaron con taxonomía tradicional para Chacahua-Pastoría, de estas 8 también fueron detectadas con los marcadores moleculares, 4 con V4, 6 con V9 y ninguna con COI. Con los marcadores moleculares se detectaron 21 familias que no se habían detectado con taxonomía tradicional. Para Corralero-Alotengo, se encontraron 23 familias con taxonomía tradicional y de estas también se detectaron 8 por marcadores genéticos, de estos 4 con V4, 7 con V9 y ninguna con COI. Con los marcadores moleculares se detectaron 21 familias que no se habían detectado con taxonomía tradicional.

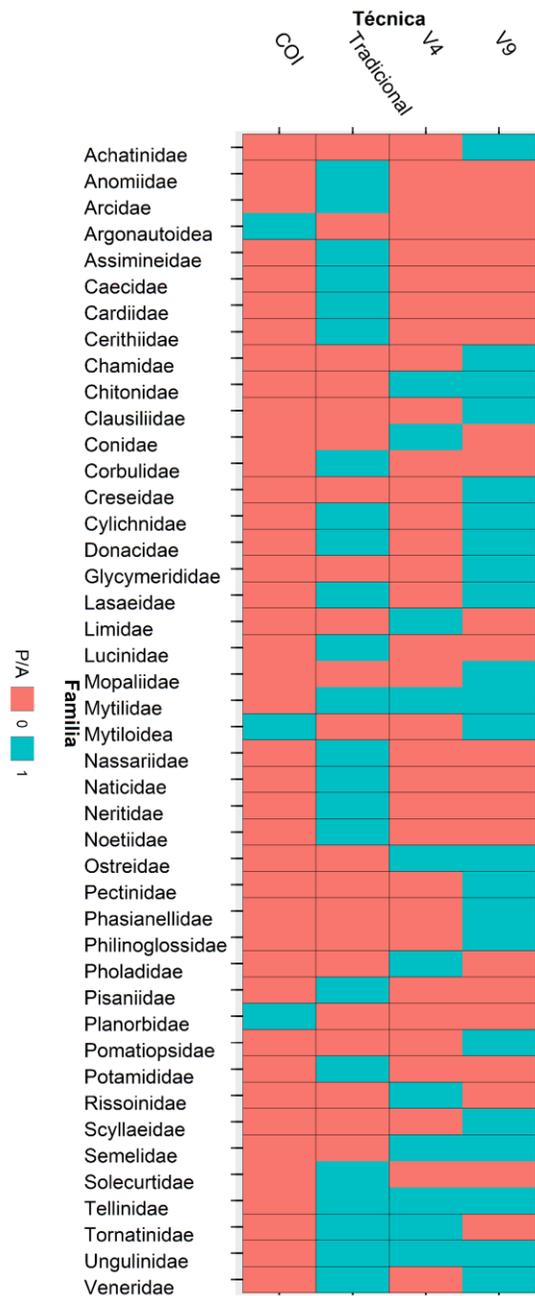
Se encontraron diferencias significativas en la riqueza de MOTUs de moluscos entre los marcadores tanto en Chacahua-Pastoría (Kruskal-Wallis chi-squared = 10.96, df = 3, p = 0.01194) como en Corralero-Alotengo (Kruskal-Wallis chi-squared = 23.148, df = 3, p = 3.761e-05). Según el análisis SIMPER, la diferencia en la estructura de la composición de familias de moluscos dada por la identificación con taxonomía tradicional versus los marcadores genéticos en el sistema lagunar Chacahua-Pastoría fue dada por las familias Mytiloidea (6.14 %), Cerithiidae (5.77 %), Pisaniidae (5.77 %), Mytilidae (5.59 %), Solecurtidae (4.63 %), Naticidae (4.03 %), Veneridae (4.03 %), Semelidae (3.66 %), Assimineidae (2.89 %), Caecidae (2.89 %) y Cerithiopsidae (2.89 %) (**Figura 9**). Para Corralero-Alotengo, las familias responsables de la diferenciación por técnica fueron Mytilidae (10.02 %), Caecidae (9.63 %), Nassariidae (7.22 %), Mytiloidea (5.27 %), Cerithiidae (4.81 %), Pisaniidae (4.81 %), Solecurtidae (4.81 %) y Anomiidae (2.41 %) (**Figura 10**).



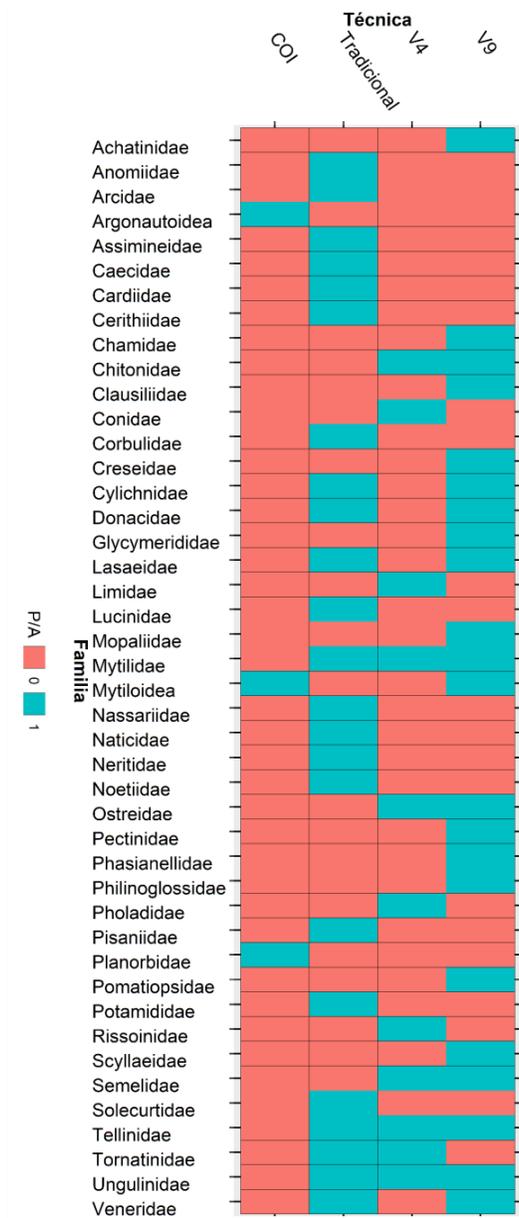
**Figura 7.** Heat-map que representa la presencia (1) -ausencia (0) (P/A) de MOTUs y OTUs de familias de artrópodos en el sistema lagunar Chacahua-Pastoría.



**Figura 8.** Heat-map que representa la presencia-ausencia (P/A) de MOTUs y OTUs de familias de artrópodos en el sistema lagunar Corralero-Alotengo.



**Figura 9.** Heat-map que representa la presencia-ausencia (P/A) de MOTUs y OTUs de familias de moluscos en el sistema lagunar Chacahua-Pastoría.



**Figura 10.** Heat-map que representa la presencia-ausencia (P/A) de MOTUs y OTUs de familias de moluscos en el sistema lagunar Corralero-Alotengo.

7. Discusión de resultados

En el presente estudio, la comparación de métodos de identificación biológica por morfología y por marcadores moleculares se restringió a tres filos de animales, estos fueron Annelida, Arthropoda y Mollusca; lo anterior debido a que para la parte morfológica se contó con la experticia de taxónomos para estos grupos. Esto representa una de las limitaciones de las técnicas de identificación tradicional, las cuales para su desarrollo requieren de expertos en determinados grupos, los cuales muchas veces

se limitan a un filo, clase, orden, familia o incluso género específico (Sundberg y Arlin 1998, Kotov y Gololobova 2016). Además de esto, el tiempo de identificación de las muestras se puede extender a meses o años en comparación con los métodos moleculares como el código de barras metagenómico, debido a que requieren de la revisión de números elevados de especímenes por muestras y de la evaluación de características específicas de identificación que requieren un ojo entrenado.

En la identificación con taxonomía tradicional se detectaron 112 OTUs, mientras que para COI se hallaron 124 MOTUs, 414 MOTUs con 18S-V4 y 402 MOTUs con 18S-V9. Basándose en la cantidad de taxones detectados, los marcadores moleculares mostraron ser más efectivos que la morfología; esto puede deberse a que en algunos grupos los estadios de desarrollo inicial, como larvas y juveniles, resultan difíciles de identificar por su morfología, mientras que con su DNA suele ser menos complicado (Schroeder *et al.* 2020); también a la presencia de organismos incompletos para los cuales no se cuenta con los apéndices o caracteres morfológicos completos que permitan su identificación morfológica. Aunque, la similitud en la composición de la fauna entre las muestras identificadas con técnicas tradicionales y las moleculares resultó ser baja, el código de barras metagenómico ha demostrado en otros estudios, ser sensible para el monitoreo a largo plazo debido a que puede replicar patrones ecológicos en varios años en sedimentos (Basset *et al.* 2022, Castro-Cubillos *et al.* 2022) y en la columna de agua (Schroeder *et al.* 2020).

Los marcadores moleculares aquí empleados lograron detectar la presencia de otros filos, además de los identificados con taxonomía tradicional, los cuales fueron Acanthocephala, Brachiopoda, Ctenophora, Entoprocta, Gastrochida, Gnathostomulida, Kinorhyncha, Nematoda, Platyhelminthes, Porifera, Rotifera, Tardigrada y Xenacoelomorpha. Lo anterior se logró con la combinación de tres marcadores moleculares diferentes, COI y 18S región V4 y región V9, lo que permitió la detección de más grupos, como se sugiere en otros estudios donde se combinan genes mitocondriales con genes nucleares, por ejemplo (Coward *et al.* 2015, Günther *et al.* 2018, Zhang *et al.* 2018, Liu y Zhang 2021). Cabe resaltar que, aunque COI es el marcador usado para metazoos por excelencia, los pertenecientes al gen 18S usados en protistas han demostrado la coamplificación de taxones de metazoos (Di Capua *et al.* 2021, Fonseca *et al.* 2022). En el meiobentos, COI y 18S han demostrado una estructura similar para los metazoos más dominantes (Fonseca *et al.* 2022). En el caso de algunos grupos como los nematodos bentónicos, el gen 18S ha demostrado ser más potente que el gen COI, para la identificación de los mismos debido a que su éxito de amplificación es mayor (Avó *et al.* 2017), como se pudo observar en el presente estudio.

La categoría taxonómica seleccionada para hacer las comparaciones entre marcadores morfológicos y moleculares fue la de familia, debido a que en las bases de datos disponibles la mayor

confiabilidad se encuentra a este nivel (Coward *et al.* 2015). De las familias de anélidos, artrópodos y moluscos encontradas con marcadores moleculares y no con morfología y reportadas previamente para el estado de Oaxaca (Bastida-Zavala *et al.* 2013, Bastida-Zavala y García-Madrigal 2022), se citan: Para Anélidos: A.) con 18S V4 y V9: Ampharetidae, B.) con 18S V4: Phyllodocidae, C.) con 18S V9: Chrysopetalidae, Cossuridae, Eunicidae, Onuphidae y Tomopteridae, D.) con COI: Polynoidae, E.) con COI y 18S V4 y V9: Sabellidae. En el caso de los artrópodos, A.) con V9: Hippolytidae, B.) con V4: Grapsidae y C.) con COI: Euphausiidae. Y para los moluscos, A.) con 18S V4 y V9: Chamidae, Chitonidae, Conidae, Ostreidae, Semelidae y Pholadidae, B.) con 18S V4: Limidae, C.) con 18S V9: Glycymerididae, Isognomonidae, Spondylidae, Pectinidae, D.) con COI: Loliiginidae, Onchidiidae y Psammobiidae, E.) y con COI y 18S V9: Mytiloidea (super familia).

Dentro de las especies de moluscos reportadas previamente en estos sistemas lagunares y que no se detectaron con morfología en el presente, pero sí con los marcadores moleculares se citan: *Martesia striata* y *Diplodonta* sp, identificadas con los marcadores 18S V4 y V9; *Hyotissa hyotis* identificada con 18S-V9 *Argonauta nouryi* identificada con COI (Bastida-Zavala *et al.* 2013, IllescasEspinoza *et al.* 2018). En el caso de los anélidos, se encontraron *Armandia* sp. con 18S-V4 y, *Marphysa* sp. con 18S-V9.

Algunas de las especies detectadas con marcadores moleculares son invasoras y/o introducidas, se encontró a *Perna perna* con 18S-V9, y a *Perna viridis* con 18S-V4. *P. perna*, se registra como invasora en la Global Invasive Species Data Base y *P. viridis*, se reporta como especie introducida; ambas especies resultan ser peligrosas para la navegación y con potencial bio acumulador (Okolodkov *et al.* 2007). Con COI se encontró el percebebe *Amphibalanus eburneus*, artrópodo invasor nativo del Atlántico americano, reportado previamente en el golfo de California (Galil *et al.* 2011, Rodríguez-Almaraz y García-Madrigal 2014).

En conclusión, para estos dos sistemas lagunares costeros, el uso de marcadores moleculares para el monitoreo de la diversidad permite obtener un panorama más amplio de la composición de esta, sin embargo, como se citó en párrafos anteriores, se recomienda hacer uso de distintos marcadores y se espera que las contribuciones de secuencias de organismos lagunares y marinos, incrementen a corto y mediano plazo para así lograr el inventario más completo de estos sistemas.

## Capítulo 2

### **Parámetros ambientales que modulan la distribución de la diversidad de micro, macro y meio eucariotas en los sistemas lagunares costeros Chacahua-Pastoría y Corralero-Alotengo**

#### 1. Introducción

Las lagunas costeras son uno de los ecosistemas más importantes del mundo, funcionan como ecotonos entre sistemas terrestres, de agua dulce, intermareales y marinos con alta productividad y capacidad de carga. Debido a la alta heterogeneidad ambiental y espacio-temporal de estos sistemas puede coexistir un amplio espectro de especies (Barbosa *et al.* 2004, Esteves *et al.* 2008). Por la tasa relativamente baja de descarga de agua de las lagunas, son hábitats favorables para los productores primarios, lo que a su vez favorece la producción secundaria (Kjerfve 1994, Whitfield 2011). No obstante, si la producción primaria excede la demanda de los consumidores puede causar eutrofización, lo que conlleva a reducir los niveles de oxígeno, la penetración de la luz, causar estrés y muerte de los organismos, cambios en la estructura de la comunidad y una posible pérdida de diversidad (Anthony *et al.* 2009).

A causa de su naturaleza de transición, tienen gradientes abióticos muy variables, como en la temperatura, la salinidad y el oxígeno, y una alta productividad biológica (Basset *et al.* 2013). En las zonas tropicales húmedas, las lagunas costeras reciben gran cantidad de descargas fluviales y sedimentos, mayormente arcilla y limo lo que las hace turbias con gran cantidad de sedimentos en suspensión (Bird 1994). La circulación lagunar está dominada en las entradas por las corrientes de marea y en el interior por la fuerza del viento; al ser cuerpos de agua poco profundos, son sensibles a procesos de calentamiento y enfriamiento, registrándose cambios de temperatura incluso durante el día (Smith 1994). En cuanto a la salinidad, esta puede ser similar o superior a la del agua de mar. Esto depende en gran medida de las características hidrológicas de la laguna, las cuales se determinan por su configuración, la entrada de agua del mar (el rango de marea), la precipitación, el agua dulce de los ríos y la evaporación (Bird 1994, Barnes *et al.* 2008). Este es uno de los factores ecológicos más importantes que modelan la estructura de la biodiversidad a escala local y regional en las lagunas costeras. A nivel local, cambios leves promueven la biodiversidad al disminuir el dominio de especies, creando microhábitats o gradientes ecológicos. A nivel regional, la salinidad puede reducir la diversidad si sus efectos espacio-temporales son generalizados y lo suficientemente fuertes para homogenizar la composición de especies en el ecosistema. No obstante, si estos efectos son discontinuos se favorecerá la biodiversidad (Esteves *et al.* 2008). Por su parte, sistemas con comunicación restringida o nula con el mar presentan cambios bruscos en la salinidad debido a

precipitaciones e insolación, causando el dominio de especies eurihalinas como consecuencia del alto contraste estacional (Pantaleón-López *et al.* 2005). La salinidad en estos cuerpos de agua resulta ser el parámetro ambiental más variable, otros parámetros experimentan cambios mínimos; sin embargo debe tenerse en cuenta que estas variables ambientales no necesariamente actúan independientemente sobre los organismos sino que actúan en conjunto (Landa-Jaime 2003).

El valor de los bienes y servicios proporcionados por las lagunas costeras se encuentra entre los más altos de los sistemas naturales, debido al reciclaje de nutrientes, cosecha directa, recreación y valor estético (Basset *et al.* 2013). Las lagunas costeras proporcionan diferentes tipos de hábitats, como manglares, pantanos y praderas marinas (Newton *et al.* 2018). Estos hábitats funcionan como áreas de desove, de reproducción, de alimentación y vías de migración para vertebrados e invertebrados (Heck *et al.* 1995, Franco *et al.* 2006). A pesar de la clara importancia de estos ecosistemas, la biodiversidad de las lagunas costeras no está bien caracterizada, particularmente en regiones tropicales. Para muchos sistemas de lagunas costeras, se carece de datos de biodiversidad y se sabe poco sobre el impacto de la variación espacial y temporal en las comunidades dentro de sistemas altamente heterogéneos. Esto es particularmente cierto para la diversidad eucariota, donde muchos grupos de organismos no se han estudiado o no se pueden identificar basándose solo en la morfología, especialmente la meiofauna y los micro eucariotas (Balzano *et al.* 2015). Las técnicas moleculares representan una forma ideal de identificación rápida y creación de perfiles de comunidades eucariotas, ya que proporcionan varias ventajas sobre los métodos de caracterización tradicionales (Yu *et al.* 2012, Bittleston *et al.* 2015, Fjord *et al.* 2017, Aylagas *et al.* 2018, Günther *et al.* 2018, López-Escardó *et al.* 2018, Polinski *et al.* 2019).

Para un monitoreo más eficiente de la biodiversidad en diferentes ecosistemas, es necesario un enfoque de conservación de múltiples taxones, junto con el uso de herramientas que permitan el monitoreo a gran escala (Park y Razafindratsima 2019). El metabarcoding de ADN ambiental (eDNA) permite obtener una gran cantidad de datos para estudios de monitoreo y caracterización y revela la estructura y composición espacio-temporal de la comunidad en diferentes sistemas (Taberlet *et al.* 2012, Massana *et al.* 2015, Guardiola *et al.* 2016, Aylagas *et al.* 2018, Cronin-O'Reilly *et al.* 2018, Koziol *et al.* 2018, Wangensteen *et al.* 2018, Mcdevitt *et al.* 2019, Pan *et al.* 2020). Sin embargo, es importante notar que la mayoría de los estudios de secuenciación de alto rendimiento tiene como objeto de estudio al plancton y no al bentos (Dasilva *et al.* 2014, Forster *et al.* 2016, Pearman *et al.* 2016, Alves-De-Souza *et al.* 2017, Banerji *et al.* 2018).

En general, los sistemas de lagunas a menudo son áreas habitadas y utilizadas intensivamente por comunidades humanas, lo que influye fuertemente en la ecología de las lagunas (Berkes y Seixas

2005). Las alteraciones antropogénicas a estos pueden provocar estresores naturales que causan eutrofización, floraciones de algas e hipoxia (Elliott y Whitfield 2011). Aquí, se evaluaron los cambios espaciales y temporales en la composición de la comunidad eucariota bentónica en dos sistemas de lagunas con diferentes niveles de impacto antropogénico durante dos temporadas climáticas a lo largo de un año. También, se evaluaron las diferencias ambientales en los dos sistemas lagunares y se correlacionaron con la comunidad biológica presente en las mismas. La diversidad de metazoos (macro y meio eucariotas) y micro eucariotas, se evaluó por separado amplificando fragmentos de genes específicos; la subunidad I del gen citocromo oxidasa (COI) se usó para metazoos y la región V4 del gen 18S rRNA para micro eucariotas, debido al sesgo taxonómico encontrado previamente en ciertos grupos (Coward *et al.* 2015).

## 2. Antecedentes

En México, algunos estudios han evaluado la correlación entre los parámetros ambientales de los sistemas lagunares costeros con la distribución biológica en los mismos. La salinidad y la temperatura suelen ser los factores con mayor incidencia en la distribución biológica en estos sistemas. Este es el caso de algunas comunidades de peces en la laguna Carretas-Pereyra en Chiapas (Velázquez-Velázquez *et al.* 2008) y el sistema lagunar Chacahua-Pastoría en Oaxaca (Esparza y Guerra Mendoza 2010), comunidades de moluscos bentónicos en los sistemas lagunares Chacahua-Pastoría y Corralero-Alotengo (Zamorano *et al.* 2010) y Agua Dulce/ El Ermitaño en Jalisco (Landa-Jaime 2003), la comunidad micro-fitoplanctónica de las lagunas Chantuto-Panzacola y Carretas-Pereyra en Chiapas y los crustáceos en la laguna Mecoacán en Tabasco (Domínguez *et al.* 2003).

Los sistemas de lagunas costeras de ChacahuaPastoría (CH) y Corralero-Alotengo (CA) representan una gran relevancia comercial y ecológica, ya que mantienen especies de importancia comercial como el callo de hacha (*Atrina maura*), el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), el camarón marrón (*Farfantepenaeus californiensis*), el camarón de cristal (*Farfantepenaeus brevirostris*), el camarón azul (*Litopenaeus stylirostris*), el mejillón o tichinda (*Mytella strigata*), entre otros (Sánchez-Meraz y Martínez-Vega 2000, Angel-Pérez *et al.* 2007, Sánchez Méndez *et al.* 2015), y son laboratorios potenciales para investigación ecológica y bioprospección.

## 3. Hipótesis

Debido a su proximidad geográfica y características similares, se podría esperar que la estructura y composición de la diversidad eucariota (metazoos y otros eucariotas) sea similar, independiente de la temporada climática estudiada (secas y lluvias). Además, dentro de cada uno de los sistemas la regionalización (cerca, media, lejos), en función de la proximidad de las estaciones a la boca de cada

sistema lagunar, estará dada tanto por las características físicas y químicas del ambiente como por la composición biológica, encontrándose así, las tres regiones bien definidas.

#### 4. Objetivos

##### 4.1. Objetivo general

Describir y comparar la diversidad de metazoos y microeucariotas en el sedimento y su relación con los parámetros fisicoquímicos, en dos periodos del año, en los sistemas lagunares costeros Chacahua-Pastoría (CH-P) y Corralero-Alotengo (C-A), mediante el uso de secuenciación masiva del código de barras genético en muestras ambientales.

##### 4.2. Objetivos particulares

1. Caracterizar y comparar la diversidad, composición y estructura de la comunidad de metazoos y microeucariotas en el sedimento en los sistemas lagunares Chacahua-Pastoría y Corralero-Alotengo en la zona costera del estado de Oaxaca.
2. Describir el comportamiento de los parámetros ambientales de los dos sistemas lagunares durante las dos temporadas de muestreo.
3. Evaluar el grado de correlación de la comunidad biológica de estos sistemas lagunares con los parámetros ambientales en dos tiempos diferentes.

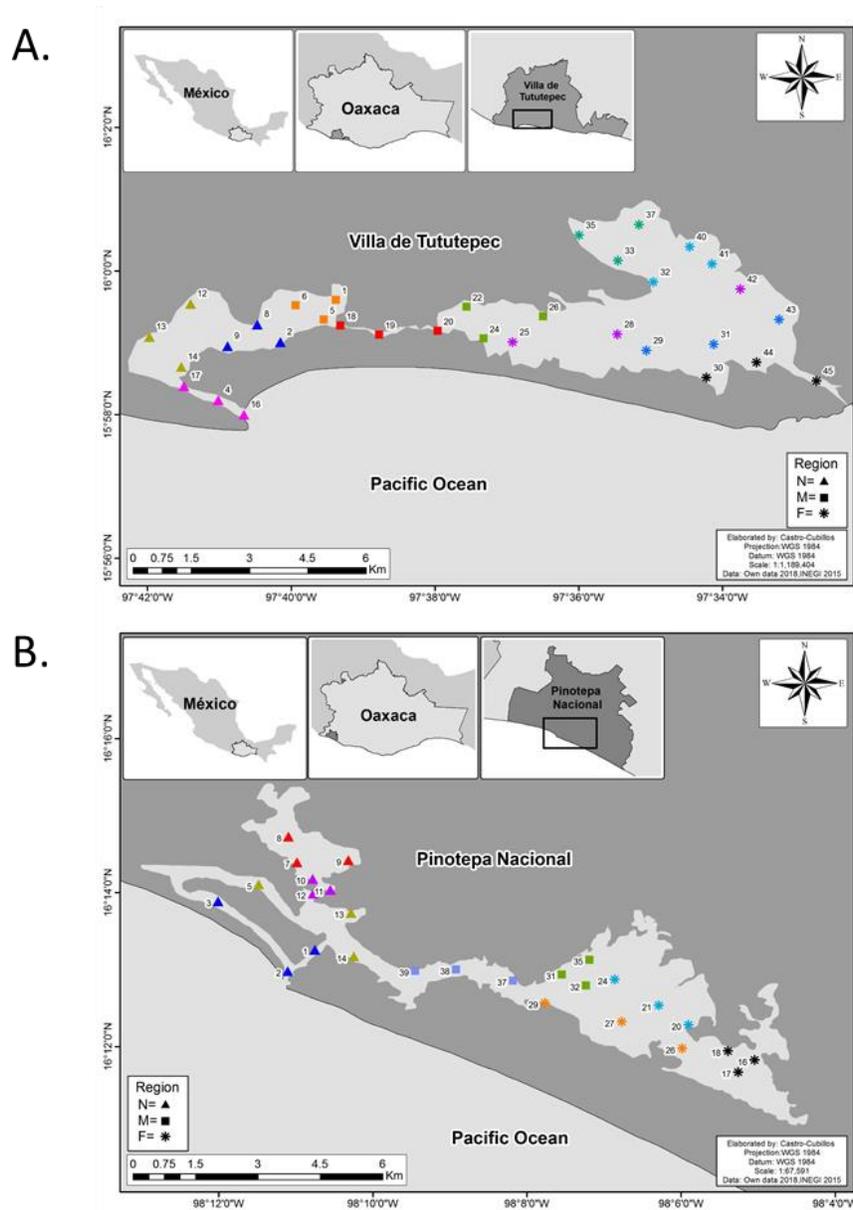
#### 5. Materiales y métodos

##### 5.1. Área de estudio: Ubicación de las estaciones y tipo muestreo

El área de estudio cubrió dos sistemas de lagunas costeras en el Pacífico Sur mexicano, el primero es Chacahua-Pastoría (CH-P) ( $15^{\circ} 57' 0.237''$  -  $16^{\circ} 03' 05.96''$  N y  $97^{\circ} 31' 57.15''$  -  $97^{\circ} 48' 01.01''$  W) que se encuentra dentro del Parque Nacional Lagunas de Chacahua y el segundo es el sistema Corralero-Alotengo (CA) ( $16^{\circ} 11'-15$  y  $16^{\circ} 16' 30''$  N y  $98^{\circ} 05' 00''$  y  $98^{\circ} 12' 30''$  W).

Se tomaron muestras de sedimento con una draga Petite Ponar en dos períodos de muestreo en 2018. El primer período de muestreo fue durante la estación seca, marzo (20 al 22) y abril (10 y 11) y el segundo durante la temporada de lluvias, septiembre (17 al 20) (**Figura 11**). Cada laguna se dividió en diferentes zonas de acuerdo con las características fisicoquímicas (salinidad, temperatura, pH) y suelo (arena, barro), definidas en estudios previos. En total hubo 11 zonas para CH-P y 9 zonas para C-A, en cada zona se tomaron tres muestras. Estas zonas se integraron en regiones dentro de los sistemas de lagunas. Estas regiones se definieron de acuerdo con la distancia a la boca de cada una. Se tomó la distancia total de cada cuerpo de laguna y se dividió en tres partes, lo que resultó en las regiones: cercana, media y lejana. Para C-A, cerca de (N): 0-4 km, medio (M): 4-8 km y lejos (F): 8-

12 km; para CH-P, cerca de (N): 0-7 Km, medio (M): 7-14 Km y lejos (F): 14-21 Km. En cada sitio de muestreo, se midieron la profundidad, la salinidad, la temperatura, el pH y la concentración de oxígeno con un multiparámetro Hanna HI 9828. Todas las muestras se colocaron dentro de bolsas Ziploc® y se almacenaron bajo hielo hasta su llegada al laboratorio. Después, cada muestra se homogeneizó con una licuadora de cocina, que se limpió con hipoclorito de sodio entre cada muestra. Finalmente, las muestras se almacenaron a -20°C hasta la extracción de ADN.



**Figura 11.** Zona de estudio y estaciones de muestreo en los dos sistemas lagunares estudiados. A) Chacahua-Pastoría (CH): 33, B) Corralero- Alotengo (CA): 27. Los símbolos indican las regiones dentro de los sistemas (▲=cerca, ■= medio, \*=lejos) y los colores indican las zonas dentro de cada región.

## 5.2. Extracción de ADN y secuenciación

Para las extracciones de ADN, se procesaron 10 g de cada muestra de sedimento homogeneizado con el kit de extracción de ADN PowerMax (QIAGEN, Valencia, CA, EE. UU.) De acuerdo con las instrucciones del fabricante, el ADN se resuspendió en un volumen final de 5 ml. El tamaño del ADN se confirmó con electroforesis en gel y cada muestra se cuantificó con un Nanodrop 2000.

La región V4 del gen 18S rRNA se amplificó con los cebadores E572F (5'-CYGCGGTA ATTCCAGCTC-3') y E1009R (5'-AYGGTATCTRATCRTCCTTYG-3'). Para amplificar un fragmento parcial del gen mitocondrial citocromo c oxidasa I (COI), se usaron los cebadores mlCOIintF-XT (5'-GGWACWRGWTGRACWITITAYCCYCC-3') y el cebador jgHCO21 (5'-TAIACYTCIGGRTGICCRAARAAYCA-3'). Ambos cebadores adelantados contenían el adaptador del kit Illumina NextEra y 12 bases aleatorias para aumentar la diversidad en el portaobjetos illumina (5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGANNHNNHNNWNNNH-3') y los cebadores inversos contenían el adaptador Illumina Nextera (5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGT-3').

Las amplificaciones de 18S V4 se prepararon hasta un volumen final de 25  $\mu$ l, con 0.625 U de GoTaq G2 Flexi DNA polymerase (Promega), 0.5  $\mu$ l de 0.2 mM de cada cebador, 5  $\mu$ l de Buffer 1X, 2  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub>, (25 mM) 0.5  $\mu$ l de dNTPs 10 mM y 1.5  $\mu$ l de ADN. Para COI, el volumen final fue de 25  $\mu$ l y todos los reactivos fueron iguales, excepto 25 mM de MgCl<sub>2</sub> y 2  $\mu$ l de ADN. Para 18s-V4, las condiciones de PCR consistieron en un paso de activación de la polimerasa de 5 minutos a 94 °C, 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, alineamiento a 50 °C durante 45 s y alargamiento a 72 °C durante 90 s, la extensión final fue por 72 °C por 7 min. Para COI, la activación de la polimerasa a 95 °C fue por 7 min, seguido de 46 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento a 44 °C por 45 s y alargamiento a 72 °C por 90 s, la extensión final fue de 72 °C por 5 min.

Los productos de PCR se purificaron con perlas Agencourt® AMPure® a una concentración de 0,8x perlas por muestra. La concentración de ADN de los productos de PCR se midió en un lector de microplacas FLUOstar Omega® utilizando el sistema dsDNA QuantiFluor® (Promega, Reino Unido). Los amplicones 18S V4 y COI se agruparon en concentraciones equimolares y la indexación se realizó utilizando un kit de códigos de barras Illumina NextEra según las instrucciones del fabricante. Las bibliotecas indexadas se agruparon, cuantificaron y diluyeron a 4pM y se ejecutaron en Illumina Miseq usando el kit de secuenciación V3 2x 300bp Illumina (Illumina®).

### 5.3. Bioinformática y análisis estadísticos

Las secuencias se analizaron con QIIME 1.9.1.4 y Usearch versión 8.1.5. El comando Usearch *mergepairs* se usó para ensamblar las secuencias finales emparejadas sin procesar (hacia adelante y hacia atrás). Se realizó un filtro de calidad y los datos de las muestras se separaron en 18S V4 y COI basados en la secuencia del cebador usando CUTADAPT 6. Los cebadores se eliminaron antes de un análisis posterior. Se descartaron las secuencias con una longitud inferior a 370 pb para 18S V4 y 300 pb para COI y se filtraron las secuencias por calidad para eliminar aquellas con el error máximo esperable  $>0.5$ . Las lecturas se deduplicaron y se eliminaron las secuencias únicas, luego se agruparon las MOTUs utilizando el algoritmo USEARCH UPARSE 7 al 97% para los conjuntos de datos 18S V4 y COI. UCHIME 8 se utilizó para encontrar y eliminar quimeras comparándose con la base de datos Silva (versión 132) para 18S V4 y una base de datos personalizada para COI. Esta base personalizada se realizó a partir de secuencias COI descargadas del NCBI (consultado el 17/05/2018). Las secuencias se filtraron para contener COI de longitud completa y fragmentos parciales  $>300$  pb, y no más de dos bases N consecutivas. Luego, la base de datos fue deduplicada de secuencias idénticas y agrupadas al 99%, antes de que los archivos *fasta* como la taxonomía fueran formateados manualmente para ingresarlos en QIIME. Después de la eliminación de las quimeras, las MOTUs se clasificaron en las bases de datos de referencia utilizando UCLUST con una similitud mínima de 0.6. Las secuencias COI también se verificaron individualmente con la base de datos BOLD (Ratnasingham y Hebert 2007a). Las lecturas originales se mapearon en las MOTUs al 97% y se produjo una tabla de MOTUs.

Las MOTUs de metazoos y micro-eucariotas se separaron en cada muestra y la matriz de frecuencia absoluta rarificada se utilizó para realizar análisis estadísticos y de diversidad. Para cada sistema lagunar, las muestras de cada zona se unieron en una y luego las abundancias se ajustaron por zona. Para los metazoos, se rarificó a 300 secuencias y para los otros eucariotas a 3000 secuencias. Para la diversidad alfa, se analizó la riqueza (S) de las MOTUs. También, se aplicó un análisis de ANOVA de una vía para determinar si las diferencias entre estas medidas de diversidad fueron significativas. Para hallar la mejor correlación de la riqueza de MOTUs con los 5 parámetros ambientales se calculó el índice de correlación de Pearson con la librería Stats V.3.5.2 en R.

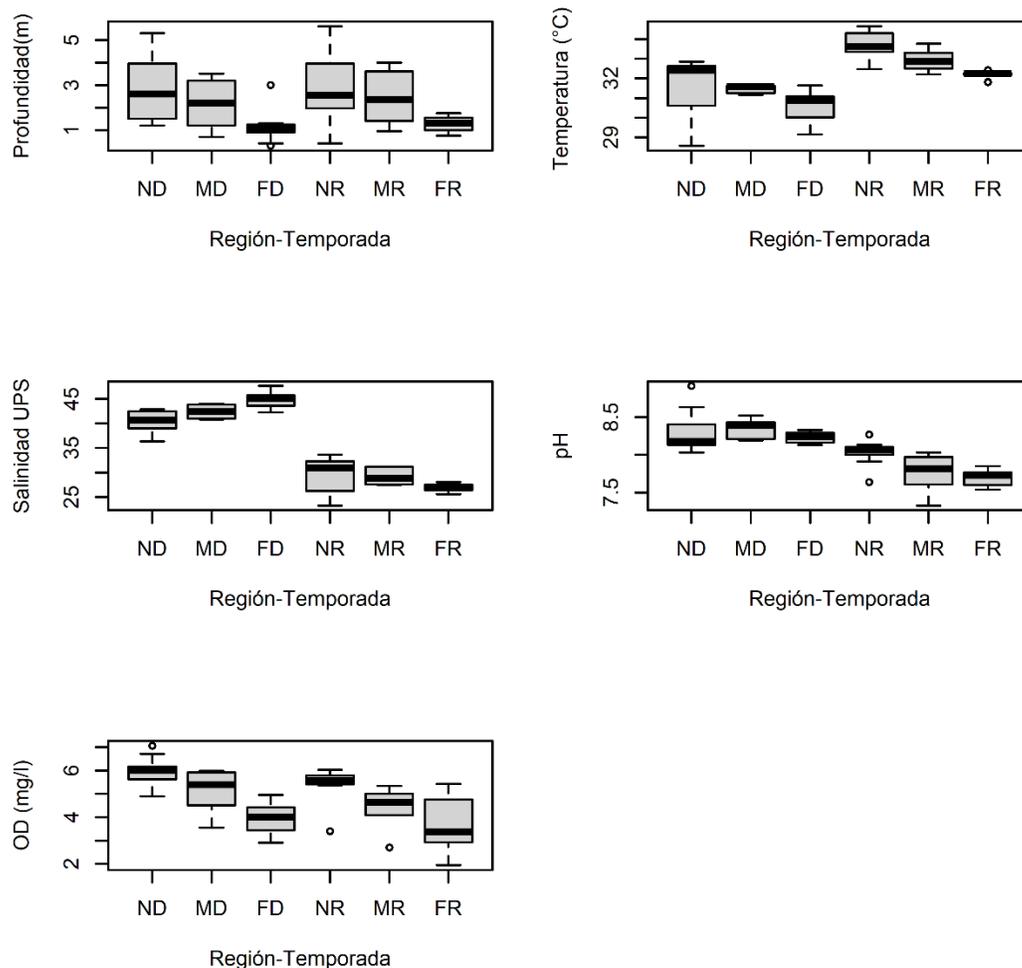
Se usó el programa R y la librería *Stats* v.3.5.2, para evaluar las variaciones de los parámetros ambientales entre las regiones y las temporadas de estudio, se corrió un análisis de varianza ANOVA de dos vías y su prueba posterior o post-hoc (Tukey HDS). Posteriormente, se realizó un análisis de correspondencia canónica (ACC) en PAST 3.25 con las abundancias rarificadas de MOTUs para cada zona de cada sistema lagunar y las cinco variables ambientales medidas (salinidad, temperatura, OD, pH y profundidad) para detectar las relaciones entre datos biológicos y datos ambientales.

Para determinar las diferencias en la composición biológica de los sistemas, se ejecutó un PERMANOVA (Anderson 2017) en Primer V7. Primero, las abundancias de secuencias por MOTU de cada conjunto de datos se transformó en presencia / ausencia. Lo anterior para evitar sobre estimaciones en abundancias de MOTUs, en el entendido de que cada secuencia no representa un individuo como tal. Ya que algunos organismos tienen múltiples copias del genoma mitocondrial, lo que inflaría el conteo de sus lecturas en comparación con individuos con copias únicas. Posteriormente se aplicó una prueba de similitud *Jaccard* a cada matriz, con el resultado de la semejanza se aplicó un diseño PERMANOVA de 3 factores, temporada (secas y lluvias), sistema de lagunas (CH-P y CA) y región (distancia a la boca: cerca, medio y lejos). Estos análisis se realizaron con 999 permutaciones y una  $p < 0.05$ . La región estaba anidada en el sistema de lagunas. Se realizó un análisis SIMPER para obtener los grupos responsables de las diferencias entre los factores que mostraron diferencias significativas en el PERMANOVA.

## 6. Resultados

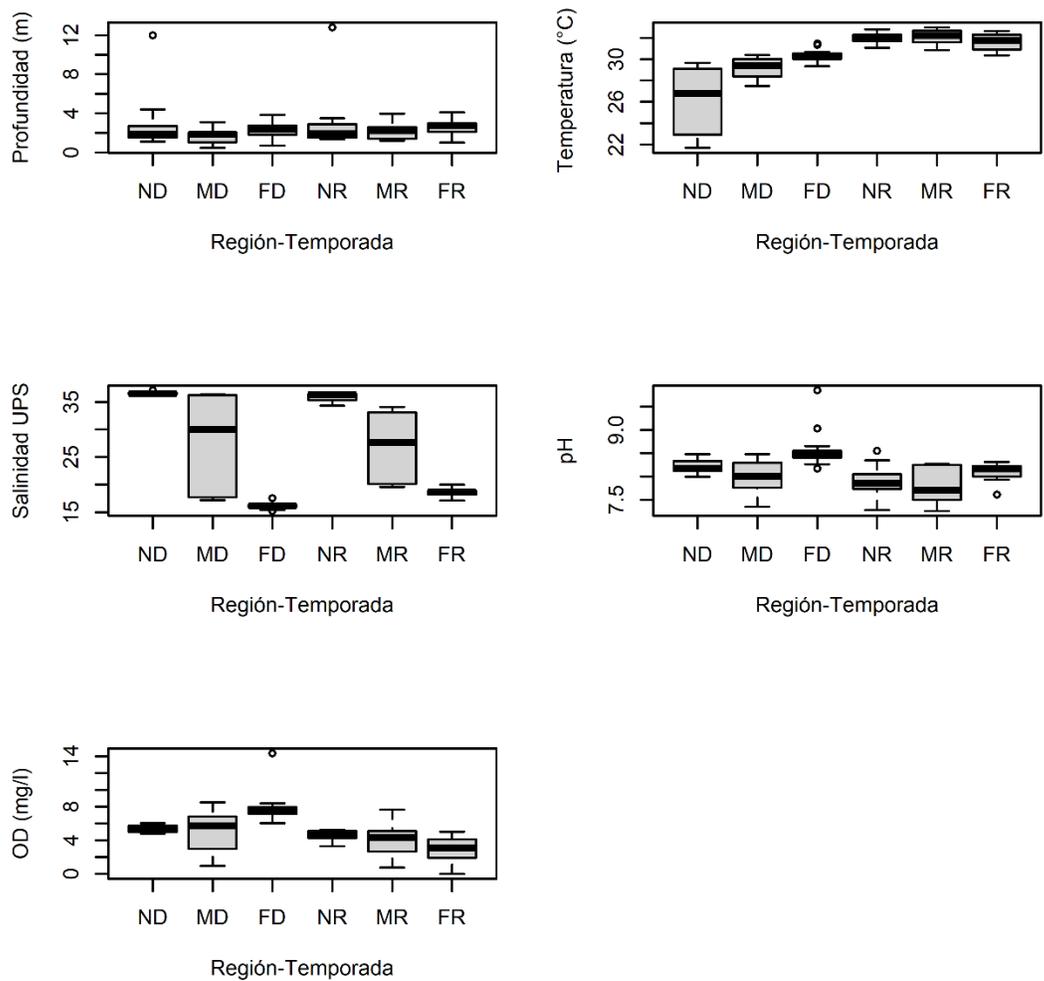
### 6.1. Condiciones ambientales de los sistemas lagunares durante los muestreos

Se observó una alta variabilidad en los parámetros ambientales a lo largo de la temporada y dentro de cada laguna tanto en CH como en C (**Figura 12** y **Figura 13**). En C, la profundidad varió entre las tres regiones de la laguna (ANOVA,  $df = 4$ ,  $F = 5.18$ ,  $p = 0.00149$ ), la temperatura varió entre estaciones (ANOVA,  $df = 1$ ,  $F = 53.847$ ,  $p = 2.23e-09$ ) y entre regiones de la laguna (ANOVA,  $df = 4$ ,  $F = 5.455$ ,  $p = 0.00106$ ). La salinidad mostró una disminución en los valores en las tres regiones del sistema lagunar desde la época seca hasta la lluviosa (ANOVA,  $df = 1$ ,  $F = 508.082$ ,  $p = 2e-16$ ), así como diferencias entre las regiones lagunares en cada época (ANOVA,  $gl = 4$ ,  $F = 6.747$ ,  $p = 0.000216$ ). El pH varió significativamente entre temporadas (ANOVA,  $df = 1$ ,  $F = 72.86$ ,  $p = 3.46e-11$ ) y entre regiones (ANOVA,  $df = 4$ ,  $F = 5.35$ ,  $p = 0.00121$ ), y OD varió entre temporadas (ANOVA,  $df = 1$ ,  $F = 4.216$ ,  $p = 0.0455$ ) y entre regiones (ANOVA,  $df = 4$ ,  $F = 13.500$ ,  $p = 1.91e-07$ ).



**Figura 12.** Diagramas de caja y bigotes para las cinco variables ambientales analizadas en tres regiones (N: cerca, M: media, F: lejos) del sistema lagunar Corralero-Alotengo durante dos temporadas a lo largo de un año (D: secas, R: lluvias).

En CH, la profundidad fue similar entre temporadas y regiones de la laguna, la temperatura fue diferente entre regiones de diferentes estaciones (ANOVA,  $df = 1$ ,  $F = 77.88$ ,  $p = 1.95e-12$ ), y entre regiones de una misma temporada (ANOVA,  $gl = 4$ ,  $F = 14.28$ ,  $p = 3.03e-08$ ). La salinidad varió entre regiones dentro de la misma temporada (ANOVA,  $df = 4$ ,  $F = 58.701$ ,  $p = 2e-16$ ). El pH varió entre regiones en diferentes temporadas (ANOVA,  $df = 1$ ,  $F = 18.311$ ,  $p = 6.85e-05$ ) y entre regiones en la misma temporada (ANOVA,  $df = 4$ ,  $F = 5.964$ ,  $p = 0.000415$ ). OD varió entre temporadas (ANOVA,  $df = 1$ ,  $F = 43,946$ ,  $p = 1,07e-08$ ) y entre regiones dentro de la misma temporada (ANOVA,  $df = 4$ ,  $F = 6,147$ ,  $p = 0,000326$ ).



**Figura 13.** Diagramas de caja y bigotes para las cinco variables ambientales analizadas en tres regiones (N: cerca, M: media, F: lejos) del sistema lagunar Chacahua-Pastoría durante dos temporadas a lo largo de un año (D: secas, R: lluvias).

**Tabla 8.** Resumen de parámetros ambientales por sistema lagunar, temporada y región. Promedio, desviación estándar (DS), valores mínimos (min) y máximos (max) por temporada y región (N: cerca, M: medio, F: lejos).

Sis. Lagunar/temporada		Corralero Secas			Corralero Lluvias			Chacahua Secas			Chacahua Lluvias		
Región		N	M	F	N	M	F	N	M	F	N	M	F
Profundidad (m)	Promedio	2.86	2.17	1.16	2.88	2.44	1.26	3.19	1.66	2.29	3.25	2.24	2.59
	DS	1.46	1.18	0.78	1.44	1.24	0.35	3.45	0.82	0.78	3.66	0.90	0.77
	Min	1.2	0.70	0.30	0.40	0.95	0.75	1.10	0.45	0.70	1.35	1.20	1.00
	Max	5.30	3.50	3.00	5.60	4.00	1.75	12.00	3.10	3.85	12.80	3.98	4.10
Temperatura °C	Promedio	31.56	31.47	30.61	33.74	32.92	32.17	25.97	29.16	30.31	31.97	32.06	31.58
	DS	1.57	0.21	0.83	0.64	0.59	0.21	3.29	1.00	0.57	0.57	0.76	0.77
	Min	28.56	31.16	29.15	32.48	32.20	31.81	21.67	27.50	29.34	31.08	30.84	30.35
	Max	32.85	31.65	31.64	34.65	33.77	32.43	29.66	30.39	31.47	32.79	32.98	32.63
Salinidad UPS	Promedio	40.48	42.42	44.94	29.41	29.20	26.92	36.54	27.23	16.11	35.91	26.76	18.54
	DS	2.23	1.44	1.72	3.50	1.78	0.85	0.29	9.27	0.57	0.84	6.65	0.67
	Min	36.35	40.84	42.30	23.27	27.54	25.60	36.16	17.16	15.23	34.34	19.59	17.11
	Max	42.88	43.99	47.65	33.65	31.20	28.05	37.11	36.36	17.53	36.65	34.10	20.01
pH	Promedio	8.29	8.36	8.23	8.03	7.76	7.70	8.21	7.99	8.57	7.92	7.77	8.10
	DS	0.27	0.13	0.08	0.15	0.26	0.11	0.15	0.41	0.40	0.38	0.41	0.18
	Min	8.03	8.19	8.13	7.64	7.33	7.54	7.99	7.35	8.17	7.28	7.26	7.61
	Max	8.91	8.52	8.33	8.27	8.03	7.85	8.48	8.48	9.85	8.55	8.27	8.31
OD (mg/l)	Promedio	5.98	5.12	3.94	5.46	4.41	3.71	5.39	5.23	7.91	4.57	4.06	2.90
	DS	0.56	0.93	0.70	0.68	0.95	1.22	0.45	2.51	1.91	0.64	2.31	1.46
	Min	4.9	3.55	2.91	3.4	2.7	1.95	4.8	0.94	6.06	3.3	0.74	0
	Max	7.06	5.98	4.95	6.03	5.34	5.43	6.05	8.53	14.38	5.26	7.67	5.02

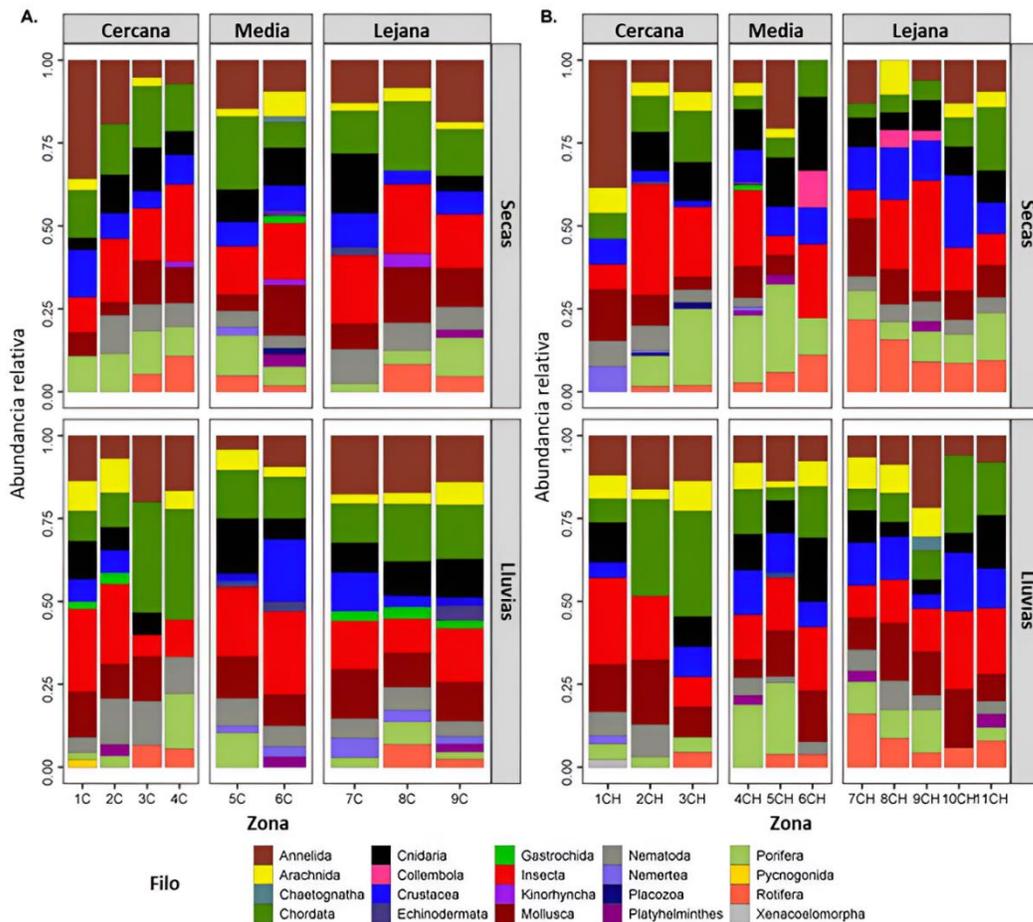
## 6.2. Secuenciación

Se analizaron un total de 120 muestras para cada gen marcador. Para el 18S-V4, la cantidad inicial de secuencias fue de 2.248.247 y después del control de calidad, la cantidad final fue de 1.576.493. Para COI, se obtuvieron 1.758.686 lecturas sin procesar y después del filtrado, el número final fue de 319.417 lecturas. Después de la agrupación de MOTUs para 18S-V4, se detectaron un total de 3.410 MOTUs y 1.182 MOTUs para COI.

## 6.3. Composición y riqueza taxonómica en los dos sistemas lagunares

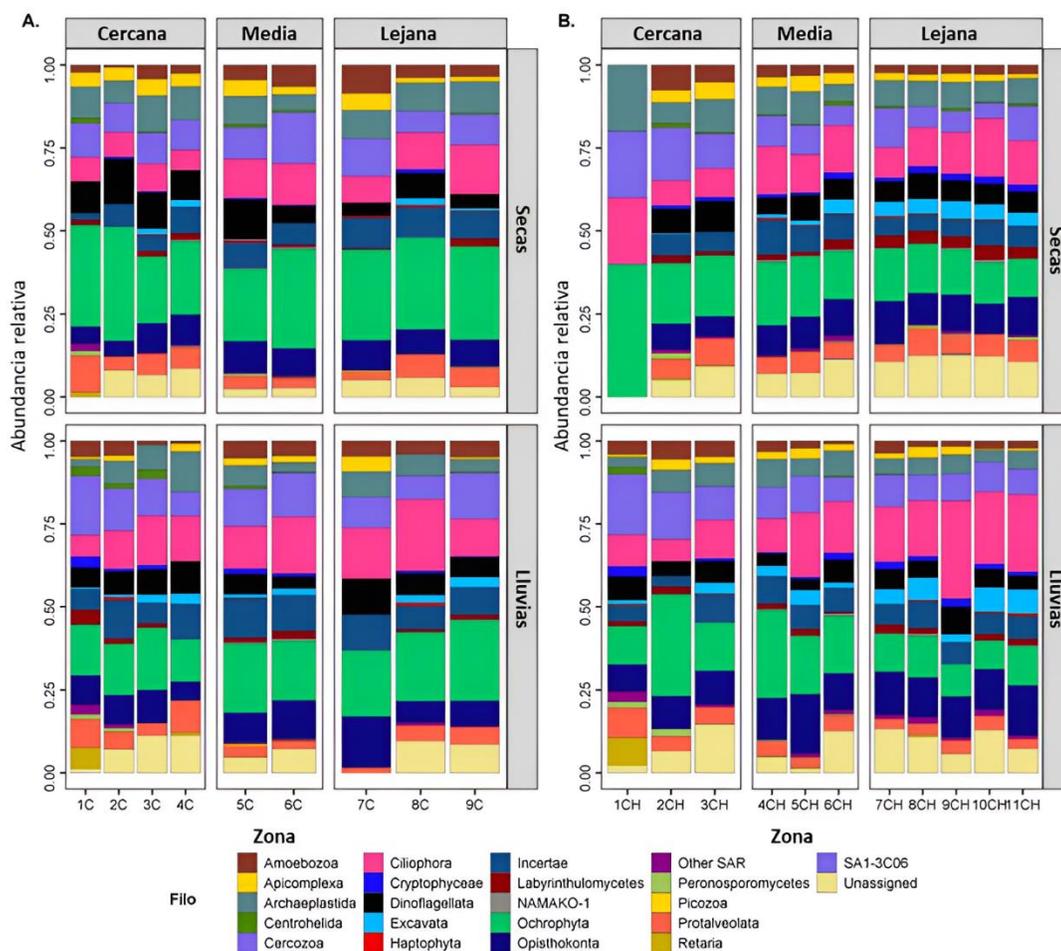
Los artrópodos (31.1 +/- 17.6 % MOTU) dominaron en los sistemas de lagunas y en las temporadas, compuestos principalmente por Hexapoda (17.3 % MOTU +/-6,8), seguidos por Chordata (14.0 % MOTU +/-7.8), Annelida (12.4 +/- 7.9 % MOTU), Mollusca (10.6 +/- 4.8 % MOTU) principalmente

Bivalvia (5.3 +/- 4.5 % MOTU) y Cnidaria (9.3 +/- 5.2 % MOTU) (**Figura 14**, Anexo 2). Dentro de las bibliotecas de eucariotas, los taxones más dominantes fueron Ochrophyta (19.4 +/- 7.3 % MOTU), principalmente diatomeas (17.4 +/- 7.4 % MOTU), Ciliophora (13.4 +/- 5.18 % MOTU), Cercozoa (10.4 +/- 3.5 % MOTUs), Opisthokonta (9.6 +/- 3.16 % MOTUs), Archaeplastida (7.3 +/- 3.05 % MOTUs) y Dinoflagellata (6.6 +/- 2.6 % MOTUs) en cada zona (**Figura 15**).



**Figura 14.** Abundancia relativa de MOTUs de filos de metazoos en las bibliotecas de secuencias de amplicones del gen COI generadas a partir de sedimentos recolectados de los sistemas lagunares Corralero-Alotengo y Chacahua-Pastoría a lo largo de estaciones, regiones y zonas lagunares. A.) C: Corralero-Alotengo en temporada de secas y lluvias. Regiones en los sistemas lagunares (distancia a la desembocadura del sistema lagunar), Cercana (Zonas: 1, 2, 3, 4), Media (Zonas: 5, 6) y Lejana (Zonas: 7, 8, 9). B.) CH: Chacahua-Pastoría en temporada de secas y lluvias. Regiones en los sistemas

lagunares (distancia a la desembocadura del sistema lagunar), Cercana (Zonas: 1, 2, 3), Media (Zonas: 4, 5, 6) y Lejana (Zonas: 7, 8, 9, 10, 11).

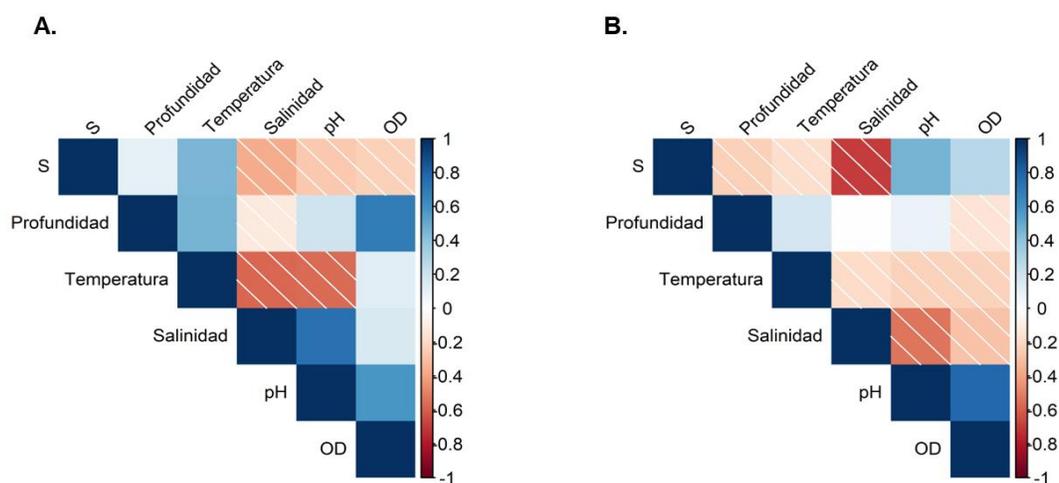


**Figura 15.** Abundancia relativa de MOTUs de filos de micro-eucariotas en las bibliotecas de secuencias de amplicones del gen COI generadas a partir de sedimentos recolectados de los sistemas lagunares Corralero-Alotengo y Chacahua-Pastoría a lo largo de estaciones, zonas y regiones lagunares. A.) C: Corralero-Alotengo en temporada de secas y lluvias. Regiones en los sistemas lagunares (distancia a la desembocadura del sistema lagunar), Cercana (Zonas: 1, 2, 3, 4), Media (Zonas: 5, 6) y Lejana (Zonas: 7, 8, 9). B.) CH: Chacahua-Pastoría en temporada de secas y lluvias. Regiones en los sistemas lagunares (distancia a la desembocadura del sistema lagunar), Cercana (Zonas: 1, 2, 3), Media (Zonas: 4, 5, 6) y Lejana (Zonas: 7, 8, 9, 10, 11).

Varios MOTUs presentaron coincidencias cercanas con taxones que no se habían informado previamente para estos sistemas, algunos crustáceos y Dinoflagellata importantes en las floraciones

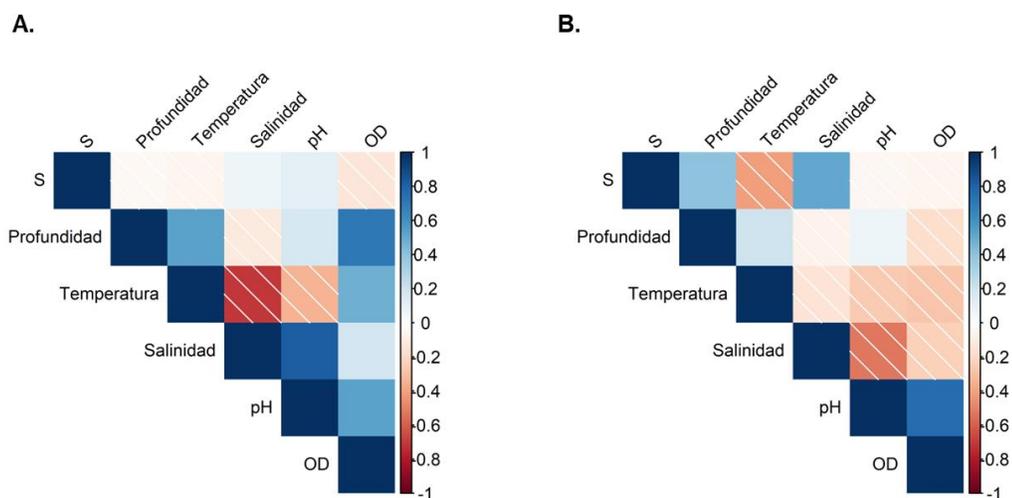
de microalgas y potencialmente tóxicas. Con un porcentaje de identidad de secuencia del 100 % se identificaron *Amphibalanus eburneus*, *Alexandrium leei*, *Amphidinium klebsii* y *Gyrodinium jinhaense*. Se encontraron otras coincidencias más cercanas, con porcentajes de identidad de secuencia de 98.5-100 %, que coinciden con *Macrothrix* sp., *Calanus propinquus*, *Lingulodinium polyedrum*, *Prorocentrum triestinum*, *Pellucidodinium psammophilum*, *Nusuttodinium amphidinioides*, *Alexandrium ostenfeldii*, *Alexandrium pohangense* y *Gonyaulax spinifera* (**Anexo 3**). Es importante notar la presencia de *Mytella strigata* especie de interés comercial en la región.

Se detectaron un total de 497 MOTU de metazoos en CH en comparación con 392 en C. En este último, hubo una tendencia de mayor riqueza hacia la región cercana a la boca de la laguna durante ambas temporadas, mientras que en CH fue en la región alejada de la boca. En ambos casos, la riqueza dentro de cada región fue muy variable; por lo tanto, estas diferencias no fueron significativas. La riqueza de MOTUs fue mayor en época de lluvias para C, pero las diferencias entre épocas no fueron significativas, mientras que en CH se encontraron diferencias significativas, en época de lluvias entre las regiones (ANOVA,  $F_{2,6} = 7.926$ ,  $p = 0.0207$ ), más exactamente entre las regiones N-F (Tukey HDS,  $p = 0.0205$ ), (**Figura 18**) y la mayor riqueza se encontró en la época lluviosa. La riqueza de MOTUs mostró correlaciones moderadas con factores ambientales como la salinidad (Pearson,  $r = -0.69$ ,  $p = 0.016$ ) y el pH (Pearson,  $r = 0.46$ ,  $p = 0.0746$ ), con la correlación más alta en CH (**Figura 16**); mientras tanto, C mostró una alta correlación con la temperatura (Pearson,  $r = 0.45$ ,  $p = 0.1087$ ) y la salinidad (Pearson,  $r = -0.36$ ,  $p = 0.0488$ ).

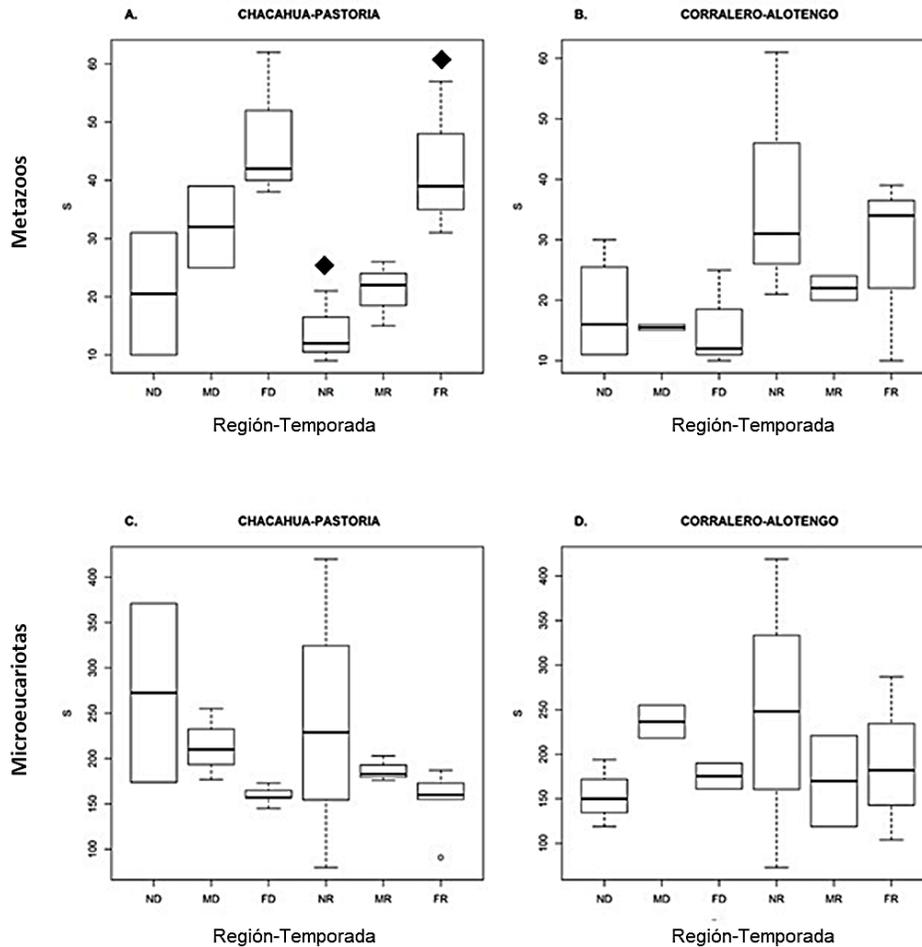


**Figura 16.** Correlación de Pearson para riqueza (S) de MOTUs de metazoos y las cinco variables ambientales medidas en A.) C: Corralero-Alotengo y B.) CH: Chacahua-Pastoría.

Para los microeucariotas, la riqueza de MOTUs (S) fue mayor en ambos sistemas de lagunas durante la época de lluvias; siendo mayor en CH (1818) que en C (1470). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las regiones de ambas lagunas en ambas temporadas. Por otro lado, la correlación de S con los parámetros ambientales fue baja, en CH el parámetro con mayor correlación fue la salinidad (Pearson,  $r = 0.51$ ,  $p = 0.1326$ ), seguido de la temperatura (Pearson,  $r = -0.41$ ,  $p = 0.1907$ ) y en C las mayores correlaciones fueron con el OD (Pearson,  $r = -0.13$ ,  $p = 0.0393$ ) y el pH (Pearson,  $r = 0.11$ ,  $p = 0.8030$ ) (**Figura 17**).



**Figura 17.** Correlación de Pearson para riqueza (S) de MOTUs de microeucariotas y las cinco variables ambientales medidas en A.) C: Corralero-Alotengo y B.) CH: Chacahua-Pastoría.

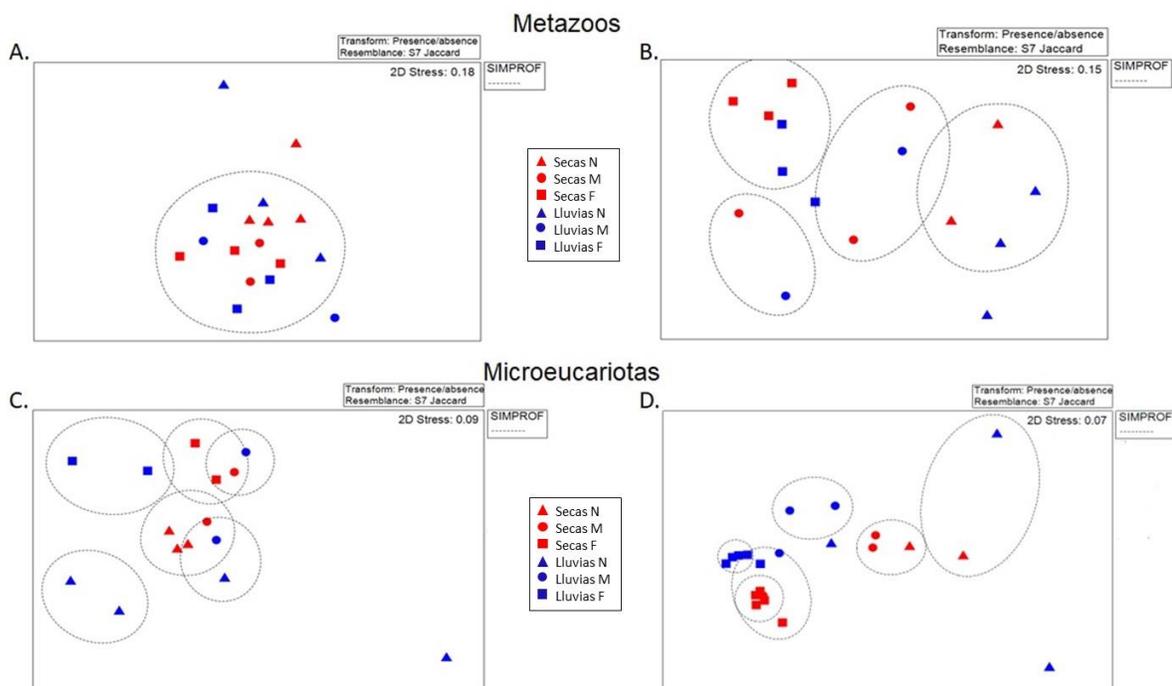


**Figura 18.** Diagramas de caja para comparaciones de diversidad alfa (S) de comunidades de metazoos y microeucariotas entre los dos sistemas lagunares estudiados: Metazoos A) CH, B) C; microeucariotas C) CH, D) C. ♦ indica diferencias significativas entre los pares de regiones analizadas (ANOVA,  $F_{2,6} = 7.926$ ,  $p = 0.0207$ ), (Tukey HDS,  $p = 0.0205$ ). En el eje x (Región-Temporada) la primera letra indica la región N: cercana, M: media y F: lejos y la segunda letra indica la temporada D: Secas y R: Lluvias. En el eje Y se representa la riqueza de MOTUs.

#### 6.4. Composición y estructura de metazoos marino-costeros y la comunidad eucariota en ambos sistemas lagunares

La composición de la comunidad de metazoos y microeucariotas basada en la presencia y ausencia de taxones no mostró diferencias entre ambos sistemas lagunares o en cada sistema lagunar entre temporadas (PERMANOVA  $p > 0.05$ ). Después de las comparaciones pareadas, no se encontraron diferencias significativas entre las regiones de C, pero sí en CH para los metazoos; para este último,

N-M (PERMANOVA  $df= 6$ ,  $t = 1.2598$ ,  $p = 0.047$ ), N-F (PERMANOVA  $df= 7$ ,  $t = 1.9294$ ,  $p = 0.006$ ) y M-F (PERMANOVA  $df= 7$ ,  $t = 1.5704$ ,  $p = 0.006$ ). Las comunidades de metazoos N, M, F no son diferentes entre cada temporada en cada laguna; ni entre lagunas. Para los microeucariotas en C, las regiones diferentes fueron N-F (PERMANOVA  $df= 7$ ,  $t = 1,239$ ,  $p = 0,032$ ); en CH las regiones con diferencias fueron N-F (PERMANOVA  $df= 11$ ,  $t = 1.8322$   $p = 0.002$ ) y M-F (PERMANOVA  $df= 12$ ,  $t = 1.4211$   $p = 0.005$ ). En la época seca en CH hubo diferencias entre L-F (PERMANOVA  $df = 6$ ,  $t = 1.299$ ,  $p = 0.034$ ), mientras que en la época lluviosa entre N-F (PERMANOVA  $df = 6$ ,  $t = 1.427$ ,  $p = 0.019$ ) y M-F (PERMANOVA  $df = 6$ ,  $t = 1,2311$ ,  $p = 0,034$ ). La composición de la comunidad microeucariota en CH fue similar en la región lejana F independientemente de la temporada, mientras que la composición de la comunidad microeucariota fue significativamente diferente en las regiones M y N entre temporadas (**Figura 19**). Comparando una misma región en una laguna diferente, solo se encontraron diferencias en la época de lluvias entre la región F (PERMANOVA  $df = 6$ ,  $t = 1.5022$ ,  $p = 0.041$ ).

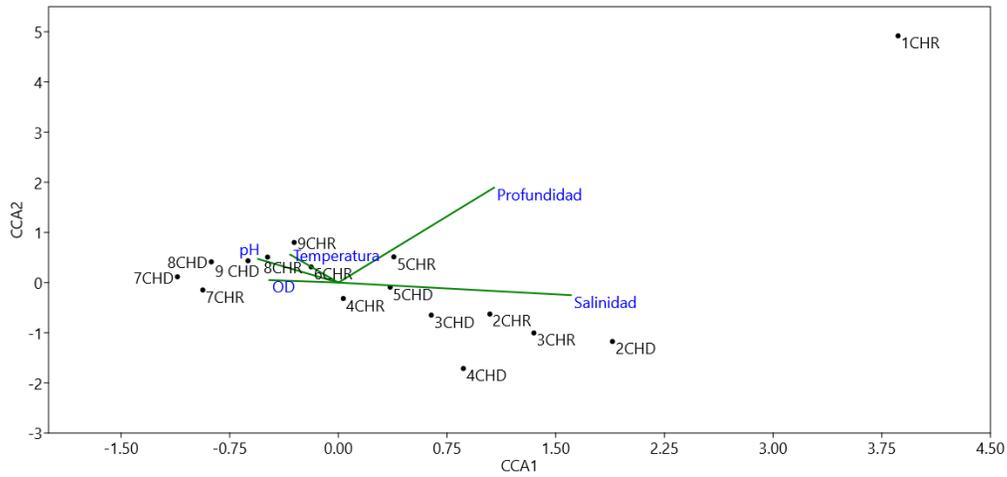


**Figura 19.** N-MDS para comunidades de metazoos y microeucariotas identificadas en los sistemas lagunares Corralero-Alotengo y Chacahua-Pastoría en ambas temporadas. Metazoos: A.) C, B) CH. Microeucariotas: C.) C, D) CH. Todas las representaciones tienen un valor de estrés, para cada una se aplicó una transformación presencia/ausencia y una prueba de similitud de Jaccard. Los grupos se definieron mediante el análisis SIMPROF.

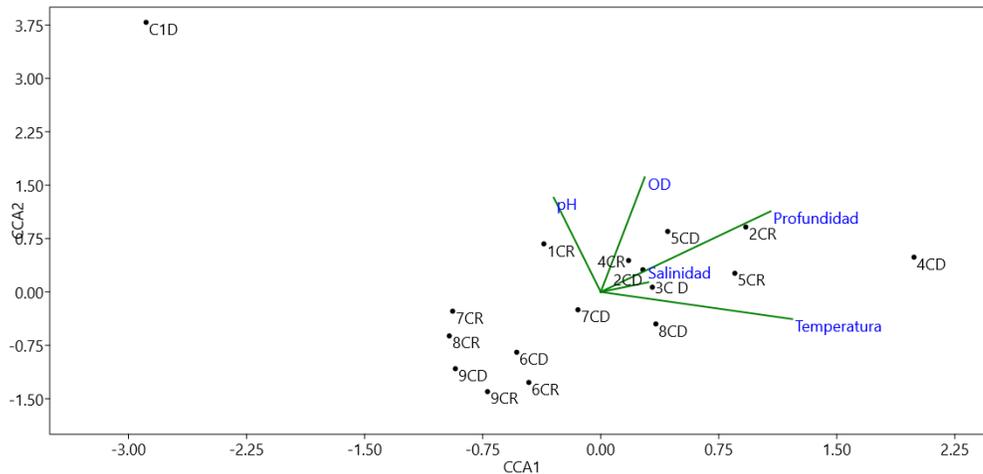
Generalmente, los mismos filos marcaron las diferencias entre las estaciones y los sistemas lagunares (moluscos, artrópodos, nematodos, cnidarios y cordados). Los artrópodos y cordados fueron los principales grupos que contribuyeron a la diferenciación entre regiones en ambos sistemas lagunares en ambas temporadas, seguidos por Nematoda y Cnidaria en C y por Mollusca, Cnidaria y Annelida en CH, según el análisis SIMPER de riqueza de abundancia relativa de MOTUs. En cuanto a los microeucariotas, el análisis SIMPER mostró que las diatomeas Stramenopile fueron las que más contribuyeron a la diferenciación entre regiones, seguidas de Alveolata (Apicomplexa, Ciliophora, Dinoflagellata y Protalveolata) y Rhizaria (principalmente, Cercozoa y en menor medida Rotaria) en C durante ambas temporadas, mientras que en CH el mayor aporte lo dieron los organismos pertenecientes al grupo SAR (Stramenopiles-Alveolata-Rhizaria), siendo Alveolata el que presentó los valores más altos, seguido de Stramenopiles y Rhizaria.

6.5. Variables ambientales y su efecto sobre la distribución biótica en ambos sistemas de lagunas  
Los metazoos mostraron una fuerte correlación con la salinidad ( $c=0,95$ ), la temperatura ( $c=-0,94$ ) y el pH ( $c=-0,83$ ) en CH; acá las variables que influyen en la estructura de la comunidad son la profundidad-temperatura-salinidad-pH (Sperman= 0.477) y de estas en mayor medida la salinidad (Sperman= 0.407). Mientras que C mostró un gradiente en la distribución de la comunidad en el sedimento influenciado por el pH ( $c=-0,86$ ) y la profundidad ( $c=-0,72$ ) en ambas estaciones (**Figura 20** y **Figura 21**). Acá las variables que influyen en la estructura de la comunidad son la profundidad-temperatura-pH (Sperman= 0.201) y de estas en mayor medida la temperatura (Sperman= 0.147).

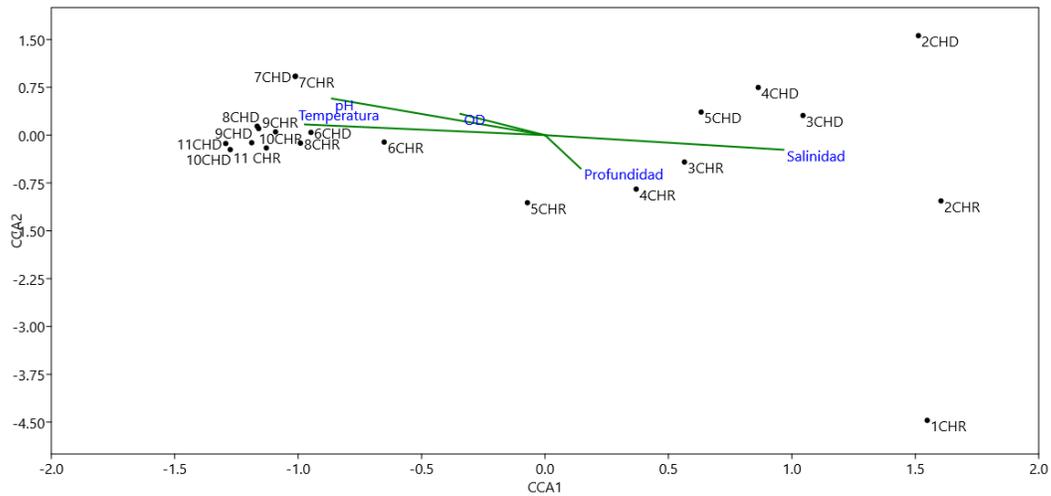
La composición de la comunidad microeucariótica mostró una mayor correlación con la temperatura ( $c = -0.97$ ), la salinidad ( $c = 0.96$ ) y el pH ( $c = -0.86$ ) en CH; donde variables que influyen en la estructura de la comunidad son la temperatura-pH (Sperman= 0.785), y en mayor medida la temperatura (Sperman= 0.773). C, mostró una mayor correlación de la distribución de organismos en las tres regiones con el pH ( $c = -0.92$ ) en ambas épocas del año. No obstante, las variables que influyeron en la estructura de la comunidad fueron la salinidad-OD (Sperman= 0.378), y de estas la salinidad en mayor medida (Sperman= 0.370). Sin embargo, la diferencia entre temporadas estuvo dada por la salinidad ( $c = -0.97$ ) y la temperatura ( $c = 0.96$ ), por lo que las áreas de la época seca presentaron valores de salinidad más altos que las áreas de la época lluviosa (**Figura 22** y **Figura 23**).



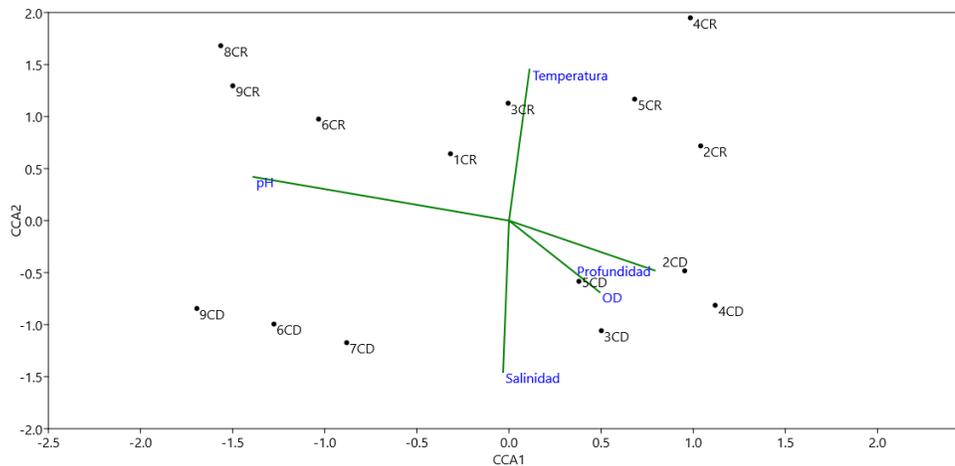
**Figura 20.** CCA para comunidades de metazoos identificadas en el sistemas lagunar Chacahua-Pastoría y sus características ambientales (profundidad, salinidad, temperatura, pH, OD) durante cada temporada. Chacahua-Pastoría; CHD: Chacahua-Pastoría temporada seca, CHR: Chacahua-Pastoría temporada lluviosa.



**Figura 21.** CCA para comunidades de metazoos identificadas en el sistema lagunar Corralero-Alotengo y sus características ambientales (profundidad, salinidad, temperatura, pH, OD) durante cada temporada. Corralero-Alotengo; CD: Corralero-Alotengo temporada seca, CR: Corralero-Alotengo temporada de lluvias.



**Figura 22.** CCA para comunidades de microeucariotas identificadas en el sistemas lagunar Chacahua-Pastoría y sus características ambientales (profundidad, salinidad, temperatura, pH, OD) durante cada temporada. Chacahua-Pastoría; CHD: Chacahua-Pastoría temporada seca, CHR: Chacahua-Pastoría temporada lluviosa.



**Figura 23.** CCA para comunidades de microeucariotas identificadas en el sistema lagunar Corralero-Alotengo y sus características ambientales (profundidad, salinidad, temperatura, pH, OD) durante cada temporada. Corralero-Alotengo; CD: Corralero-Alotengo temporada seca, CR: Corralero-Alotengo temporada de lluvias.

## 7. Discusión de resultados

El código de barras metagenómico ha revolucionado la detección de la biodiversidad en comunidades bénticas (Forster *et al.* 2016, Aylagas *et al.* 2018, Cronin-O'Reilly *et al.* 2018, Broman *et al.* 2019), y este estudio no es la excepción con una gran riqueza de metazoos y microeucariotas que se detectan por primera vez en estos dos sistemas de lagunas y en la región en general. La composición taxonómica obtenida aquí fue similar a la de otros estudios de metabarcodificación en ambientes bentónicos, donde las MOTUs más abundantes corresponden a artrópodos, moluscos, anélidos, ochrophyta, cercozoa y ciliophora (Lallias *et al.* 2015, Brannock *et al.* 2016b, Guardiola *et al.* 2016, Kim *et al.* 2017, Broman *et al.* 2019, Polinski *et al.* 2019). En estos sistemas de estudio, la recuperación de eDNA de los sedimentos reveló la presencia de grupos que suelen ser difíciles de identificar a simple vista, como la meiofauna, en particular los nematodos, y los microeucariotas (Barnes y Turner 2016, Holman *et al.* 2019). Se recuperó una riqueza mucho mayor de todos los filos en comparación con estudios previos realizados con taxonomía tradicional en estos sistemas de lagunas, que se enfocan en grupos específicos (Sánchez-Meraz y Martínez-Vega 2000, Angel-Pérez *et al.* 2007, Zamorano *et al.* 2010, Bastida-Zavala *et al.* 2013). Además, en comparación con muchos estudios moleculares, es probable que el enfoque utilizado del sedimento homogeneizado, combinado con la extracción de 10 g, haya capturado toda la diversidad eucariótica dentro de los sedimentos (Nascimento *et al.* 2018).

También, se detectaron especies que no habían sido reportadas previamente para el área, entre ellas se encuentran algunas especies no autóctonas y otras bioindicadoras de la salud del ecosistema. Se encontró el percebe *Amphibalanus eburneus*, una especie de artrópodo invasor nativo del Atlántico americano; aunque en el Pacífico mexicano ya se había reportado en el golfo de California, y más al sur (Galil *et al.* 2011, Rodríguez-Almaraz y García-Madrugal 2014), es la laguna de Corralero (este estudio) el registro más austral hasta el momento. Dentro de los copépodos, el género *Calanus* en CH se reporta por primera vez en el área; *Cletocamptus deitersi* había sido previamente reportada en sistemas lagunares costeros y en estuarios en la parte costera del norte del océano Pacífico mexicano en Sinaloa (Gómez *et al.* 2010); en el presente estudio se encontró únicamente en la laguna de Corralero. El género *Macrothrix* (Branchiopoda), es un género cosmopolita compuesto en su mayoría por especímenes de agua dulce y algunos otros que han incursionado en ambientes marinos, en plancton y bentos (asociados a lodo y escombros); también se ha encontrado en lagunas costeras y aguas abiertas, a menudo en la vegetación (Ciros Pérez *et al.* 1996, Fuentes-Reines *et al.* 2012, Thakur *et al.* 2013).

Aunque los microeucariotas no han sido estudiados a fondo en el área, existen registros de algunos dinoflagelados de los géneros *Alexandrium*, *Gymnodinium* y *Amphidinium* en el Pacífico mexicano, se sabe que estos causan intoxicación humana por la ingestión de mariscos, así como la mortalidad de peces y mamíferos marinos (Band-Schmidt *et al.* 2011, Maciel-Baltazar 2015); y en este estudio se han identificado por primera vez en estos sistemas lagunares, donde la pesca artesanal es el principal sustento de las comunidades indígenas. Algunos de los dinoflagelados encontrados aquí, en sedimentos arenosos marinos, intermareales o estuarinos, representan un riesgo para las actividades acuícolas (cría de camarón y engorde de peces en cautiverio), la megafauna marina y la salud humana (Murray *et al.* 2015, Gárate-Lizárraga *et al.* 2019), como es el caso de *Alexandrium leei*, *A. ostenfeldii*, *A. pohangense*, *Amphidinium klebsii*, *Prorocentrum triestinum* que se encontraron en este estudio, en su mayoría presentes en C, y previamente identificados en el norte del Pacífico mexicano (Okolodkov y Gárate-Izárraga 2006, Band-Schmidt *et al.* 2011). También se encontraron, *Lingulodinium polyedrum*, una especie cosmopolita bioluminiscente que habita aguas salobres en áreas costeras subtropicales (Maciel-Baltazar 2015), *L. polyedrum* especie con gran demanda de nutrientes (Cyril y Guy 2009) y otros dinoflagelados, como *Gonyaulax spinifera*, que pueden causar muerte a la fauna marina por medio del consumo de oxígeno en el ambiente (Cyril y Guy 2009); estos también fueron encontrados por primera vez en C y CH, aunque su presencia ya había sido documentada en otras regiones del Pacífico mexicano (Okolodkov y Gárate-Izárraga 2006, Varona-Cordero y Gutiérrez 2006, Maciel-Baltazar 2015). También, se encontraron otros dinoflagelados no tóxicos y herbívoros como, *Gyrodinium jinhaense*, *Pellucidodinium psammophilum* y *Nusuttodinium amphidinioides* (Onuma *et al.* 2015, Hyeon y Jin 2019). Los florecimientos de algas en estas lagunas pueden estar asociados a la resuspensión de quistes del sedimento a la columna de agua debido al dragado, contaminación antrópica, eutrofización e hipoxia que llega a estos cuerpos de agua (Elliott y Whitfield 2011).

La distribución de la diversidad biológica en estas lagunas tiene una fuerte relación con los parámetros ambientales, ambas lagunas muestran una transición de agua dulce a agua de mar a medida que se acerca a la desembocadura del sistema. Esta transición no solo se observa en los parámetros fisicoquímicos, siendo más evidente con la salinidad, sino también con la comunidad biológica que habita el sistema. La salinidad en estos cuerpos de agua es la característica ambiental que mayor efecto tiene sobre la biota (Sreenivasulu *et al.* 2015), sin embargo, se debe tener en cuenta que estas variables ambientales no necesariamente actúan de manera independiente sobre los organismos (Landa-Jaime 2003, Smyth y Elliott 2016). Se observaron claras diferencias en la riqueza de taxones entre las lagunas, siendo CH más rico en MOTUs de metazoos y microeucariotas que C. Los resultados muestran que, aunque los dos sistemas de lagunas son similares en términos de

composición de metazoos y microeucariotas, son diferentes en estructura, lo que resulta en una regionalización de la diversidad para CH. Esta regionalización es más clara en la estación seca y la salinidad parece ser el factor determinante en la composición de la comunidad. Los taxones dominantes que impulsaron esta diferencia entre regiones fueron los artrópodos (148 MOTUs), los cnidarios (33 MOTUs), los moluscos (32 MOTUs) y los anélidos (30 MOTUs). En otras lagunas costeras mexicanas, la diversidad de metazoos marinos (vertebrados e invertebrados) suele ser ligeramente mayor en grupos como moluscos, crustáceos y poliquetos (Contreras *et al.* 1998). Sin embargo, la menor diversidad presentada en C puede explicarse por las variadas condiciones ambientales debido a la poca profundidad y por la comunicación restringida con el mar, como se ha observado en las lagunas mediterráneas (Reizopoulou y Nicolaidou 2004). Claramente, para C la diversidad en la región cercana a la boca de la laguna fue mayor en las dos temporadas para los metazoos y microeucariotas. En CH se observa un claro predominio de especies marinas en microeucariotas, mientras que en metazoos predominan especies salobres. Los valores de los índices de diversidad tienden a disminuir a medida que aumenta el grado de confinamiento dentro de las lagunas; los valores más altos se registran adyacentes a los canales de comunicación con el medio marino (Reizopoulou y Nicolaidou 2004). Es bien sabido que la salinidad tiene un impacto en la riqueza de crustáceos (Rivera-Velázquez *et al.* 2008, Obolewski *et al.* 2018), moluscos (Gainey y Greenberg 1977, Landa-Jaime 2003, Baqueiro-Cárdenas *et al.* 2007) y cnidarios (Purcell *et al.* 2007), así como en la comunidad de microeucariotas, como Ochrophyta (diatomeas) (Nemcová *et al.* 2016). Existe una fuerte correlación entre la salinidad y la comunidad de protistas en estos ecosistemas, generando un gradiente en la diversidad (Sun *et al.* 2017, Li *et al.* 2018, Kataoka y Kondo 2019).

Si bien la composición de taxones en los dos sistemas es muy similar, se encuentran diferencias en el número total de MOTUs de metazoos y microeucariotas en los dos sistemas lagunares, que podría haber sido debido al esfuerzo de muestreo. Siendo el sistema protegido (CH) más diverso, con claras diferencias en la composición entre regiones debido a sus diferencias ambientales. Claramente, la región media de CH representa la transición, tanto fisicoquímica como biológica, entre los ambientes marino y salobre. En C ocurre lo contrario, donde las características ambientales son más homogéneas entre regiones en cada momento a lo largo del sistema lagunar. Esto puede deberse a la comunicación más restringida, y en consecuencia intercambio de agua con el mar que presenta C. Por lo tanto, cuando la boca de la laguna está cerrada, tiene una mayor influencia de agua dulce, lo que cambia drásticamente la configuración ambiental del sistema y consecuentemente la distribución de la comunidad biológica. Otro factor que puede afectar directamente la diversidad en C es el dragado realizado con alta periodicidad y la deposición de sedimentos en diferentes partes del sistema. El dragado mueve organismos de una región a otra,

provocando la pérdida de diversidad que suele proporcionar un entorno heterogéneo. Este efecto es más evidente en la comunidad de metazoos, que incluye grupos de importancia comercial y alimentaria, evidenciando los beneficios del estado parcial de conservación del sistema CH y la importancia de los sitios Ramsar.

Aunque la comparación entre estudios previos y el presente fue una de las principales preguntas de investigación para dar perspectiva a la eficiencia de la técnica de metacodificación de barras, esto ha resultado ser muy difícil debido a diversas razones. Estudios previos de biodiversidad en Chacahua se han enfocado principalmente en ciertas especies de invertebrados (poliquetos y moluscos), por lo que la comparación se limitaría solo a estos taxones (Zamorano *et al.* 2010, Chávez-López y Cruz-Gómez 2019). En segundo lugar, al hacer esta comparación de especies, encontramos solo unas pocas coincidencias de especies conspicuas como *Mytella strigata* (molusco de importancia comercial). Esto podría deberse principalmente a que, si bien a través de los años se han realizado varios esfuerzos para caracterizar la biodiversidad de estos grupos en el área, estos esfuerzos no han ido acompañados de la caracterización genética de los ejemplares, por lo que no se cuenta con una biblioteca de referencia de especies, razón por la cual, algunos de los aciertos de BLAST no podrían encontrar la especie exacta y darán el registro más cercano que tienen. Otra razón es que algunas de las especies han cambiado de nombre, por ejemplo, *Tryonia robusta* ahora es *Ipnobius robustus* y *Neritina granosa* ahora es *Neritona granosa*, estos cambios en la situación taxonómica son difíciles de identificar si no eres un especialista en el grupo. En cuanto a los poliquetos, ya se han registrado varios géneros en el Pacífico sur de México como *Branchiomma*, *Neanthes* y *Polydora*, pero incluyen numerosas especies que muy probablemente no han sido secuenciadas. Existen otros grupos de anélidos de la meiofauna que no han sido estudiados en absoluto en el Pacífico sur de México (*Doliodrilus*, *Thalassodrilides*, *Pontoscolex*, *Protodrilus*), siendo los presentes resultados sus primeros registros.

En conclusión, el metabarcoteo de eDNA de sedimentos ha demostrado la importante contribución a la lista de verificación de especies y grupos relevantes en lagunas costeras tropicales, y amplía la información contenida en las bases de datos para un área muy biodiversa. También, arroja luz sobre la dinámica espacio-temporal de este tipo de ecosistemas y revela la presencia de algunos grupos de metazoos y microeucariotas que no habían sido registrados en las lagunas costeras de México, como oligoquetos, rotíferos, nematodos, branquipodos, turbelarios, cestodos y briozoos. Aquí fue posible observar la regionalización de la diversidad en ambas lagunas en función de la distancia a la desembocadura (entrada de agua marina y cambios de salinidad). Si bien, se observan diferencias espaciales en los dos sistemas lagunares en dos temporadas diferentes, existe una clara

regionalización de la diversidad (en términos de grupos dominantes), lamentablemente al tener solo un grupo de muestras por temporada en cada sistema lagunar, estas diferencias no se pueden atribuir a patrones estacionales, se requeriría un muestreo periódico en varios años al mismo tiempo para confirmar esto. Aun así, se puede apreciar un componente temporal en ambos sistemas lagunares.

Sin embargo, las especies registradas en esta investigación y la reproducibilidad de esta técnica en futuros muestreos permitirán incrementar el conocimiento y seguimiento de la dinámica de la diversidad de estos ecosistemas, ya que algunos son de importancia pesquera, comercial y de bioprospección. También, es crucial monitorear la presencia de grupos no detectados previamente que podrían estar relacionados con el impacto antropogénico, como parásitos, especies invasoras y floraciones de algas tóxicas. Por todas estas razones, el metabarcoding resulta ser un medio bastante eficiente para monitorear la biodiversidad, brindando información rápida sobre la distribución y abundancia de especies en un mundo cambiante donde la tasa de pérdida y extinción parece ser superada por el conocimiento que tenemos de ella, especialmente en comunidades donde se encuentran organismos de tamaño pequeño (Thomsen *et al.* 2012, Thomsen y Willerslev 2015, Guardiola *et al.* 2016). No obstante, el metabarcoding de eDNA debe ir de la mano con la taxonomía tradicional para mejorar el desarrollo de bibliotecas de referencia de códigos de barras más precisas que permitan un biomonitorio y un inventario de especies más eficientes, especialmente en áreas de gran diversidad con potencial para encontrar nuevas especies (Miller *et al.* 2016).

### Capítulo 3

## Aproximación espacial y temporal de la diversidad de microorganismos (procariotas y hongos) en el sedimento de los sistemas lagunares costeros Chacahua-Pastoría y Corralero-Alotengo a partir de DNA ambiental y su relación con algunos pesticidas

### 1. Introducción

Las lagunas costeras, al ser ambientes con grandes fluctuaciones físicas y químicas favorecen la diversidad de comunidades microbianas, albergan microorganismos de agua dulce y marinos, grupos que pueden llegar al sedimento durante altas escorrentías, el cambio de mareas o que son propios de estos ambientes (Piccini *et al.* 2006, Haider *et al.* 2016). Estas características ambientales exigen una gran versatilidad fisiológica que permita la supervivencia de los microorganismos en estos entornos de transición de agua dulce y agua de mar (Sävström *et al.* 2016). Las comunidades microbianas bénticas que viven en ecosistemas costeros promueven la descomposición de la materia orgánica, la regeneración de nutrientes e influyen en las concentraciones de oxígeno disuelto en la columna de agua (Ortega-Arbulú *et al.* 2019). Los sedimentos albergan una amplia variedad de organismos bénticos, pero los microorganismos procarióticos son particularmente clave para llevar a cabo procesos biogeoquímicos esenciales en el ciclo natural de nutrientes, así como en el destino y comportamiento de los compuestos contaminantes (Obi *et al.* 2016). Varios parámetros fisicoquímicos influyen significativamente en la diversidad bacteriana de estos sistemas costeros, como la temperatura, la salinidad y los nutrientes disueltos (Haider *et al.* 2016).

Los procariotas bentónicos en las lagunas costeras son componentes clave del proceso de remineralización, permiten el reciclaje de los nutrientes necesarios para sostener la producción primaria garantizando un sistema amortiguador contra la acumulación de sulfuro en condiciones distróficas y representa una importante fuente trófica para los comederos bentónicos. Un factor importante que controla la eficiencia en la transferencia de detritos hacia niveles tróficos más altos está representado por la actividad procariota (Danovaro y Pusceddu 2007). Por su parte, los hongos en los sedimentos (micobentos), desempeñan un papel relevante en la degradación y remineralización de la materia orgánica que se encuentra en la interfaz tierra-mar. En zonas costeras se asocian y degradan material vegetal, la producción de biomasa fúngica resulta en fuente de alimento para organismos de mayor tamaño como moluscos y en ambientes bioturbados, suelen hacer parte de la comunidad microbiana inicial que los coloniza (Ortega-Arbulú *et al.* 2019).

Debido a la naturaleza de estos sistemas costeros, al presentar fuentes de agua dulce, se ven afectados por todo aquello que, en el recorrido de los ríos o arroyos que los alimenta se les incorpore,

como por ejemplo micro y macroorganismos, nutrientes, contaminantes, etc. En las zonas aledañas a distintas lagunas costeras en México y en general, se destaca la presencia de zonas de cultivo las cuales depositan sus desechos, pesticidas, por ejemplo, en las fuentes de agua que transitan cerca de ellos y que finalmente se depositan en las zonas costeras, como por ejemplo en las lagunas. Los pesticidas se pueden clasificar según sus mecanismos de acción; los insecticidas organoclorados, organofosforados y carbamatos actúan principalmente alterando la función del sistema nervioso. El mecanismo de acción de los pesticidas en especies microbianas puede no ser el mismo que para los organismos objetivo, se ha demostrado que los pesticidas interfieren con la respiración, la fotosíntesis y las reacciones biosintéticas, el crecimiento, la división y la composición molecular de las células (DeLorenzo *et al.* 2001).

## 2. Antecedentes

En las lagunas costeras mexicanas hasta el momento, se tienen estudios de la distribución de procariotas en el golfo de México. En la laguna la Mancha, en Veracruz, se estudiaron los cambios espaciotemporales de la microbiota anaerobia en el sedimento, más exactamente sobre las bacterias sulfatorreductoras (BSR) y las arqueas metanogénicas (AM). Las BSR y AM intervienen de manera conjunta en la mineralización de la materia orgánica en los sedimentos de la laguna, dominando la sulfatorreducción en la temporada de secas y la metanogénesis en la época de lluvias. Los cambios en el aporte fluvial y la precipitación en esta laguna afectaron significativamente la salinidad y el contenido de sulfatos, siendo los principales factores que regularon la dinámica de estos procariotas en los sedimentos lagunares (Torres-Alvarado 2016).

Por otro lado, en la laguna de Celestún se utilizó la secuenciación de alto rendimiento del gen 16S rRNA, para caracterizar la estructura y composición de la comunidad microbiana béntica de bacterias y arqueas a lo largo de tres zonas diferenciadas en la laguna. Dentro de sus resultados, se resalta la presencia de una amplia variedad de comunidades de bacterias y arqueas, en las cuales la diversidad alfa no varió significativamente a lo largo de las zonas oligohalina, marina y la mezcla para las bacterias, y solo la diversidad de arqueas fue significativamente mayor en la zona marina. Allí se encontraron 35 filos bacterianos, los más abundantes fueron Proteobacteria, Chloroflexi, Bacteroidetes y Planctomycetes, seguidos por Spirochaetae Acidobacteria, Actinobacteria, Cyanobacteria y Verrucomicrobia; para las arqueas se encontraron 12 filos, los dominantes fueron Euryarchaeota, Thaumarchaeota, Woesearchaeota (DHVEG-6), Bathyarchaeota y Lokiarchaeota (Cadena *et al.* 2019).

En algunas lagunas costeras mexicanas, en el golfo de México y en el golfo de California, se ha reportado la presencia de plaguicidas desde décadas atrás, siendo los principales DDT, DDD, DDE, y endosulfán sulfato en el caso de los organoclorados (OC), y en el caso de los organofosforados (OP), clorpirifós, paratión y malatión (Leal-Acosta *et al.* 2022). También, se ha reportado y estudiado el efecto de estos sobre algunos macroorganismos marino costeros e incluso en el plancton (Carvalho *et al.* 2002, González-Farías *et al.* 2002, Butler 2019, Leal-Acosta *et al.* 2022).

### 3. Hipótesis

La composición y distribución de procariotas y hongos dentro de los dos sistemas lagunares estudiados, estará regulada por el comportamiento de los parámetros ambientales de las lagunas durante la temporada de secas y lluvias. Si es así, se espera encontrar diferencias entre la riqueza y composición de ASVs de procariotas y hongos en las tres regiones de ambos sistemas lagunares: mayor abundancia en la región cerca a la boca de la laguna durante época de secas y en época de lluvias en la región media y lejana de la boca de la laguna. Lo anterior debido a la influencia de agua dulce, que se incrementa en época de lluvias en estos sistemas de lagunas.

Además, debido al incremento de la entrada de agua dulce a estos sistemas, la mayor correlación de la composición y distribución de hongos y bacterias estará dada con la salinidad.

### 4. Objetivos

#### 4.1. Objetivo general

Caracterizar y comparar la diversidad de procariotas (bacterias y arqueas) y hongos en el sedimento de los sistemas lagunares costeros Chacahua-Pastoría (CH-P) y Corralero-Alotengo (C-A) y evaluar su relación con los parámetros ambientales (físicoquímicos), en dos temporadas del año a través del uso de código de barras genético en muestras ambientales.

#### 4.2. Objetivos particulares

1. Caracterizar y comparar la diversidad, composición y estructura de la comunidad de procariotas y hongos en el sedimento en los sistemas lagunares Chacahua-Pastoría y Corralero-Alotengo en la zona costera del estado de Oaxaca.
2. Evaluar la relación de la estructura del ensamblaje de procariotas y hongos de estos sistemas lagunares con las variaciones de los parámetros ambientales en dos temporadas diferentes.

## 5. Materiales y métodos

### 5.1 Área de estudio: Ubicación de las estaciones y tipo muestreo

Se tomaron muestras de sedimento con una draga Petite Ponar en dos temporadas de muestreo en 2018, el primer período de muestreo fue durante la sequía, marzo (20 al 22) y abril (10 y 11) y el segundo durante la temporada de lluvias, septiembre (17 al 20). El área de estudio cubrió dos sistemas de lagunas costeras en el Pacífico sur mexicano, el primero es Chacahua-Pastoría (CH-P) (15° 57' 0.237" - 16° 03' 05.96" N y 97° 31' 57.15" - 97° 48' 01.01" O) que se encuentra dentro del Parque Nacional Lagunas de Chacahua y el segundo es el sistema Corralero-Alotengo (CA) (16° 11'-15 y 16° 16' 30" N y 98° 05' 00" y 98° 12' 30" O) (**Figura 11**). Cada laguna se dividió en diferentes zonas de acuerdo con las características fisicoquímicas (salinidad, temperatura, pH) y suelo (arena, barro), estas se definieron en estudios previos. En total hubo 11 zonas para CH-P y 9 zonas para C-A, en cada zona se tomaron tres muestras. Finalmente, estas áreas se integraron en regiones dentro de los mismos sistemas de lagunas. Estas regiones se definieron de acuerdo con la distancia a la boca de cada una. Se tomó la distancia total de cada cuerpo de laguna y se dividió en tres partes, lo que resultó en las regiones: cercana, media y lejana. Para C-A, cerca de (N): 0-4 km, medio (M): 4-8 km y lejos (F): 8-12 km; para CH-P, cerca de (N): 0-7 Km, medio (M): 7-14 Km y lejos (F): 14-21 Km. En cada sitio de muestreo, la profundidad, la salinidad, la temperatura, el pH y la concentración de oxígeno se midieron con un multiparámetro Hanna HI 9828. Todas las muestras se colocaron dentro de bolsas Ziploc® y se almacenaron bajo hielo hasta su llegada al laboratorio. Cada muestra se homogeneizó con una licuadora de cocina, la licuadora se limpió con hipoclorito de sodio entre cada una, finalmente, las muestras se almacenaron a -20°C hasta la extracción de ADN.

### 5.2 Extracción de ADN y secuenciación

Para las extracciones de ADN, se procesaron 10 g de cada muestra de sedimento homogeneizado con el kit de extracción de ADN PowerMax (QIAGEN, Valencia, CA, EE. UU.) De acuerdo con las instrucciones del fabricante, el ADN se resuspendió en un volumen final de 5 ml. El tamaño del ADN se confirmó con electroforesis en gel y cada muestra se cuantificó con un Nanodrop 2000.

En la identificación de procariotas (bacterias y archaeas) se usaron los cebadores 515F-Y-ill (5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGANNHNNNNWNNNH **GTGYCAGCMGCCGCGGTAA**-3') y 806mod-ill (5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGT **GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3'**), aquí se amplificó la región V4 del gen 16S RNA (Walters *et al.* 2015). Por su parte, para los hongos se amplificó la región ITS2 con una PCR anidada, cebadores ITS1f (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') y ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') para

amplificar la región completa de ITS, y para la región ITS2 se usaron los cebadores gITS7-ill (5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGANNHNNNWNNNHGTGARTCATC **GARTCTTTG-3'**) y ITS4-ill (5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGT **CCTCCGCTTATTGATATGC-3'**) (Ihrmark *et al.* 2012). Las amplificaciones de los genes 16S e ITS se realizaron a un volumen final de 25 µl, con 0.125 de ADN polimerasa Flexi GoTaq G2 (Promega) 5 U / µl, 0.5 µl de 0.2 Mm de cada cebador, 5 µl de buffer 1X, 2 µl de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 µl de dNTPs 10 Mm y 1.5 µl de ADN. Para el gen 16S, las condiciones de PCR consistieron en un paso de activación de la polimerasa de 5 minutos a 94 °C, 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 60 s, alineamiento a 53 °C durante 45 s y alargamiento a 72 °C durante 90 s, la extensión final fue de 72 °C por 7 min. Para la región completa del gen ITS, las condiciones de PCR fueron las siguientes, un paso de activación de la polimerasa por 5 minutos a 94 °C, 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, alineamiento a 55 °C durante 45 s y alargamiento a 72 °C durante 90 s, la extensión final fue por 72 °C por 7 min; en el caso de la región ITS2, un paso de activación de la polimerasa por 5 minutos a 95 °C, 35 ciclos de desnaturalización 94 °C durante 30 s, alineamiento a 55 °C durante 45 s y alargamiento a 72 °C durante 90 s, la extensión final fue por 72 °C por 10 min.

Los productos de PCR se purificaron con perlas Agencourt® AMPure® a una concentración de 0,8x perlas por muestra. La concentración de ADN de los productos de PCR se midió en un lector de microplacas FLUOstar Omega® utilizando el sistema dsDNA QuantiFluor® (Promega, Reino Unido). Los amplicones 16S e ITS se agruparon en concentraciones equimolares y la indexación se realizó utilizando el kit de códigos de barras Illumina NextEra según las instrucciones del fabricante. Las bibliotecas indexadas se agruparon, cuantificaron y diluyeron a 4pM y se ejecutaron en Illumina Miseq usando el kit de secuenciación V3 2x 300bp Illumina (Illumina®).

### 5.3 Bioinformática y análisis estadísticos

Los archivos fastq, con códigos de barras y adaptadores eliminados previamente, se usaron para ejecutar el pipe line Dada2 en R (Versión 4.2.1). Después de hacer el filtro de calidad y de unir las secuencias, se hizo una tabla de secuencias para posteriormente eliminar las quimeras. En la asignación taxonómica para bacterias se utilizó la base de datos Silva, silva\_nr\_v128\_train\_set.fa.gz, y para la asignación de especies la base de datos silva\_species\_assignment\_v128.fa.gz. Para los hongos se utilizó la base de datos UNITE ITS (sh\_general\_release\_dynamic\_29.11.2022.fasta).

Con los archivos obtenidos de la clasificación taxonómica, los datos ambientales y la distribución de ASVs, se creó un objeto phyloseq para hacer el análisis estadístico usando *Phyloseq* (Versión 1.4.0.) (McMurdie y Holmes 2013), en R. Para cada sistema lagunar, las muestras correspondientes a cada zona se unieron y las abundancias se ajustaron por zona. En total para Chacahua- Pastoría se contó

con ocho zonas y para Corralero-Alotengo con cuatro zonas, para cada una de las temporadas. Para bacterias la rarefacción se hizo a 3059 secuencias y para hongos con 7406. Para la diversidad alfa, se analizó la riqueza (S) de las MOTUs. También, se aplicó un análisis de ANOVA de una vía para determinar si las diferencias entre estas medidas de diversidad fueron significativas.

Para determinar las diferencias en la composición biológica de los sistemas, se ejecutó un PERMANOVA (Anderson 2017) en R. Cada conjunto de datos se transformó en presencia / ausencia. Posteriormente se aplicó una prueba de similitud *Jaccard* a cada matriz, con el resultado de la semejanza se aplicó un diseño PERMANOVA de 3 factores, temporada (seca y lluvia), sistema de lagunas (CH y C) y región (distancia a la boca: cerca, medio y lejos). Estos análisis se realizaron con 999 permutaciones y una  $p < 0.05$ . La región estaba anidada en el sistema de lagunas. Posteriormente, con el fin de visualizar y explorar la relación entre los datos biológicos y los parámetros ambientales, se hizo un análisis de correspondencia canónica (ACC) en R y la librería *Vegan* v.2.6-4, con las abundancias rarificadas de ASVs y los 5 parámetros ambientales evaluados para los dos sistemas lagunares (salinidad, temperatura, DO, pH y profundidad). Y se para identificar las variables ambientales más importantes que influyen en la estructura de las comunidades se hizo un análisis BEST (Bio-Env) en Primer 6. Se realizó un análisis SIMPER para obtener los grupos de especies responsables de las diferencias entre los factores que mostraron diferencias significativas en el PERMANOVA.

También, para 13 muestras de CH, divididas entre Chacahua y Pastoría, se analizaron los valores de la concentración de plaguicidas en el sedimento, evaluados por Aguilar Jiménez (2021), y se correlacionaron con la distribución de la comunidad de procariontes y hongos aquí estudiada. Los pesticidas analizados fueron: p,p'-DDE, p,p'-DDD, p,p'-DDT, Dieldrín, Endrín, Endrín Aldehído, Endosulfán  $\alpha$ , Endosulfán  $\beta$ , Endosulfán Sulfato, Heptacloro, HCH  $\alpha$ , HCH  $\beta$ , HCH Lindano, Metoxicloro y Materia orgánica (MO); estos datos se obtuvieron del estudio de Leal-Acosta *et al.* 2022.

## 6. Resultados

### 6.1. Métricas de secuencias

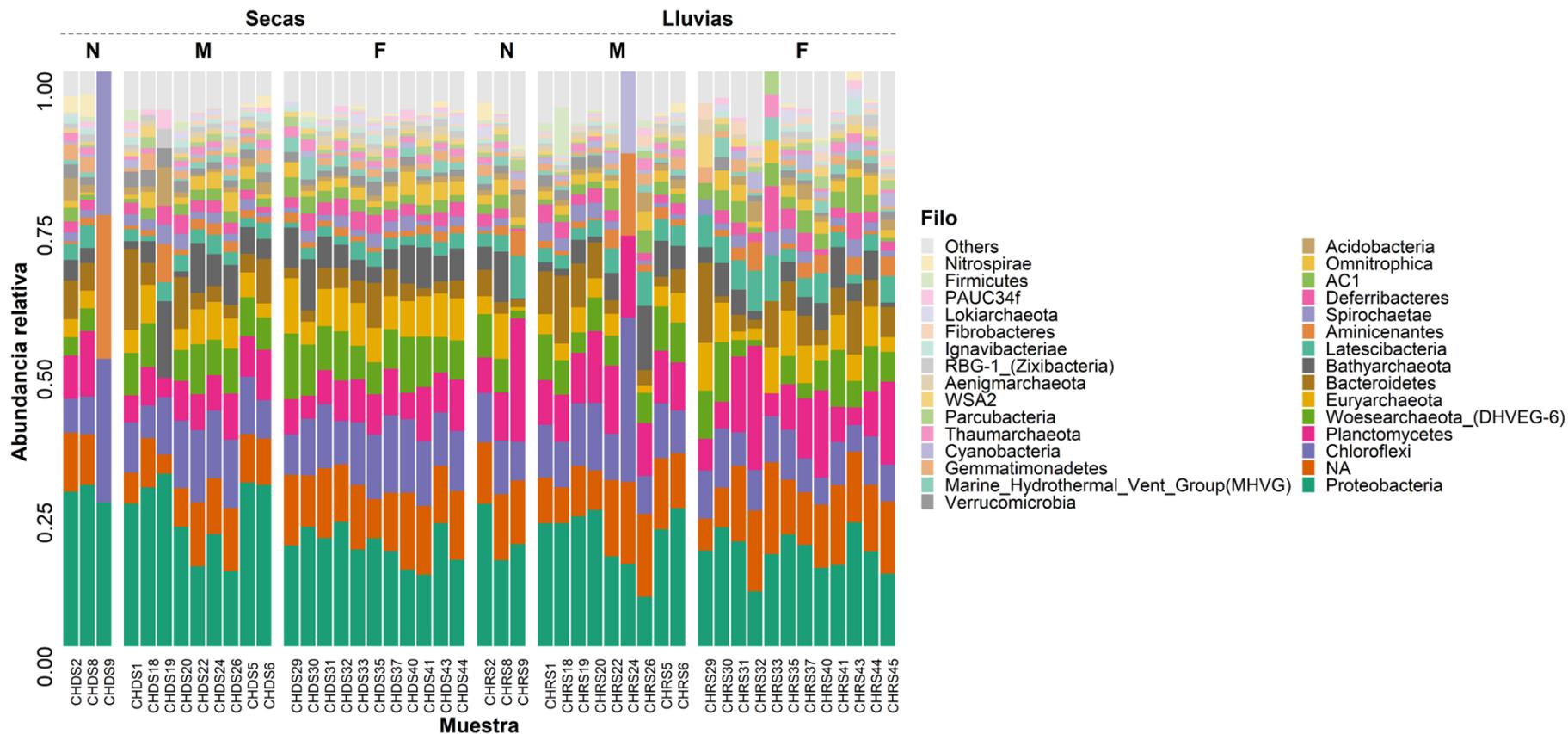
Para los dos marcadores se analizaron 71 muestras, cuatro para C y ocho para CH, en cada una de las dos temporadas climáticas. Para 16S el número inicial de secuencias fue de 1 016 377, después de la unión de secuencias paired-end, la eliminación de lecturas cortas y de baja calidad, el número final fue de 565 319 (55.6 %). En el caso de el gen ITS, la cantidad de secuencias iniciales fue de 1 824 257, después de la limpieza de lecturas cortas y de baja calidad, el número final fue de 1467 662 (80.5 %).

## 6.2. Composición taxonómica y diversidad alfa en los dos sistemas lagunares costeros *Bacterias y Arqueas*

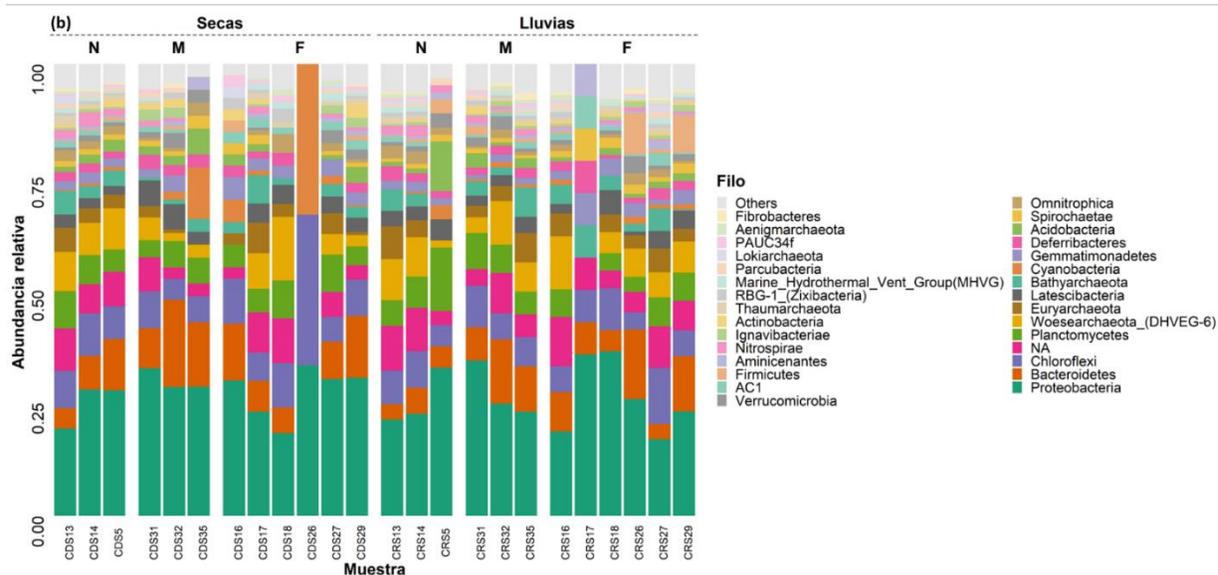
Para las bacterias, Proteobacteria (32.1 +/- 9.6 % ASVs) dominó en los dos sistemas lagunares durante las dos temporadas estudiadas, seguido de Chloroflexi (9.8 +/- 3.1 % ASVs), Bacteroidetes (7.8 +/- 10.0% ASVs), Planctomycetes (4.9 +/- 2.0 % ASVs) y Latescibacteria (2.7 +/- 1.2 % ASVs) . En el caso de las arqueas, Euryarchaeota (5.6 +/- 3.2 % ASVs) dominó, seguido de Bathyarchaeota (5.3 +/- 3.2 % ASVs) y Woesearchaeota\_(DHVEG-6) (2.5 +/- 1.3 % ASVs) (**Figura 24** y **Figura 25**).

Dentro de las bacterias, las familias con mayor cantidad de ASVs fueron Anaerolineaceae, Desulfobacteraceae, Spirochaetaceae, Planctomycetaceae, Desulfarculaceae y Saprospiraceae. En el caso de las arqueas, la mayor cantidad de ASVs fue para Marine\_Benthic\_Group\_D\_and\_DHVEG-1, CCA47, 20c-4 y AMOS1A-4113-D04.

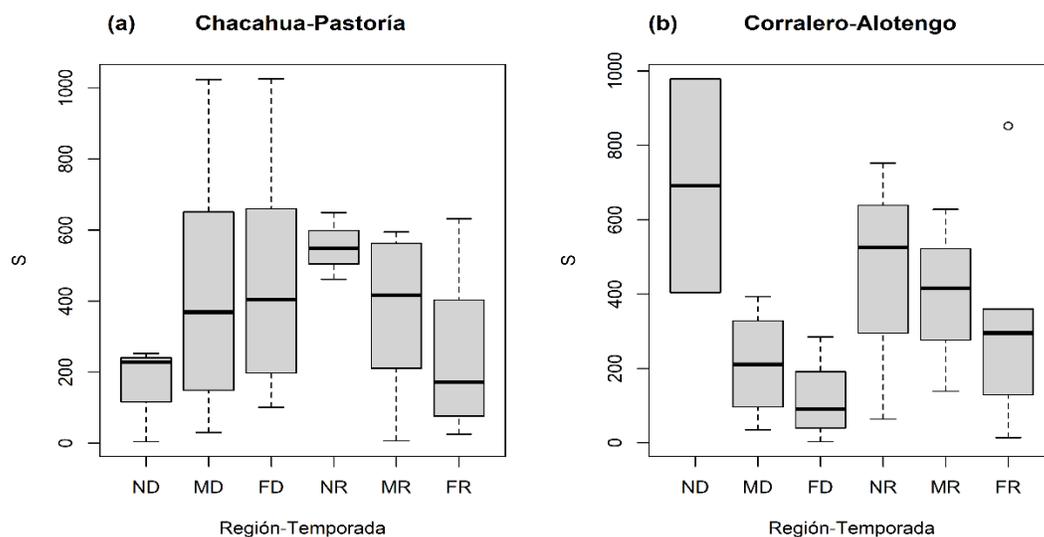
De los 10 130 ASVs identificados en las muestras evaluadas, en CH se encontraron 17 314 veces y en C se hallaron 7551 veces, de un total general de 24 716 presencias. La riqueza total de ASVs obtenida en estas muestras fue cercana a la sugerida por los estimadores de riqueza (Chao = 24551.28, Jackknife1 = 16551.27, Jackknife2 = 21491.78 y Bootstrap = 12739.28), entre el 41.3 % y el 79.5 %. Hubo una tendencia de mayor riqueza hacia la región media y lejana a la boca del sistema lagunar durante la temporada de secas y una riqueza mayor en la región cercana a la boca de la laguna en lluvias, para CH; mientras que en C la región más cercana a la boca presentó mayor riqueza en secas y lluvias. Se encontraron diferencias significativas entre las regiones de C en secas (ANOVA,  $F_{2,9} = 7.8$ ,  $p = 0.0108$ ), específicamente entre las regiones cercana y media (Tukey HSD,  $p = 0.0317$ ) y cercana y lejana (Tukey HSD,  $p = 0.0087$ ). Para CH, en lluvias hubo diferencias significativas entre la riqueza de las regiones (ANOVA,  $F_{2,21} = 3.5$ ,  $p = 0.0488$ ), más exactamente entre la región cercana y la lejana (Tukey HSD,  $p = 0.0496$ ) de la boca de la laguna (**Figura 26**). La riqueza de ASVs, mostró una correlación moderada y no significativa para el OD (Pearson,  $r = 0.55$ ,  $p = 0.094$ ) y el pH (Pearson,  $r = 0.259$ ,  $p = 0.277$ ), en Chacahua-Pastoría; en Corralero-Alotengo las mayores correlaciones significativas de la riqueza y los factores ambientales, se presentaron con la profundidad (Pearson,  $r = 0.822$ ,  $p = 0.008$ ), la temperatura (Pearson,  $r = 0.754$ ,  $p = 0.001$ ) y la salinidad (Pearson,  $r = -0.5292654$ ,  $p = 0.005$ ).



**Figura 24.** Abundancia absoluta de ASVs de fillos de bacterias y arqueas obtenidos a partir de bibliotecas de amplicones del gen 16S generadas a partir de sedimentos recolectados del sistema lagunar Chacahua-Pastoría, en temporada de secas y lluvias a lo largo de tres regiones del sistema lagunar; N: Cercana, M: Media y F: Lejana.



**Figura 25.** Abundancia absoluta de ASVs de fillos de bacterias y arqueas obtenidos a partir de bibliotecas de amplicones del gen 16S generadas a partir de sedimentos recolectados del sistema lagunar Corralero-Alotengo, en temporada de secas y lluvias a lo largo de tres regiones dentro del sistema lagunar; N: Cercana, M: Media y F: Lejana.



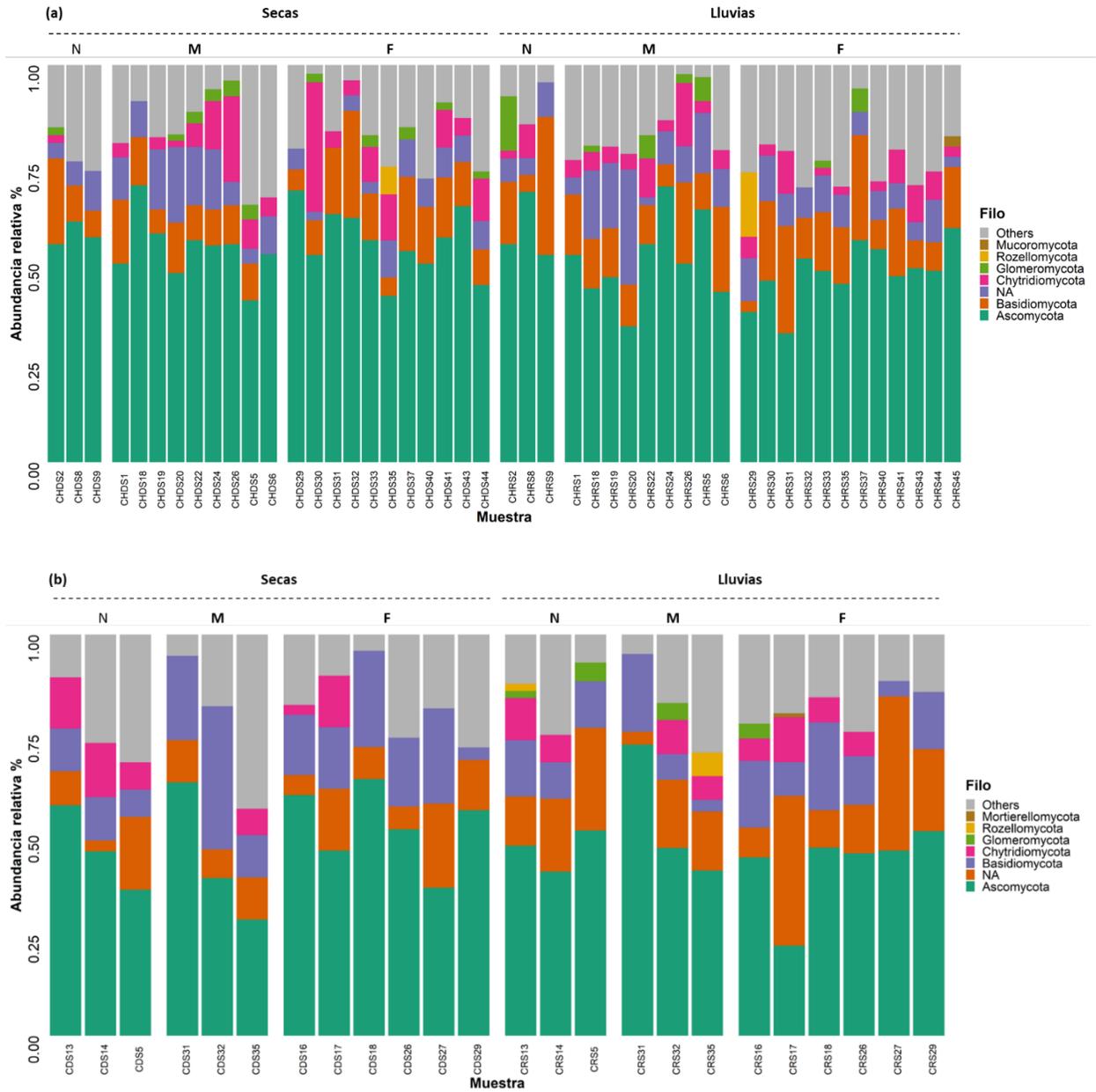
**Figura 26.** Diagramas de caja para comparaciones de diversidad alfa-riqueza (S) de comunidades de procariontas (bacterias y arqueas), en los sistemas lagunares Chacahua-Pastoría y Corralero-Alotengo. En el eje x (Región-Temporada) la primera letra indica la región (N=cerca, M=media y F= lejana) y

la segunda letra indica la estación (D= secas y R= lluvias). En el eje Y se representa la riqueza de ASVs.

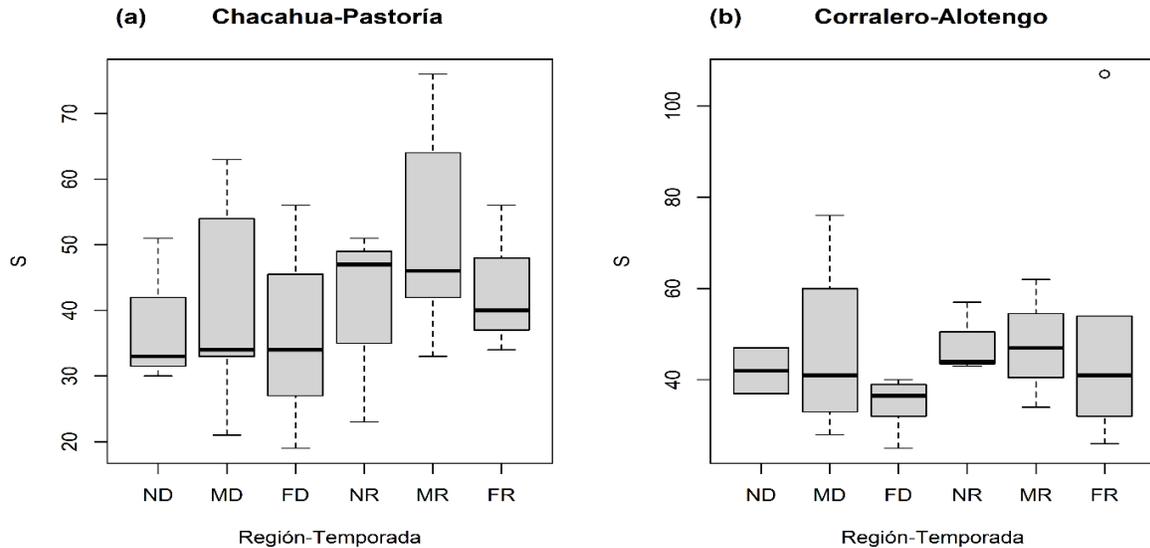
### *Hongos*

En el caso de los hongos, Ascomycota (50.9 +/- 9.8 % ASVs) dominó en los dos sistemas lagunares durante las dos temporadas estudiadas, seguido de Fungi\_phy\_Incertae\_sedis (18.3 +/- 9.2 % ASVs), Basidiomycota (13.2 +/- 7.2 % ASVs) y Glomeromycota (1.13 +/- 2.2 % ASVs) (**Figura 27**). Las familias con mayor cantidad de ASVs fueron Fungi\_fam\_Incertae\_sedis (8.1 +/- 5.5 % ASVs), Phaeosphaeriaceae (2.9 +/- 1.2 % ASVs), Chytridiomycota\_fam\_Incertae\_sedis (2.4 +/- 2.7 % ASVs), Agaricomycetes\_fam\_Incertae\_sedis (1.9 +/- 1.4 % ASVs) y Pyronemataceae (1.9 +/- 0.5 % ASVs).

De los 1023 ASVs identificados en las muestras evaluadas, en CH se encontraron 1995 veces y en C se hallaron 1067 veces, de un total general de 3062 presencias. La riqueza total de ASVs obtenida en estas muestras fue cercana a la sugerida por los estimadores de riqueza (Chao = 4611.75, Jackknife1 = 1793.98, Jackknife2 = 2473.49 y Bootstrap = 1322.02), entre el 22.18 % y el 77.38 %. Hubo una tendencia de mayor riqueza hacia la región media y lejana a la boca del sistema lagunar durante la temporada de secas y lluvias para CH; en el caso de C, se presentó la misma tendencia que en CH en temporada de secas, sin embargo, en lluvias las regiones cerca y media a la boca de la laguna presentaron una riqueza similar difiriendo de la región lejana con una riqueza mayor. No obstante, no se encontraron diferencias significativas entre las regiones de C ni CH en secas y lluvias, y tampoco entre los dos sistemas lagunares (ANOVA  $p > 0.05$ ) (**Figura 28**). La riqueza de ASVs, mostró una correlación moderada y significativa para el pH (Pearson,  $r = -0.56$ ,  $p = 0.27$ ) y OD (Pearson,  $r = -0.52$ ,  $p = 0.01$ ) y el, en Chacahua-Pastoría; en Corralero-Alotengo las mayores correlaciones significativas de la riqueza y los factores ambientales, se presentaron con la salinidad (Pearson,  $r = -0.56$ ,  $p = 0.01$ ), el pH (Pearson,  $r = -0.54$ ,  $p = 0.003$ ) y la temperatura (Pearson,  $r = 0.48$ ,  $p = 0.11$ ).



**Figura 27.** Abundancia relativa de ASVs de filos de hongos obtenidos a partir de bibliotecas de amplicones del gen 16S generadas a partir de sedimentos recolectados de los sistemas lagunares (a) Chacahua-Pastoría y (b) Corralero-Alotengo, en temporada de secas y lluvias a lo largo de tres regiones dentro de cada sistema lagunar; N: Cercana, M: Media y F: Lejana.



**Figura 28.** Diagramas de caja para comparaciones de diversidad alfa-riqueza (S) de comunidades de hongos, en los sistemas lagunares Chacahua-Pastoría y Corralero-Alotengo. En el eje x (Región-Temporada) la primera letra indica la región (N=cerca, M=media y F=lejana) y la segunda letra indica la estación (D= secas y R= lluvias). En el eje Y se representa la riqueza de ASVs.

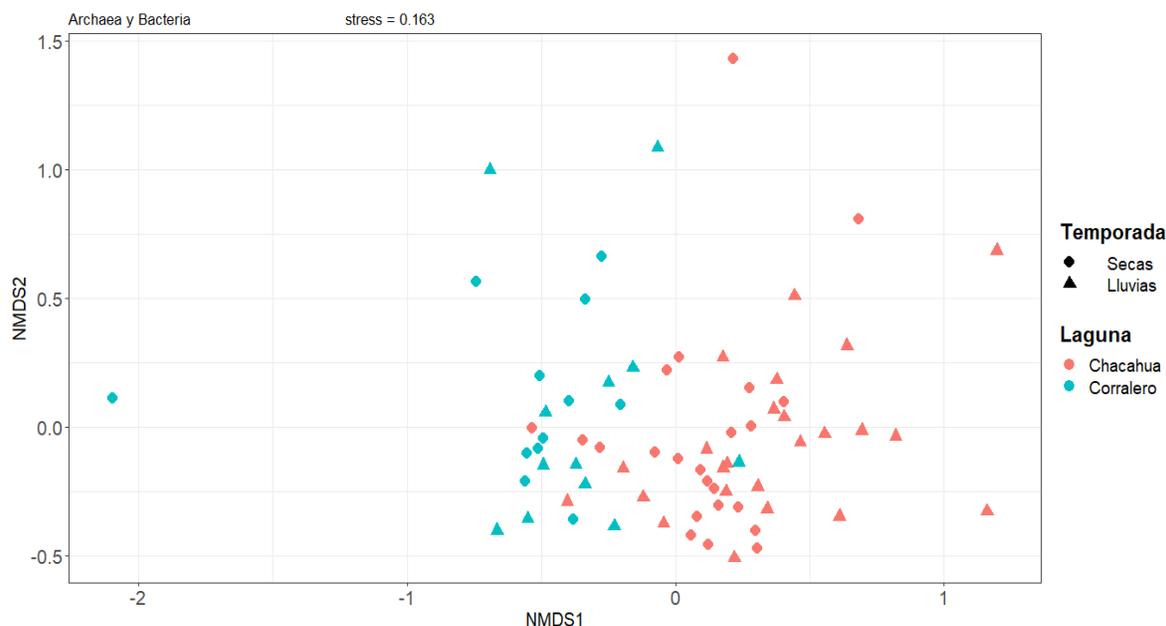
### 6.3. Composición y estructura de las comunidades de procariontas y hongos en los dos sistemas lagunares costeros

#### *Bacterias y Arqueas*

La composición de la comunidad de procariontas de los sistemas lagunares basada en la presencia/ausencia de taxa mostró que no hay diferencias entre temporadas para el conjunto de datos de las dos lagunas (PERMANOVA  $p > 0.05$ ); sin embargo, sí las hay entre los dos sistemas lagunares (PERMANOVA  $df = 1$ ,  $F = 1.6671$ ,  $p = 0.005$ ) y entre un mismo sistema lagunar de secas a lluvias (PERMANOVA  $df = 1$ ,  $F = 1.5052$ ,  $p = 0.018$ ) (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). En el caso de C, la composición de bacterias y arqueas fue similar entre temporadas, regiones y las mismas regiones en las dos temporadas (PERMANOVA  $p > 0.05$ ). Para CH, las diferencias se encontraron entre temporadas (PERMANOVA  $df = 1$ ,  $F = 1.6372$ ,  $p = 0.004$ ) y regiones (PERMANOVA  $df = 2$ ,  $F = 1.5707$ ,  $p = 0.001$ ), al comparar la misma región entre las dos temporadas no se encontraron diferencias (PERMANOVA  $p > 0.05$ ).

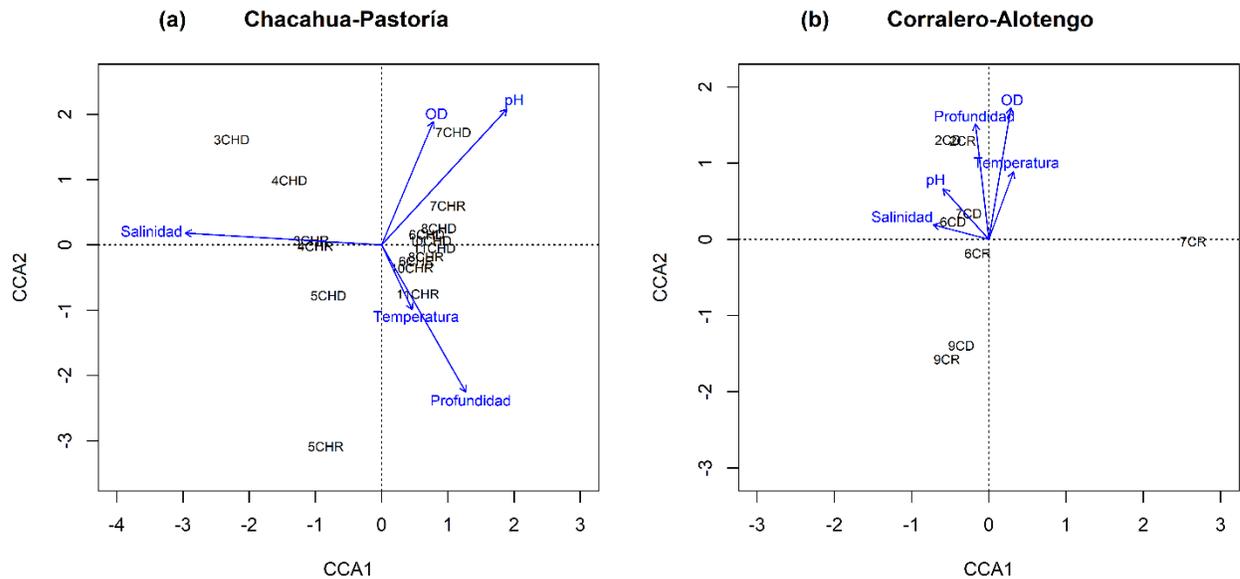
Según el análisis SIMPER, los filos bacterianos que causaron la diferenciación entre los dos sistemas lagunares fueron Proteobacteria, Chloroflexi, Bacteroidetes, Omnitrophica, Deferribacteres, Spirochaetae, con mayor presencia en CH, y Planctomycetes y Aminicenantes con mayor presencia

en C. Para las arqueas, Woearchaeota.DHVEG.6, Euryarchaeota, Bathyarchaeota mostraron mayor presencia en Chacahua.



**Figura 29.** NMDS para comunidades de bacterias y arqueas identificadas en los sistemas lagunares Corralero-Alotengo y Chacahua-Pastoría en ambas temporadas. Se muestra el valor de estrés. Para esta representación se aplicó la transformación de presencia/ausencia y la prueba de similitud de Jaccard.

La composición de la comunidad de procariotas mostró una fuerte correlación con la salinidad ( $c = -0.97$ ) y el pH ( $c = 0.62$ ) en CH, igualmente en C la mayor correlación con la distribución de estos microorganismos fue con la salinidad ( $c = -0.40$ ) y el pH ( $c = -0.33$ ) (**Figura 30**). Acá, las variables que influyen en la estructura de la comunidad de bacterias y arqueas son para CH, la salinidad-temperatura-profundidad (Sperman= 0.582) y de estas en mayor medida la salinidad (Sperman= 0.571). Para C, son la salinidad-temperatura (Sperman= 0.993) y de estas en mayor medida la salinidad (Sperman= 0.981).

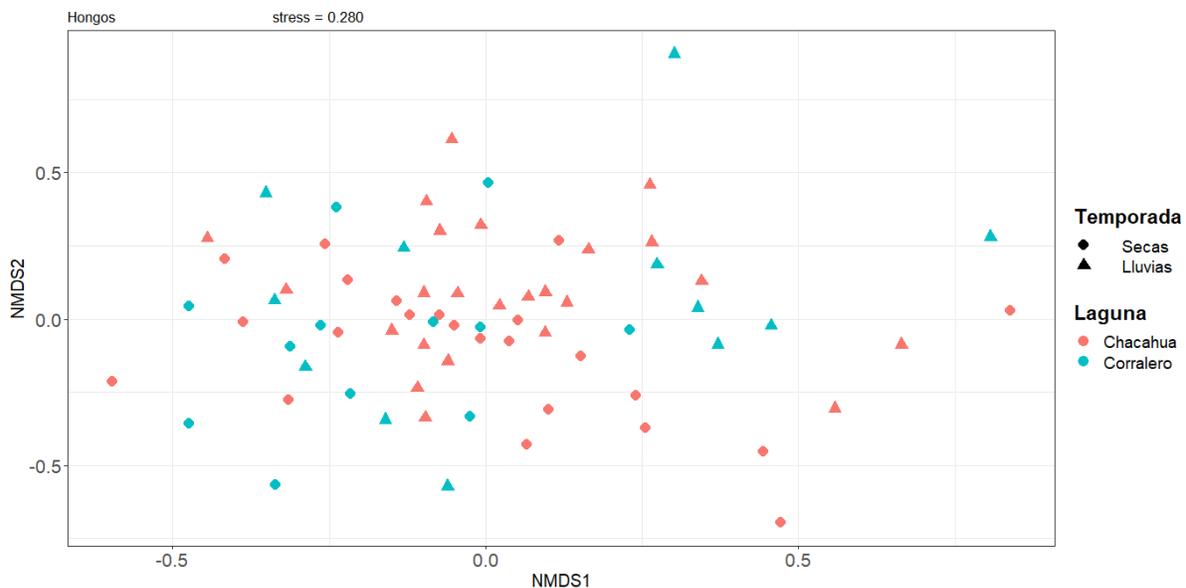


**Figura 30.** CCAs para la comunidad de procariotas y sus características ambientales en los sistemas lagunares Corralero-Alotengo y Chacahua-Pastoría durante cada temporada. (a) Chacahua-Pastoría. (b) Corralero-Alotengo. El número de cada muestra hace referencia a cada una de las zonas en las diferentes regiones de los sistemas lagunares.

### Hongos

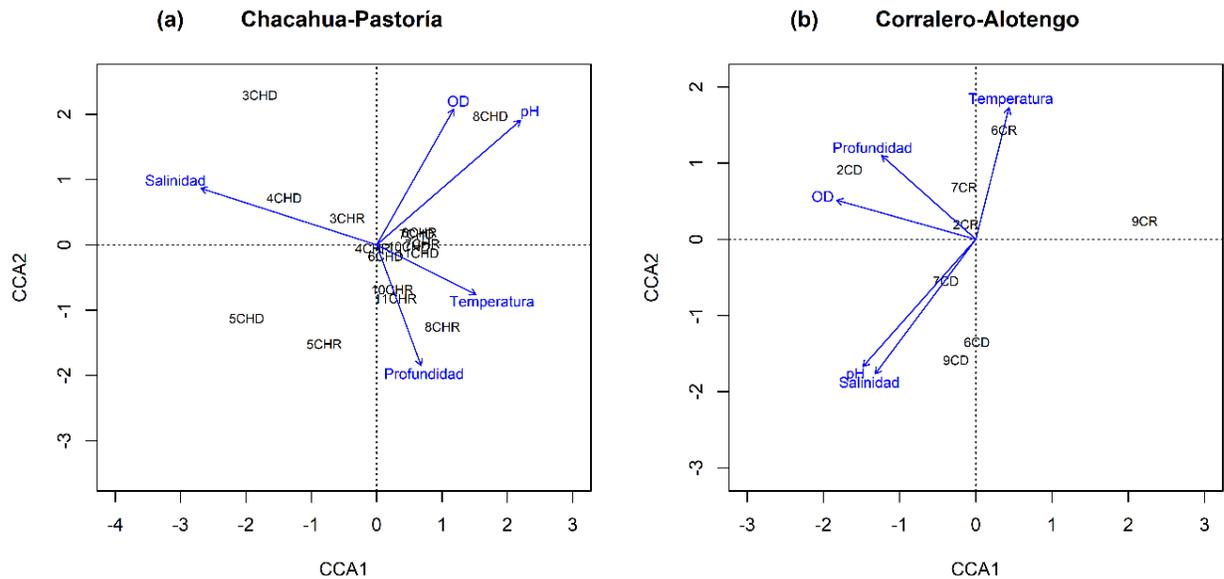
La composición de la comunidad de hongos de los sistemas lagunares basada en la presencia/ausencia de taxa mostró que entre temporadas no hay diferencias para C (PERMANOVA  $p > 0.05$ ), pero sí entre CH (PERMANOVA  $df = 1$ ,  $F = 1.2405$ ,  $p = 0.013$ ) (**Figura 31**). En el caso de C, la composición de hongos fue similar entre temporadas, regiones y las mismas regiones en las dos temporadas (PERMANOVA  $p > 0.05$ ). Sin embargo, para CH las diferencias se encontraron entre temporadas (PERMANOVA  $df = 1$ ,  $F = 1.2405$ ,  $p = 0.013$ ) y regiones (PERMANOVA  $df = 2$ ,  $F = 1.1694$ ,  $p = 0.012$ ), al comparar la misma región entre las dos temporadas no se encontraron diferencias (PERMANOVA  $p > 0.05$ ).

El análisis SIMPER, mostró que los filos de hongos que causan la diferenciación entre los dos sistemas lagunares fueron Fungi\_phy\_Incertae\_sedis, Basidiomycota y Rozellomycota, con mayor presencia en CH; y Ascomycota y Chytridiomycota en C.



**Figura 31.** NMDS para comunidades de hongos identificadas en los sistemas lagunares Corralero-Alotengo y Chacahua-Pastoría en ambas temporadas. Se muestra el valor de estrés. Para esta representación se aplicó la transformación de presencia/ausencia y la prueba de similitud de Jaccard.

La composición de la comunidad de hongos mostró una fuerte correlación con la salinidad ( $c = -0.80$ ), el pH ( $c = 0.65$ ) y el OD ( $c = 0.62$ ), en CH. Para C, la mayor correlación fue con el OD ( $c = -0.78$ ), la salinidad ( $c = -0.76$ ), la temperatura ( $c = 0.74$ ) y el pH ( $c = -0.72$ ) (**Figura 32**). Acá, la variable que influye en la estructura de la comunidad de hongos es para CH, la temperatura-salinidad-pH (Sperman= 0.248), de estas en mayor medida la temperatura (Sperman= 0.265). Para C, es la salinidad (Sperman= 0.366).



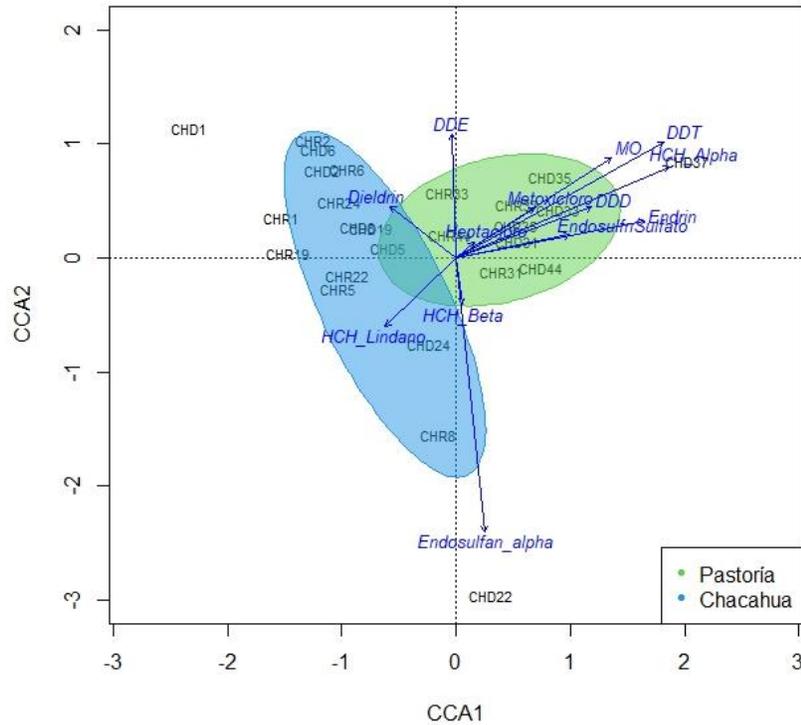
**Figura 32.** CCAs para la comunidad de hongos y sus características ambientales en los sistemas lagunares Corralero-Alotengo y Chacahua-Pastoría durante cada temporada. (a) Chacahua-Pastoría. (b) Corralero-Alotengo. El número de cada muestra hace referencia a cada una de las zonas en las diferentes regiones de los sistemas lagunares.

#### 6.4. Distribución de la comunidad de bacterias y hongos en Chacahua y Pastoría y su relación con la presencia de pesticidas en el sedimento de las lagunas

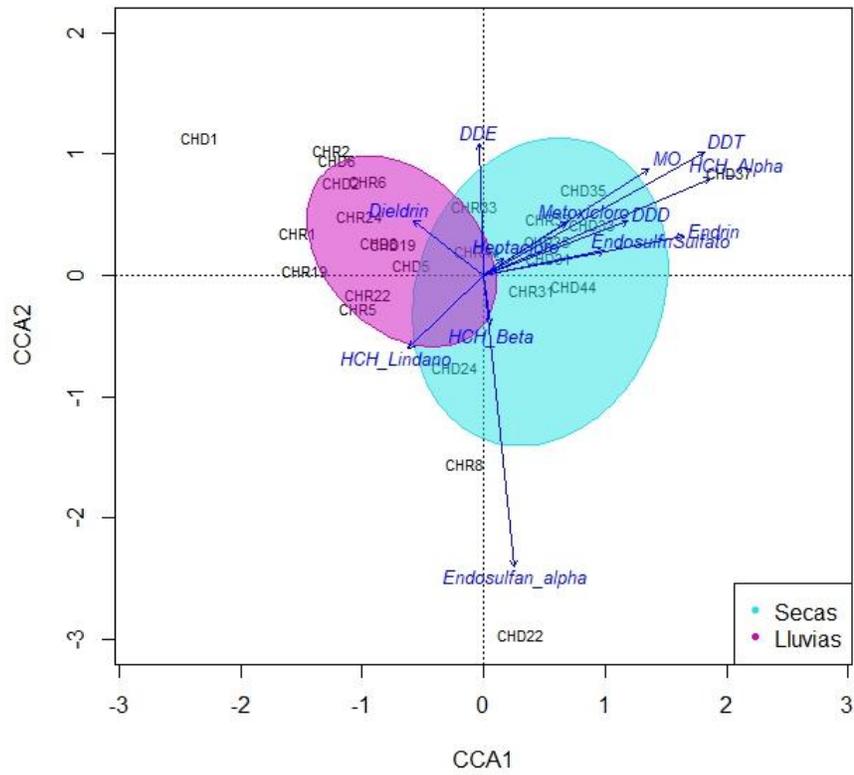
La composición de la comunidad de procariontes mostró una fuerte correlación con el endosulfán  $\alpha$  ( $c = -0.84$ ), el HCH  $\alpha$  ( $c = 0.66$ ), el DDT ( $c = 0.63$ ) y el endrín ( $c = 0.58$ ), en temporada de secas y en general para la laguna Pastoría, permitiendo diferenciar así los grupos de muestras para las dos temporadas y para las dos lagunas dentro del sistema (**Figura 33** y **Figura 34**). De estos contaminantes la variable que influye en la estructura de la comunidad de procariontes es el complejo DDE-Endrín- endosulfán  $\alpha$ -Heptacloro-HCH Lindano (Sperman= 0.282) y de estos el HCH Lindano en mayor medida (Sperman= 0.126).

Por su parte, la comunidad de hongos tuvo una fuerte correlación con el DDD ( $c = 0.63$ ), HCH  $\beta$  ( $c = -0.61$ ), endosulfán  $\alpha$  ( $c = -0.47$ ) y el HCH Lindano ( $c = -0.36$ ) (**Figura 35** y **Figura 36**). Acá, es el HCH  $\alpha$  (Sperman= 0.214) la variable que influye en la estructura de la comunidad de hongos. Siendo así, la laguna de Chacahua en temporada de secas presentó mayor concentración de DDE y de endosulfán  $\alpha$ ; las dos lagunas mostraron concentraciones similares de Endrín, Endosulfán  $\beta$  y Heptacloro. Así mismo, la laguna de Pastoría mostró una mayor concentración de DDD, DDT, Dieldrín, Endrín Aldehído, Endosulfán Sulfato, HCH  $\alpha$ , HCH  $\beta$ , HCH Lindano, Metoxicloro y MO,

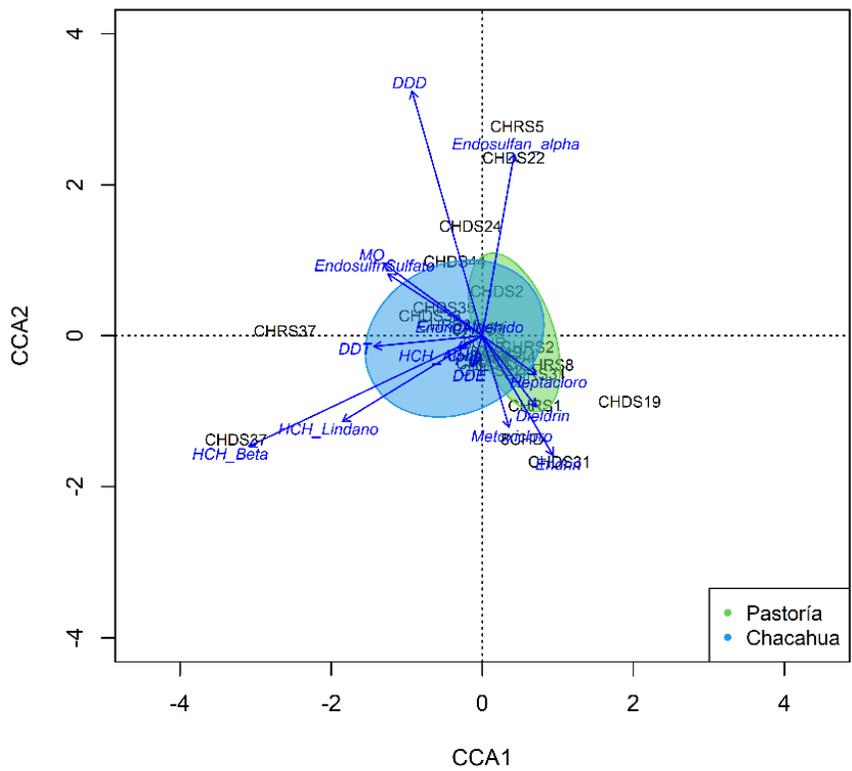
en la misma época. En lluvias, Chacahua presentó mayor concentración de DDE, DDT, Endrín, Endosulfán Sulfato, HCH  $\alpha$  y Metoxicloro; Pastoría, por su parte, tuvo mayor concentración de DDD, Endrín Aldehído, Heptacloro, HCH  $\beta$  y HCH Lindano (Aguilar Jiménez 2020, Leal-Acosta *et al.* 2022).



**Figura 33.** CCAs para la comunidad de bacterias y arqueas y la concentración de pesticidas en el sistema lagunar Chacahua-Pastoría durante la temporada de secas y lluvias. El número de cada muestra hace referencia a cada una de las zonas en las diferentes regiones de los sistemas lagunares. Chacahua (1, 2, 5, 6, 8 y 19), Pastoría (22, 24, 31, 33, 35, 37 y 44). Diferenciación a nivel laguna.



**Figura 34.** CCAs para la comunidad de bacterias y arqueas y la concentración de pesticidas en el sistema lagunar Chacahua-Pastoría durante la temporada de secas y lluvias. El número de cada muestra hace referencia a cada una de las zonas en las diferentes regiones de los sistemas lagunares. Chacahua (1, 2, 5, 6, 8 y 19), Pastoría (22, 24, 31, 33, 35, 37 y 44). Diferenciación a nivel temporada.



**Figura 35.** CCAs para la comunidad de hongos y la concentración de pesticidas en el sistema lagunar Chacahua-Pastoría durante la temporada de secas y lluvias. El número de cada muestra hace referencia a cada una de las zonas en las diferentes regiones de los sistemas lagunares. Chacahua (1, 2, 5, 6, 8 y 19), Pastoría (22, 24, 31, 33, 35, 37 y 44). Diferenciación a nivel laguna.



las arqueas (Torres-Alvarado 2016, Liu *et al.* 2018, Cadena *et al.* 2019, Navarrete-Euan *et al.* 2021). Aquí se encontró que los filos bacterianos dominantes fueron Proteobacteria, Chloroflexi y Bacteroidetes en ambos sistemas; en el caso de las arqueas fue Euryarchaeota. El filo Proteobacteria se vio mayormente representado por las familias Anaerolineaceae, Desulfobacteraceae, Spirochaetaceae, Planctomycetaceae, Desulfarculaceae y Saprospiraceae, dentro de estas Desulfobacteraceae y Desulfarculaceae son bacterias anaeróbicas reductoras de sulfato, foto/quimioheterótrofos aeróbicos y anaeróbicos y heterótrofos (Cadena *et al.* 2019, Aldeguer-Riquelme *et al.* 2022); Anaerolineaceae son quimiolitio-organo-heterótrofos, degradadores de carbohidratos y aminoácidos, y algunos de ellos también son hidrogenógenos. Planctomycetaceae es un grupo bacteriano encontrado en diferentes ambientes, dentro de los que se destacan medios marinos, de agua dulce y suelos. Así mismo, se destaca su importancia ecológica en el ciclo del nitrógeno (Fuerst y Sagulenko 2011). Saprospiraceae, presenta microorganismos aerobios facultativos, quimioorganótrofos y quimiolitotrofos, algunos con capacidad para la hidrólisis, la utilización de fuentes complejas de carbono y otros asociados con la depredación de otras bacterias y algas dentro de ambientes acuáticos y marinos; se encuentran asociados con sedimentos marinos u organismos eucariotas (McIlroy y Nielsen 2006). Spirochaetaceae es una familia de bacterias anaerobias facultativas en forma de espiral de alta motilidad, algunos son agentes etiológicos de varios animales y humanos; son causantes de enfermedades importantes, incluidas la sífilis, la enfermedad de Lyme, fiebres, etc (Karami *et al.* 2014).

Los representantes del filo Chloroflexi son degradadores importantes de la materia orgánica compleja y de la procedente de las algas (Blazejak y Schippers 2010, Suominen *et al.* 2021), son organismos fotoautótrofos que generalmente se asocian con la dechloración (Feng *et al.* 2019). En lagos eutróficos, Chloroflexi ha sido más abundante en comparación con sistemas oligotróficos, y se encuentra en mayor cantidad en el sedimento en comparación con la columna de agua (Feng *et al.* 2019). El filo Bacteroidetes, se reconoce por su capacidad para colonizar todo tipo de ambientes, tracto digestivo de organismos y ambientes marinos, por degradar compuestos de alto peso molecular, por su capacidad de establecer transferencia horizontal de genes con otras bacterias, por su actividad mutualista con algunos hospederos y por sus características patogénicas. En ambientes marinos, se encuentran en la superficie, en sedimentos, biopelículas, corales, macroalgas, ventanas hidrotermales y en el bacterioplancton (Thomas *et al.* 2011).

En el caso de las arqueas, Euryarchaeota, grupo con características metanógenas y halófilas (Abreu *et al.* 2001), dominó en CH y en C, tal y como se ha visto en otros ecosistemas como lagos, lagunas costeras, agua marina, suelo y sedimentos. Bathyarchaeota, el segundo filo dominante en

estas lagunas, presenta gran variedad de enzimas que le permiten degradar polímeros de carbohidratos complejos de origen fotosintético reciente que se acumulan en la superficie del sedimento y sustratos de carbono procesados de bajo peso molecular y proteínas (Lazar *et al.* 2016). Su presencia y dominancia en estos sistemas lagunares se asocia con la alta concentración de materia orgánica y la existencia de material vegetal que se acumula en el sedimento (Amézquita *et al.* 2015), el cual es fuente de alimento para estos microorganismos. Woese archaeota domina en ambientes anóxicos, como suelo, sedimentos y otros hábitats. En C las estaciones con mayor número de ASVs de este grupo fueron la C16 y C14, y en CH la CH44, CH26 y CH37, estas ubicadas en las zonas más alejadas de las bocas de las lagunas o en la periferia de estas, donde el intercambio de agua fresca con el mar es mínimo y donde se encuentran zonas con menores concentraciones de oxígeno. Este filo ha demostrado ser relevante en procesos de desnitrificación, fijación de nitrógeno y reducción disimilatoria de nitritos, especialmente en los sistemas de tratamiento de aguas residuales (Liu *et al.* 2021). También, tienen la capacidad potencial de reducción de sulfatos, oxidación de sulfuros y oxidación de tiosulfato en ambientes sulfúricos o ricos en sulfídicos, compuestos presentes en el sedimento de las lagunas costeras y que con el dragado pueden ser liberados al medio y quedar disponibles para estos microorganismos (Olguín *et al.* 2007, Liu *et al.* 2021).

El filo Lokiarchaeota, por su parte, se ha encontrado abundante en sedimentos anaerobios de zonas marinas y estuarinas (Cadena *et al.* 2019), en CH se encontró en mayor medida en la estación CH44, la cual se encuentra cerca del poblado de Zapotalito y dentro de la zona de intercambio limitado de agua marina y dulce, donde los niveles de oxígeno son reducidos y se favorece la acumulación de sustancias contaminantes. En C, se presentó la mayor presencia en la estación C13, punto cercano a la población de Corralero, donde es posible que se encuentren sedimentos con menor cantidad de oxígeno, debido a la descarga de aguas grises y negras de esa población.

La composición taxonómica de hongos estuvo dominada por Ascomycota en más del 50 % en los dos sistemas lagunares durante las dos temporadas de estudio, al igual que en sedimentos de zonas de manglar en otros sistemas. La clase dominante dentro de este filo fue Dothideomycetes, organismos que se encuentran como saprobios de materiales leñosos en descomposición en ambientes marinos y entre los cuales algunos órdenes están presentes en floraciones exhibiendo algunas adaptaciones morfológicas al ambiente marino como ascosporas o vainas mucilaginosas (Luis *et al.* 2019). Algunos representantes de Basidiomycota son responsables de la descomposición de tejido en las raíces de los manglares (Jones *et al.* 2015), otros se encargan de la descomposición de moléculas recalcitrantes como la lignina y los taninos, lo que aumenta la disponibilidad de celulosa o sustancias que son usadas por otros organismos marinos, están activos en el ciclo de los nutrientes y permiten que grandes

cantidades de biomasa regresen a la cadena alimentaria del ecosistema (Raghukumar 2017, Poli *et al.* 2018). Glomeromycota, se encuentra en simbiosis con las raíces de alrededor del 80 % de las familias de plantas existentes en el planeta tierra incluyendo a las plantas acuáticas (Bessa De Queiroz, Mariana Khadija *et al.* 2015). La composición taxonómica de la comunidad de hongos de estas lagunas muestra la importancia de los mismos en la degradación del material vegetal proveniente del manglar que se encuentra alrededor y dentro de las islas de estos sistemas lagunares. Cabe destacar que, este material contiene gran concentración de lignocelulosa y que la mayoría de los hongos marinos y costeros que se han identificado a partir de sustratos que la contienen (Hyde *et al.* 1998).

*Composición y estructura de las comunidades de procariontas y hongos en los dos sistemas lagunares costeros* La composición de la comunidad de procariontas de los sistemas lagunares mostró que hay diferencias entre CH y C, y entre los mismos de secas a lluvias y una fuerte correlación con la salinidad en ambos sistemas lagunares, más estrictamente en CH. En gradientes salinos, se ha comprobado dentro de las proteobacterias, las alfa y gamma proteobacterias, incrementan con el aumento de la salinidad mientras que las beta-proteobacterias muestran una tendencia opuesta (Behera *et al.* 2017). En sedimentos estuarinos y salobres se ha demostrado que las proteobacterias predominan en una variedad de sedimentos de agua dulce, estuarinos y marinos y pueden representar hasta el 85% de la población total bacteriana. Las comunidades de proteobacterias juegan un papel crucial en el ciclo global del carbono, nitrógeno y azufre en el ambiente sedimentario de agua salobre (Behera *et al.* 2017). Tanto en CH como en C, se encontró que la diversidad de arqueas es mayor en la zona marina, tal y como se ha visto en otros sistemas lagunares costeros, donde la diversidad de este grupo incrementó con la salinidad en comparación con las zonas de agua dulce (Webster *et al.* 2015, Liu *et al.* 2018, Cadena *et al.* 2019). La estructura de la comunidad de procariontas en estos dos sistemas lagunares costeros a lo largo del gradiente de salinidad es consistente con los patrones globales de estructuras de microorganismos regidos por la salinidad (Lew *et al.* 2022).

En cuanto a los hongos, no se observaron diferencias entre temporadas, regiones y las mismas regiones para C, pero sí para CH entre temporadas y regiones. Lo cual obedece a que en CH hay una mayor regionalización en la concentración salina de la columna de agua. Además, los factores ambientales que mayor correlación tuvieron con la distribución de la comunidad de hongos fue la salinidad, el OD y la temperatura, tal y como se ha observado para otras comunidades de hongos en sistemas marinos donde estos factores impulsan la variación en las mismas (Jeffries *et al.* 2016, Tisthammer *et al.* 2016). Las lagunas costeras, al ser ecosistemas de transición entre el medio terrestre y marino, se comportan como un ecotono, donde coexisten hongos terrestres, estuarinos y de mar abierto; el mar abierto está dominado por una alta proporción de taxones no identificados previamente

que potencialmente representan un conjunto de hongos que tienen características específicas (Jeffries *et al.* 2016). En los dos sistemas estudiados se observó que, la mayor cantidad de ASVs de hongos sin identificar se ubicaban en las regiones cerca de la boca de la laguna, es decir las que tienen mayor influencia marina. Cabe tener en cuenta que la composición de la comunidad de hongos en sistemas marinos y costeros, difiere en la columna de agua en comparación con el sedimento (Tisthammer *et al.* 2016).

*Distribución de la comunidad de bacterias y hongos en Chacahua y Pastoría y su relación con la presencia de pesticidas en el sedimento de las lagunas*

Las lagunas costeras, al igual que otros sistemas naturales marino costeros y terrestres se ven afectados por las actividades agrícolas y por causas antropogénicas, lo que repercute en la composición y distribución de la comunidad biótica dentro de los mismos. Dentro de los desechos que llegan a las lagunas costeras se encuentran los antibióticos y los pesticidas; los pesticidas pueden afectar a los macro y microorganismos estuarinos y lagunares a través de derrames, escorrentías y derivas. Tanto la estructura como la función de las comunidades microbianas pueden verse afectadas por la toxicidad de los pesticidas, los cuales podrían ser metabolizados o bioacumulados por microorganismos. Los mecanismos de toxicidad varían según el tipo de pesticida y las especies microbianas expuestas (Widenfalk *et al.* 2008). Se han demostrado los efectos tóxicos de los insecticidas organofosforados y organoclorados en especies microbianas, aunque sus mecanismos de toxicidad en especies no objetivo siguen sin estar claros. Existe una gran variabilidad en la toxicidad de incluso un solo pesticida entre especies microbianas (DeLorenzo *et al.* 2001, Widenfalk *et al.* 2008). Al intentar predecir la toxicidad de los pesticidas en los ecosistemas costeros, se deben considerar los efectos de las mezclas de pesticidas y las interacciones con los nutrientes (DeLorenzo *et al.* 2001).

En el presente estudio, la composición de la comunidad de procariotas mostró una fuerte correlación con el endosulfán  $\alpha$  ( $c = -0.84$ ), el HCH  $\alpha$  ( $c = 0.66$ ), el DDT ( $c = 0.63$ ) y el endrín ( $c = 0.58$ ), en temporada de secas y en general para la laguna Pastoría. Esto permitió diferenciar los grupos de muestras para las dos temporadas y para las dos lagunas dentro del sistema. Por su parte, la comunidad de hongos tuvo una fuerte correlación con el DDD ( $c = 0.63$ ), HCH  $\beta$  ( $c = -0.61$ ), endosulfán  $\alpha$  ( $c = -0.47$ ) y el HCH Lindano ( $c = -0.36$ ). Para el endosulfán, se han demostrado sus efectos sobre el ciclo reproductivo de algunas algas. Por ejemplo, en el alga roja marina *Champia parvula*, concentraciones de endosulfán de 47 y 130  $\mu\text{g/L}$  afectaron el crecimiento femenino y los tetrasporofitos, respectivamente. Los niveles más altos, de 360 a 600  $\mu\text{g/L}$ , produjeron efectos reproductivos crónicos en el alga (DeLorenzo *et al.* 2001). El endosulfán es metabolizado por

bacterias en sulfato de endosulfán y podía persistir en suelos y sedimentos acuáticos como una sustancia química tóxica (Carvalho 2017).

El  $\alpha$ -HCH se transforma en  $\beta$ -HCH en el suelo por acción microbiana, este último es más estable y persistente debido a su baja solubilidad en agua y menor presión de vapor, por lo que encontrar  $\beta$ -HCH es un buen indicador de degradación (Lu *et al.* 2019, Leal-Acosta *et al.* 2022). Debido a lo anterior, podría sugerirse que la actividad microbiana en la laguna de Pastoría favorece la degradación de  $\alpha$ -HCH a  $\beta$ -HCH, lo que se ve representado en la mayor concentración de este último en esta laguna y en las dos temporadas analizadas.

Durante las temporadas de estudio se pudo ver que las concentraciones de DDT, DDD y DDE se redujeron de secas a lluvias. Esto podría deberse a varios factores como el arrastre de los mismos por las corrientes de la laguna generadas por el ingreso de agua dulce al sistema y la generación de recambios de agua, la acción de microorganismos o por la integración de los mismos en la cadena trófica debido a su características bioacumulatorias. Para las dos lagunas, la concentración de DDT es superior a la de DDD y/o DDE. La mayor correlación de la composición taxonómica de procariotas se presenta con el DDT y en el caso de los hongos con el DDD. Para el DDT, se ha encontrado que en algas planctónicas marinas concentraciones menores a 10  $\mu\text{g/L}$  inhibían la fotosíntesis y que incluso concentraciones menores a 0.3  $\mu\text{g/L}$  afectan a algas como *Chlorella* sp. El DDT aplicado a los cultivos se transporta al medio acuático, donde se metaboliza rápidamente a DDE y se bioacumula en las cadenas alimentarias acuáticas (Kale *et al.* 1999). En algas verdes y verde-azules, concentraciones de aldrín, dieldrín y endrín, menores a 1 mg/L (1000  $\mu\text{g/L}$ ) no tienen efectos significativos sobre la respiración de estas.

Aunque las concentraciones de los plaguicidas encontradas en este sistema lagunar son altas en comparación con las de otros sistemas lagunares en México y con las normas internacionales (Leal-Acosta *et al.* 2022), según la información encontrada en la bibliografía, no son letales o no se ha comprobado su efecto directo sobre algún grupo de procariotas y/o hongos en general. Sin embargo, se ha confirmado que los pesticidas contienen algunos compuestos que generalmente persisten en el medio acuático y con el tiempo, las descargas continuas pueden formar mayores depósitos de residuos en los sedimentos (Carvalho *et al.* 2009), y pueden representar una amenaza para los microorganismos cuando se resuspenden en sedimentos marinos y estuarinos debido a la acción de las mareas o al dragado (DeLorenzo *et al.* 2001). Chacahua y Pastoría han presentado dragados en años anteriores, desde el 2014 en la boca de Cerro Hermoso, donde se han movido toneladas de arena a un lado de la laguna (Chaca 2017), lo que ha movilizado material biológico y químico en estos como posibles contaminantes. En general, estos compuestos podrían sufrir varias transformaciones

químicas y transferirse entre compartimentos ambientales, alcanzar otros ecosistemas fuera del área de aplicación y ejercer efectos tóxicos sobre especies no objetivo (Taylor *et al.* 2003).

Es importante tener en cuenta para estos sistemas, que los suelos son una fuente relevante de antibióticos naturales y de resistencia, debido a que las condiciones de estrés influyen en la producción de compuestos similares a los antibióticos, la contaminación de los suelos por pesticidas, químicos orgánicos o antibióticos puede aumentar la incidencia y persistencia de genes resistentes a los antibióticos (Ramakrishnan *et al.* 2019). En granjas acuícolas, la combinación de pesticidas y antibióticos, puede generar “reactores genéticos” o “puntos calientes” para genes de resistencia antimicrobiana (Ramakrishnan *et al.* 2019). Lo anterior podría sugerirnos que, de no controlarse la contaminación por pesticidas, en este caso, o por otros compuestos contaminantes en sistemas naturales como las lagunas costeras, se verían afectados niveles tróficos superiores y la salud del sistema como tal, lo que influye en la salud de las personas que habitan estas regiones.

## Capítulo 4

Publicado en: *Scientific Reports*

### 1. Monitoring of benthic eukaryotic communities in two tropical coastal lagoons through eDNA metabarcoding: a spatial and temporal approximation

Margoth L. Castro-Cubillos <sup>a</sup>, Joe D. Taylor <sup>b, c</sup>, Alicia Mastretta-Yanes <sup>d, e</sup>, Francisco Benítez-Villalobos <sup>f</sup>, Valentina Islas-Villanueva <sup>e, g, \*</sup>

a. Programa de Doctorado en Ecología Marina, División de Estudios de Posgrado, Universidad del Mar Campus Puerto Ángel, Cd. Universitaria s/n, Oaxaca, 70902, México.

[lilianacastrocubillos@gmail.com](mailto:lilianacastrocubillos@gmail.com) ORCID:0000-0002-6233-1572

b. School of Environment & Life Sciences, University of Salford, Peel Building, Salford, M5 4WT, UK.  
[drjoetay@gmail.com](mailto:drjoetay@gmail.com) ORCID: 0000-0003-0095-0869

c. UK Centre for Ecology & Hydrology, Maclean Building, Benson Lane, Crowmarsh Gifford, Wallingford, OX10 8BB, UK

d. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), México.

[amastretta@conabio.gob.mx](mailto:amastretta@conabio.gob.mx) ORCID: 0000-0003-2951-6353

e. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México.

f. Universidad del Mar, Instituto de recursos, campus Puerto Ángel, Oaxaca, México.

[fbv@angel.umar.mx](mailto:fbv@angel.umar.mx) ORCID: 0000-0002-0951-7757

g. Universidad del Mar, Instituto de Genética, campus Puerto Ángel, Oaxaca, México.

[valentina@angel.umar.mx](mailto:valentina@angel.umar.mx) ORCID: 0000-0001-8829-3052



OPEN

# Monitoring of benthic eukaryotic communities in two tropical coastal lagoons through eDNA metabarcoding: a spatial and temporal approximation

Margoth L. Castro-Cubillos<sup>1</sup>, Joe D. Taylor<sup>2</sup>, Alicia Mastretta-Yanes<sup>3,4</sup>, Francisco Benítez-Villalobos<sup>5</sup> & Valentina Islas-Villanueva<sup>4,6</sup>✉

Tropical coastal lagoons are important ecosystems that support high levels of biodiversity and provide several goods and services. Monitoring of benthic biodiversity and detection of harmful or invasive species is crucial, particularly in relation to seasonal and spatial variation of environmental conditions. In this study, eDNA metabarcoding was used in two tropical coastal lagoons, Chacahua (CH) and Corralero (C) (Southern Mexican Pacific), to describe the benthic biodiversity and its spatial–temporal dynamics. The distribution of benthic diversity within the lagoons showed a very particular pattern evidencing a transition from freshwater to seawater. Although the two lagoon systems are similar in terms of the species composition of metazoans and microeukaryotes, our findings indicate that they are different in taxa richness and structure, resulting in regional partitioning of the diversity with salinity as the driving factor of community composition in CH. Harmful, invasive, non-indigenous species, bioindicators and species of commercial importance were detected, demonstrating the reach of this technique for biodiversity monitoring along with the continued efforts of building species reference libraries.

Coastal lagoons are among the most important ecosystems in the world. They function as ecotones between terrestrial, freshwater, intertidal and marine systems, and are highly productive. The value of the goods and services provided by coastal lagoons is among the highest of all natural systems due to nutrient recycling, direct harvesting, recreation and aesthetic value<sup>1</sup>. Coastal lagoons include different types of habitats such as mangroves, marshes and seagrass beds<sup>2</sup>. These habitats function as spawning areas, breeding areas, feeding zones and migration corridors for both vertebrates and invertebrates<sup>3,4</sup>. Despite its clear importance for ecosystems and services, lagoon biodiversity is not well characterised, particularly in tropical regions.

The high spatial–temporal environmental heterogeneity of lagoons suggests a broad spectrum of species may coexist<sup>5,6</sup>. Because of the relatively low water discharge rate of lagoons, they are favourable habitats for primary producers, which in turn favour secondary production<sup>7,8</sup>. Due to their transitional nature they have highly variable gradients of abiotic factors, such as temperature, salinity and oxygen, and high biological productivity<sup>1</sup>. In a large majority of coastal lagoons and brackish water systems, salinity is one of the most important environmental factors that determines the structure of biodiversity at local and regional levels<sup>6,9–11</sup>. Salinity may be similar or superior to that of seawater in some of these lagoons, depending largely on their hydrological characteristics, which are determined by their configuration, the entry of seawater (tidal range), precipitation and fresh water from rivers; and evaporation<sup>12,13</sup>.

<sup>1</sup>Programa de Doctorado en Ecología Marina, División de Estudios de Posgrado, Universidad del Mar Campus Puerto Ángel, Cd. Universitaria s/n, 70902 Oaxaca, Mexico. <sup>2</sup>UK Centre for Ecology & Hydrology, Maclean Building, Benson Lane, Crowmarsh Gifford, Wallingford OX10 8BB, UK. <sup>3</sup>Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), Liga Periferico Insurgentes Sur 4903, 14010 Mexico city, Mexico. <sup>4</sup>Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), Av. de los Insurgentes Sur 1582, 03940 Mexico, Mexico. <sup>5</sup>Instituto de Recursos, Universidad del Mar Campus Puerto Ángel, Cd. Universitaria s/n, 70902 Oaxaca, Mexico. <sup>6</sup>Instituto de Genética, Universidad del Mar Campus Puerto Ángel, Cd. Universitaria s/n, 70902 Oaxaca, Mexico. ✉email: valentina@angel.umar.mx

## Monitoring of benthic eukaryotic communities in two tropical coastal lagoons through eDNA metabarcoding: a spatial and temporal approximation

Margoth L. Castro-Cubillos <sup>a</sup>, Joe D. Taylor <sup>b, c</sup>, Alicia Mastretta-Yanes <sup>d, e</sup>, Francisco Benítez-Villalobos <sup>f</sup>, Valentina Islas-Villanueva <sup>e, g, \*</sup>

a. Programa de Doctorado en Ecología Marina, División de Estudios de Posgrado, Universidad del Mar Campus Puerto Ángel, Cd. Universitaria s/n, Oaxaca, 70902, México.

[lilianacastrocubillos@gmail.com](mailto:lilianacastrocubillos@gmail.com) ORCID:0000-0002-6233-1572

b. School of Environment & Life Sciences, University of Salford, Peel Building, Salford, M5 4WT, UK.  
[drjoetay@gmail.com](mailto:drjoetay@gmail.com) ORCID: 0000-0003-0095-0869

c. UK Centre for Ecology & Hydrology, Maclean Building, Benson Lane, Crowmarsh Gifford, Wallingford, OX10 8BB, UK

d. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), México.

[amastretta@conabio.gob.mx](mailto:amastretta@conabio.gob.mx) ORCID: 0000-0003-2951-6353

e. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México.

f. Universidad del Mar, Instituto de recursos, campus Puerto Ángel, Oaxaca, México.

[fbv@angel.umar.mx](mailto:fbv@angel.umar.mx) ORCID: 0000-0002-0951-7757

g. Universidad del Mar, Instituto de Genética, campus Puerto Ángel, Oaxaca, México.

[valentina@angel.umar.mx](mailto:valentina@angel.umar.mx) ORCID: 0000-0001-8829-3052

### Abstract

Tropical coastal lagoons are important ecosystems that support high levels of biodiversity and provide several goods and services. Monitoring of benthic biodiversity and detection of harmful or invasive species is crucial, particularly in relation to seasonal and spatial variation of environmental conditions. In this study, eDNA metabarcoding was used in two tropical coastal lagoons, Chacahua

(CH) and Corralero (C) (Southern Mexican Pacific), to describe the benthic biodiversity and its spatial-temporal dynamics. The distribution of benthic diversity within the lagoons showed a very particular pattern evidencing a transition from freshwater to seawater. Although the two lagoon systems are similar in terms of the species composition of metazoans and microeukaryotes, our findings indicate that they are different in taxa richness and structure, resulting in regional partitioning of the diversity with salinity as the driving factor of community composition in CH. Harmful, invasive, non-indigenous species, bioindicators and species of commercial importance were detected, demonstrating the reach of this technique for biodiversity monitoring along with the continued efforts of building species reference libraries.

## **Introduction**

Coastal lagoons are among the most important ecosystems in the world. They function as ecotones between terrestrial, freshwater, intertidal and marine systems, and are highly productive. The value of the goods and services provided by coastal lagoons is among the highest of all natural systems due to nutrient recycling, direct harvesting, recreation and aesthetic value <sup>1</sup>. Coastal lagoons include different types of habitats such as mangroves, marshes and seagrass beds <sup>2</sup>. These habitats function as spawning areas, breeding areas, feeding zones and migration corridors for both vertebrates and invertebrates <sup>3,4</sup>. Despite its clear importance for ecosystems and services, lagoon biodiversity is not well characterised, particularly in tropical regions.

The high spatial-temporal environmental heterogeneity of lagoons suggests a broad spectrum of species may coexist <sup>5,6</sup>. Because of the relatively low water discharge rate of lagoons, they are favourable habitats for primary producers, which in turn favour secondary production <sup>7,8</sup>. Due to their transitional nature they have highly variable gradients of abiotic factors, such as temperature, salinity and oxygen, and high biological productivity <sup>1</sup>. In a large majority of coastal lagoons and brackish water systems, salinity is one of the most important environmental factors that determines the structure of biodiversity at local and regional levels <sup>6,9-11</sup>. Salinity may be similar or superior to that

of seawater in some of these lagoons, depending largely on their hydrological characteristics, which are determined by their configuration, the entry of seawater (tidal range), precipitation and fresh water from rivers; and evaporation<sup>12,13</sup>.

Basic biodiversity data is lacking and little is known about the impact of spatial and temporal variation on communities within highly heterogeneous lagoon systems, especially regarding the benthos. This is particularly true for the smallest representatives of eukaryotic biodiversity. In particular, eukaryotic organisms have been shown to be effective indicators of pollution and anthropogenic disturbance<sup>14,15</sup>. Many such organisms have not been studied or are unidentifiable based on morphology alone, especially meiofauna and microeukaryotes<sup>16</sup>. Molecular techniques represent an ideal means of rapid identification and profiling of eukaryotic communities, as they provide several advantages over traditional characterization methods<sup>17-19</sup>.

For more efficient biodiversity monitoring in different ecosystems, a multi-taxon approach is necessary, along with the use of tools that allow large-scale monitoring<sup>20</sup>. The metabarcoding of environmental DNA (eDNA) allows researchers to obtain a large amount of data for monitoring and characterization studies and reveals the community spatial-temporal structure and composition in different systems<sup>21-23</sup>. In lagoons and estuaries investigations have focused on seasonal and temporal variability in eukaryotic plankton<sup>24-26</sup>, benthic microbial eukaryote<sup>27,28</sup> and bacterial communities<sup>29,30</sup>; however, few studies have been carried out in tropical regions.

In this study we focus on two tropical lagoon systems: the Chacahua Pastoria (CH) and Corralero-Alotengo (C) systems, located in the Eastern Tropical Pacific<sup>31</sup>, in the Southern Mexican Pacific<sup>32</sup>. The former lies within the Lagunas de Chacahua National Park, is a natural protected area<sup>33</sup>, and has been classified as a RAMSAR site (Ramsar Convention on Wetlands of International Importance Especially as Waterfowl Habitat) since 2008 ([rsis.ramsar.org](http://rsis.ramsar.org)), while the latter is not, and is periodically subjected to dredging for artisanal fisheries. Due to their geographical proximity and similar characteristics, it is expected that the structure and composition of the eukaryotic diversity

would be similar. The Chacahua-Pastoria (CH) system is composed of two lagoons. It used to have a permanent connection with the sea through a natural entrance in Chacahua and an artificial one in Pastoria. The former was naturally closed in 1981 but it was reopened again in 1997 by Hurricane Paulina. Since 2003, Chacahua has been the only connection to the sea<sup>34,35</sup>. The Corralero-Alotengo system (C) has a seasonal closing and opening cycle of the connection to the sea, regulated by freshwater inputs from land and coastal processes. The reduction of these inputs contributes to the clogging in the mouth and interior channels, which hinders the entry of seawater, nutrients and species<sup>36</sup>. Over the last few decades, both lagoon systems have shown increased sedimentation, due to the closure of their connection to the sea and the reduction of freshwater inputs coming from land. However, both represent great commercial and ecological relevance, since they sustain species of commercial importance such as pen shell (*Atrina maura*), white shrimp (*Litopenaeus vannamei*), brown shrimp (*Farfantepenaeus californiensis*), crystal shrimp (*Farfantepenaeus brevirostris*), blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*), Charru mussel (*Mytella charruana*) and others<sup>37-39</sup>; and they are potential laboratories for ecological research and bioprospecting. However, due to the increase in contaminating waste from the surrounding human populations, some parasitic or pathogenic species could become a source of diseases not only for the species that inhabit the lagoon, but also for humans.

In the present study, the spatial and seasonal (biannual) changes in benthic eukaryotic community composition were evaluated in two lagoon systems with varying levels of protection. The diversity of metazoans (macroeukaryotes and meioeukaryotes) and microeukaryotes was assessed separately by amplifying fragments of specific genes; Cytochrome Oxidase subunit I (COI) was used for metazoans and 18S rRNA (V4 region) for microeukaryotes, due to the taxonomic bias previously found in certain groups and the status of these markers as standardised barcodes for metazoans and microeukaryotes<sup>40</sup>. The use of eDNA Metabarcoding allowed us to describe the baseline biodiversity in order to develop an efficient way of monitoring these systems and to evaluate the effects of anthropogenic disturbances and their conservation status. Sediments were selected because, in aquatic

systems, a greater number of MOTUs (Molecular Operational Taxonomic Units) are obtained in sediment samples than in water samples. However, this depends on the group of organisms of interest for each study<sup>41</sup>. The benthic community of these lagoons is the focus of the current study. The expected findings include: 1) clear differences in the composition of the metazoan and microeukaryote community between seasons, between lagoons and sections of the lagoon; 2) differences in the composition of the metazoan and microeukaryote community will be given by the environmental parameters; 3) a higher species richness compared to previous studies in these lagoons; 4) the detection of invasive or exotic species; and 5) higher levels of biodiversity in the lagoon system that experiences less anthropogenic influence.

## **Material and methods**

### *Study area and sampling*

We chose two coastal lagoons of the Southern Mexican Pacific. The first one is Chacahua-Pastoria (CH) (15° 57' 0.237'' - 16° 03' 05.96'' N and 97° 31' 57.15'' - 97° 48' 01.01'' W) a RAMSAR site; and the second one is the Corralero-Alotengo system (C) (16° 11' -15 and 16° 16' 30'' N and 98° 05' 00'' and 98° 12' 30'' W) along the Corralero fishing village which does not have a protected status even though both lagoon systems include mangrove ecosystems<sup>42</sup> (Fig. 1). The climate of the region is tropical sub-humid with summer rainfall, from June to August. The salinity shows seasonality, presenting the highest values from February to June and the lowest from August to December<sup>43</sup>. There are marked differences between the mouth and the interior of the system in salinity and temperature; whereas the dissolved oxygen (DO) does not show clear spatial-temporal trends, and the pH shows extreme values in the dry season<sup>37,43</sup>.

Each lagoon was divided into different zones according to physicochemical (salinity, temperature, pH) and soil (sand, mud) characteristics, previously defined in other studies<sup>34,43</sup>. In total, there were 11 zones for CH and 9 zones for C, and three samples were taken from each zone. Finally, these areas were integrated into regions within the same lagoon systems; these regions were defined according

to each lagoon's distance to the mouth. The total distance of each lagoon body was taken and divided into three parts, resulting in the following regions: near, middle and far. For C, near (N): 0-4 km, middle (M): 4-8 km and far (F): 8-12 km; for CH, near (N): 0-7 Km, middle (M): 7-14 Km and far (F): 14-21 Km.

Sediment samples were collected with a Petite Ponar grab twice in 2018. The first sampling period was towards the end of the dry season, March (20th to 22nd) and April (10th and 11th) and the second was at the end of the rainy season, September (17th to 20th). In each sampling location depth, salinity, temperature, pH and oxygen concentration were measured from the overlying water with a calibrated Hanna HI 9828 multi-parameter probe. All the samples were placed inside Ziploc bags and stored under ice until arrival at the laboratory. Each sample was homogenized with a blender that was cleaned with sodium hypochlorite between each use, finally, the sample was stored at -20 °C until DNA extraction. The method of blending to homogenize sediment samples has been used previously (method outlined in Aylagas et al. 2016; Wangenstein et al. 2018) and was conducted to homogenize as many organisms from a larger sample as possible, meaning DNA would be extracted from intact living organisms rather than DNA "traces"<sup>22,44,45</sup>.

#### *DNA extraction and sequencing*

For DNA extractions, 10 g of each homogenized sediment sample were processed with the PowerMax DNA Isolation Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's instructions, and DNA was resuspended in a final volume of 5mL. The size of the DNA was confirmed with gel electrophoresis and each sample was quantified with a Nanodrop 2000.

The V4 region of the 18S rRNA gene was amplified with the forward primer E572F (5'-CYGCGGTAATTCCAGCTC-3') and reverse primer E1009R (5'-AYGGTATCTRATCRTCCTTYG-3')<sup>46</sup>. To amplify a partial fragment of the mitochondrially encoded cytochrome c oxidase I (COI) gene, the forward primer mlCOIintF-XT (5'-GGWACWRGWTGRACWITITAYCCYCC-3') and

reverse primer jgHCO21 (5'-TAIACYTCIGGRTGICCRAARAAYCA-3') were used <sup>22</sup>. Both primers contained the Illumina NextEra kit adapter and 12 random bases to increase diversity on the Illumina slide and the reverse primers contained the Illumina Nextera adapter.

The 18S-V4 amplicons had 25 µl final volume, with 0.625 U of GoTaq G2 Flexi DNA polymerase (Promega), 0.5 µl of 0.2 mM of each primer, 5 µl of Buffer 1X, 2 µl of MgCl<sub>2</sub> (25 mM) 0.5 µl of dNTPs 10 mM and 1.5 µl (15 ng) of DNA template. For COI the final volume and concentrations were the same except for 25 mM of MgCl<sub>2</sub> and 2 µl (15 ng) of DNA template. For 18S-V4, the PCR conditions consisted of a polymerase activation step of 5 minutes at 94 °C, 35 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 50 °C for 45 s and elongation at 72 °C for 90 s, the final extension was for 72 °C for 7 min. For COI, the polymerase activation at 95 °C was for 7 min, followed by 46 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 44 °C for 45 s and elongation at 72 °C for 90 s, the final extension was at 72 °C for 5 min.

PCR clean-up was performed with Agencourt AMPure beads at a concentration of 0.8x beads per sample. The DNA concentration of the PCR products was measured in a microplate reader FLUOstar Omega using the QuantiFluor dsDNA System (Promega, UK). 18S-V4 and COI amplicons were then pooled in equimolar concentrations and indexing was performed using an Illumina Nextera barcoding kit as per the manufacturer's instructions. Indexed libraries were then pooled, quantified and diluted to 4pM and ran on Illumina Miseq using the V3 2x 300bp Illumina sequencing kit (Illumina).

#### *Sequence processing and bioinformatics*

The sequences were analysed with QIIME 1.9.1. <sup>47</sup> and the Usearch version 8.1 <sup>48</sup>. The Usearch mergepairs command was used to assemble the raw paired ends sequences (forward and reverse). A quality filter was performed and the samples were separated out into 18S-V4 and COI datasets based on primer sequence using CUTADAPT <sup>49</sup>. Both primers, forward and reverse, were removed before further analysis. Sequences with lengths less than 370bp for 18S-V4 and 300 bp for COI were

removed, and sequences were quality filtered to remove those with maximum expected error >0.5. Sequences were dereplicated, and any singleton sequences were removed, MOTUs were then clustered using the USEARCH UPARSE algorithm<sup>50</sup> at 97% for both 18S-V4 and COI datasets. UCHIME<sup>51</sup> was used to find and eliminate chimeras compared to the Silva (132 version) database<sup>52</sup> for 18S-V4 and a custom database for the COI. The custom COI database was made from COI sequences downloaded from the NCBI (National Center for Biotechnology Information) (accessed 17/05/2018). Sequences were filtered to contain full length COI and partial fragments >300bp and no more than two consecutive N bases. The database was then dereplicated of identical sequences and clustered at 99% before both fasta files and taxonomy were manually formatted for input into QIIME. After removal of chimeras, MOTUs were classified against the reference databases using UCLUST with a minimum similarity of 0.6. COI sequences were also checked individually against the BOLD database<sup>53</sup>. Original reads were then mapped onto the MOTUs at 97% and a MOTU table was produced. The MOTUs sequences were checked against the full NCBI database at 100 % for potential new records in the region.

#### *Statistical analysis*

To analyze significant differences in the measured physicochemical parameters between regions, two-way ANOVAs and their post-hoc tests were performed (Tukey HDS), using the Stats v.3.5.2 package in R<sup>54</sup>. The metazoan and microeukaryotic MOTUs were separated out in each sample and the rarified absolute frequency matrix was used to perform diversity and statistical analyses; rarefaction curves were generated for each marker and richness estimators were evaluated in *Vegan* in R (Chao, Jackknife1, Jackknife2 and Bootstrap). For each lagoon system, the samples from each zone were pooled together and the abundances were adjusted by zone. For the metazoans, it was rarefied at 300 sequences and for the other eukaryotes at 3000 sequences (Supplementary material Fig. S1 and Fig. S5). For the alpha diversity, the richness of MOTUs was analysed in each zone. A one-way ANOVA and post-hoc test was done to verify if the differences found in the diversity

measures (richness S) were significant,  $\alpha = 0.05$ . To find the best correlation of richness within the 5 measured environmental parameters, the Pearson's correlation index was also evaluated with the Stats V.3.5.2 package, both for metazoans and microeukaryotes.

To determine differences in the benthic community composition of the systems, a PERMANOVA<sup>55</sup> was performed in Primer V7. Each data set was transformed to a presence/absence matrix to then apply a *Jaccard* similarity test to each one. With the resemblance result a 3 factor PERMANOVA design was applied, season (dry and rainy), lagoon system (CH and C) and region (distance to the lagoon mouth: near, medium and far). These analyses were run with 999 permutations and a  $p < 0.05$ . The region was nested in the lagoon system. A SIMPER analysis was done to obtain the groups that are responsible for the differences between the factors that showed significant differences in the PERMANOVA.

Subsequently, a canonical correspondence analysis (CCA)<sup>56,57</sup> was carried out in PAST 3.25<sup>58</sup> with the rarefied abundances of MOTUs for each zone within each lagoon system and the 5 environmental variables measured (salinity, temperature, DO, pH and depth) were measured to detect potential relationships between biological and environmental data.

## **Results**

### *Lagoon conditions and environmental sampling*

High variability in environmental parameters across season and within each lagoon were observed in both CH and C (Supplementary material Table S1, Fig. S3 and Fig. S4). In C, the depth varied between the three regions of the lagoon (ANOVA,  $df = 4$ ,  $F = 5.18$ ,  $p = 0.00149$ ); the temperature varied between seasons (ANOVA,  $df = 1$ ,  $F = 53.847$ ,  $p = 2.23e-09$ ) and between lagoon regions (ANOVA,  $df = 4$ ,  $F = 5.455$ ,  $p = 0.00106$ ). Salinity showed a decrease in values in the three regions of the lagoon system from the dry to the rainy season (ANOVA,  $df = 1$ ,  $F = 508.082$ ,  $p = 2e-16$ ), as well as differences between the lagoon regions in each season (ANOVA,  $df = 4$ ,  $F = 6.747$ ,  $p =$

0.000216). pH varied significantly between seasons (ANOVA,  $df = 1$ ,  $F = 72.86$ ,  $p = 3.46e-11$ ) and between regions (ANOVA,  $df = 4$ ,  $F = 5.35$ ,  $p = 0.00121$ ), and DO varied between seasons (ANOVA,  $df = 1$ ,  $F = 4,216$ ,  $p = 0.0455$ ) and between regions (ANOVA,  $df = 4$ ,  $F = 13,500$ ,  $p = 1.91e-07$ ).

In CH, the depth was similar between seasons and regions of the lagoon, the temperature was different between regions of different seasons (ANOVA,  $df = 1$ ,  $F = 77.88$ ,  $p = 1.95e-12$ ), and between regions of the same station (ANOVA,  $df = 4$ ,  $F = 14.28$ ,  $p = 3.03e-08$ ). Salinity varied between regions within the same season (ANOVA,  $df = 4$ ,  $F = 58.701$ ,  $p = 2e-16$ ). The pH varied between regions in different seasons (ANOVA,  $df = 1$ ,  $F = 18.311$ ,  $p = 6.85e-05$ ) and between regions in the same season (ANOVA,  $df = 4$ ,  $F = 5.964$ ,  $p = 0.000415$ ). DO varied between seasons (ANOVA,  $df = 1$ ,  $F = 43.946$ ,  $p = 1.07e-08$ ) and between regions within the same season (ANOVA,  $df = 4$ ,  $F = 6.147$ ,  $p = 0.000326$ ).

#### *Sequence metrics and comparisons between 18S V4 and COI*

A total of 120 samples were analysed for each marker gene, 27 from C and 33 from CH for each season. For the 18S-V4 the initial number of raw sequences was 2,248,247. After read pair merging and the removal of short and low-quality reads control, the final number was 1,576,493 (70% remaining). For COI 1,758,686, raw reads were obtained and after the filtering, the final number was 319,417 (20% remaining) reads, with a high level of non-target amplification. After the MOTU clustering for 18S-V4 a total of 3,410 MOTUs and 1,182 for COI were detected. The COI marker dataset detected 16 phyla and the 18S-V4 marker 19 phyla. COI showed more metazoan MOTUs, despite V4 having more MOTUs overall. For this reason, COI was used to analyse the metazoan community in both lagoon systems. While COI and 18S V4 are standard barcodes for metazoans and eukaryotes, we found that several metazoan phyla were exclusively detected with 18S-V4 (Acanthocephala, Bryozoa, Ctenophora, Gnathostomulida and Tardigrada), while the Placozoa and Xenacoelomorpha phyla were only assigned in the samples analysed with COI; 13 phyla were assigned with the two markers (Annelida, Arthropoda, Chaetognatha, Chordata, Cnidaria,

Echinodermata, Kinorhyncha, Mollusca, Nematoda, Nemertea, Platyhelminthes, Porifera and Rotifera).

#### *Taxonomic composition*

Arthropoda (31.1 +/- 17.6 % MOTUs) dominated in both lagoon systems and seasons. They were composed of Hexapoda (17.3 % MOTUs +/- 6.8), followed by Chordata (14.0 % MOTUs +/- 7.8), Annelida (12.4 +/- 7.9 % MOTUs), Mollusca (10.6 +/- 4.8 % MOTUs) primarily Bivalvia (5.3 +/- 4.5 % MOTUs) and Cnidaria (9.3 +/- 5.2 % MOTUs) (Fig. 2, Supplementary material Table S2). Within the eukaryotic libraries, the most dominant taxa were the Ochrophyta (19.4 +/- 7.3 % MOTUs) primarily Diatomea (17.4 +/- 7.4 % MOTUs), Ciliophora (13.4 +/- 5.18 % MOTUs), Cercozoa (10.4 +/- 3.5 % MOTUs), Opisthokonta (9.6 +/- 3.16 % MOTUs), Archaeplastida (7.3 +/- 3.05 % MOTUs) and Dinoflagellata (6.6 +/- 2.6 % MOTUs) in each zone (Fig. 3).

Several MOTUs had close matches to taxa that had not been previously reported for these systems, namely some Crustacea and Dinoflagellata important in microalgal and potentially toxic blooms. With a sequence identity percentage of 100 %, the barnacle *Amphibalanus eburneus* and the dinoflagellates *Alexandrium leei*, *Amphidinium klebsii* and *Gyrodinium jinhaense* were identified. Other closer matches were found, with sequence identity percentages of 98.5-100 %, that match the crustaceans *Macrothrix* sp. and *Calanus propinquus*, and with the dinoflagellates *Lingulodinium polyedrum*, *Prorocentrum triestinum*, *Pellucidodinium psammophilum*, *Nusuttodinium amphidinioides*, *Alexandrium ostenfeldii*, *Alexandrium pohangense* and *Gonyaulax spinifera* (Supplementary material Table S3). It is important to note the presence of bivalve species, *Mytella charruana* and *Mytella strigata* which are synonyms and species of commercial interest in the region<sup>59,60</sup>.

#### *Taxonomic richness in the lagoon systems*

Of the 636 total metazoan MOTUs detected, 497 were from CH while 392 were detected in C. The richness of total MOTUs obtained in these samples was very close to that suggested by the richness estimators (Chao = 811.7, Jackknife1 = 835.3, Jackknife2 = 921.8 and Bootstrap = 729.5), between 69% and 87% (Supplementary material Fig. S2). There was a trend of higher richness towards the region near the mouth during both seasons, while in CH it was in the region farthest from the mouth. Richness of MOTUs was higher in the dry season for C and for CH (Supplementary material Fig. S3 and Fig. S4). Significant richness differences were found between the CH regions during the rainy season (ANOVA,  $F_{2,6} = 7.926$ ,  $p = 0.0207$ ), specifically between the N-F regions (Tukey HSD,  $p = 0.0205$ ), (Fig. 4). MOTUs richness showed moderate correlations with environmental factors such as salinity (Pearson,  $r = -0.69$ ,  $p = 0.016$ ) and pH (Pearson,  $r = 0.46$ ,  $p = 0.0746$ ) with highest correlation in CH (Supplementary material Fig. S11); meanwhile, C showed a high correlation with temperature (Pearson,  $r = 0.45$ ,  $p = 0.1087$ ) and salinity (Pearson,  $r = -0.36$ ,  $p = 0.0488$ ) (Supplementary material Fig. S12).

For microeukaryotes, MOTUs richness (S) was higher in both lagoon systems during the rainy season; being higher in CH (1818) than in C (1470) (Supplementary material Fig. S7 and Fig. S8). The richness of total MOTUs obtained in these samples was very close to that suggested by the richness estimators (Chao = 4225.3, Jackknife1 = 4151.4, Jackknife2 = 4759.7 and Bootstrap = 3519.67), between 71 % and 85 % (Supplementary material Fig. S6). However, no significant differences were found globally among the regions of both lagoons in both seasons. (Fig. 4). Meanwhile, the correlation of S with the environmental parameters was low. In CH, the parameter with the highest correlation was salinity (Pearson,  $r = 0.51$ ,  $p = 0.1326$ ) followed by temperature (Pearson,  $r = -0.41$ ,  $p = 0.1907$ ) and in C the highest correlations were with the OD (Pearson,  $r = -0.13$ ,  $p = 0.0393$ ) and pH (Pearson,  $r = 0.11$ ,  $p = 0.8030$ ) (Supplementary material Fig. S13 and Fig. S14).

*Composition and structure of the marine-coastal metazoan and eukaryotic community in both lagoon systems*

Metazoan and microeukaryote community composition based on presence and absence of taxa showed no difference between both lagoon systems or in each lagoon system between seasons (PERMANOVA  $p > 0.05$ ). After the pairwise comparisons, no significant differences were found between the C regions, but there were differences in CH for the metazoans; for CH, N-M (PERMANOVA  $df = 6$ ,  $t = 1.2598$ ,  $p = 0.047$ ), N-F (PERMANOVA  $df = 7$ ,  $t = 1.9294$ ,  $p = 0.006$ ) and M-F (PERMANOVA  $df = 7$ ,  $t = 1.5704$ ,  $p = 0.006$ ). No differences in N, M, F metazoan communities were observed between seasons in either lagoon; nor between lagoons. For the microeukaryotes in C, the different regions were N-F (PERMANOVA  $df = 7$ ,  $t = 1.239$ ,  $p = 0.032$ ); in CH the different regions were N-F (PERMANOVA  $df = 11$ ,  $t = 1.8322$ ,  $p = 0.002$ ) and M-F (PERMANOVA  $df = 12$ ,  $t = 1.4211$ ,  $p = 0.005$ ). In the dry season in CH, differences between M-F were observed (PERMANOVA  $df = 6$ ,  $t = 1.299$ ,  $p = 0.034$ ), whereas in the rainy season between N-F (PERMANOVA  $df = 6$ ,  $t = 1.427$ ,  $p = 0.019$ ) and M-F (PERMANOVA  $df = 6$ ,  $t = 1.2311$ ,  $p = 0.034$ ). CH microeukaryotic community composition was similar in the far region F regardless of season, while microeukaryotic community composition was significantly different in M and N regions between seasons (Fig 5). Comparing the same region across the two lagoons, the only significant differences were found in the rainy season with region F (PERMANOVA  $df = 6$ ,  $t = 1.5022$ ,  $p = 0.041$ ).

Generally, the same metazoan phyla marked the differences between the seasons and the lagoon systems (molluscs, arthropods, nematodes, cnidarians and chordates). Arthropoda and Chordata were the main groups contributing to the differentiation between regions in both lagoon systems in both seasons, followed by Nematoda and Cnidaria in C and by Mollusca, Cnidaria and Annelida in CH, according to the SIMPER analysis of MOTUs relative abundance richness. Regarding microeukaryotes, the SIMPER analysis showed that Stramenopile diatoms made the largest contribution to the differentiation between regions, followed by Alveolata (Apicomplexa, Ciliophora, Dinoflagellata and Protalveolata) and Rhizaria (mainly, Cercozoa and to a lesser extent Rotaria) in C

during both seasons, while in CH, the largest contribution was made by the organisms belonging to the SAR (Stramenopiles-Alveolata- Rhizaria) group, with Alveolata showing the highest values, followed by Stramenopiles and Rhizaria.

Metazoans showed a strong correlation with salinity ( $c = 0.95$ ), temperature ( $c = -0.94$ ) and pH ( $c = -0.83$ ) in CH, while a gradient in the distribution of the community in the sediment influenced by pH ( $c = -0.86$ ) and depth ( $c = -0.72$ ) was identified in C in both seasons (Supplementary material Fig. S9). Microeukaryotic community composition showed a greater correlation with temperature ( $c = -0.97$ ), salinity ( $c = 0.96$ ) and pH ( $c = -0.86$ ) in CH (Supplementary material Fig. S15). Meanwhile in C, a greater correlation of the distribution of organisms with pH ( $c = -0.92$ ) was observed in the three regions in both seasons. The difference between seasons was marked by salinity ( $c = -0.97$ ) and temperature ( $c = 0.96$ ), thus, the regions in both lagoons had higher salinity values during the dry season than during the rainy season (Supplementary material Fig. S15).

## **Discussion**

Metabarcoding has revolutionised the detection of benthic biodiversity <sup>11,61–63</sup>. Leveraging this method, the current study detected and documented the richness of metazoans and microeukaryotes in these lagoons, and in the wider region, for the first time. Taxonomic composition was similar to those of other metabarcoding studies in benthic environments, where the most abundant MOTUs correspond to Arthropoda, Mollusca, Annelida, Ochrophyta, Cercozoa and Ciliophora <sup>11,17,27,64–66</sup>. In this study, the recovery of eDNA from sediments revealed the presence of groups that are usually difficult to identify with the naked eye such as meiofauna, particularly Nematoda, and microeukaryotes <sup>41,67</sup>. Previous studies have shown that in aquatic systems, using metabarcoding to identify the benthic community, a greater number of MOTUs is obtained when using sediment samples compared to water samples <sup>41</sup>. A much higher richness of phyla was recovered using this method when compared to previous studies in these lagoon systems made with traditional taxonomy,

which are focused in specific groups<sup>34,37,38,68</sup>. In comparison to many molecular studies, the approach used (homogenized sediment, combined with 10g extraction) is likely to have captured the most of the eukaryotic diversity within the evaluated sediments; however, without complete records of the metazoan and microeukaryotic communities in these lagoon systems, it's unknown whether these samples are representative of the diversity of the entire lagoon system. However, the data collected for the current study considerably enhances the existing inventories<sup>69</sup>.

#### *Hidden Biodiversity: New reports for coastal lagoons in the area*

Species that have not been previously identified in the area were also detected; among the newly reported organisms, some were non-indigenous, invasive or harmful species, and others were bioindicators of the ecosystem's health. The barnacle *Amphibalanus eburneus*, an invasive arthropod species native to the American Atlantic was found; in the Mexican Pacific it had already been reported in the Gulf of California, and further south<sup>70,71</sup>, the Corralero lagoon (this study) being the southernmost register so far. Within the copepods, the genus *Calanus* in CH was reported for the first time in the area; *Cletocamptus deitersi* had been previously reported in coastal lagoon systems and in estuaries in the coastal part of the northern Mexican Pacific Ocean in Sinaloa<sup>72</sup>; in the present study it was found only in the Corralero lagoon. The *Macrothrix* genus (Branchiopoda), is a cosmopolitan genus composed mostly of freshwater specimens and a few others that have ventured into marine environments, in plankton and benthos (associated with mud and debris); it has also been found in coastal lagoons and open waters often carried in vegetation<sup>73-75</sup>.

Although microeukaryotes have not been thoroughly studied in the area, there are records of some dinoflagellates of the genera *Alexandrium*, *Gymnodinium* and *Amphidinium* in the Mexican Pacific, which can cause human and animal intoxication via the consumption of shellfish containing these organisms<sup>76,77</sup>. These genera were identified for the first time in these lagoon systems in the current study, and could pose a risk to the Indigenous communities in the region for whom artisanal fisheries are a primary source of subsistence. Some of the dinoflagellates found in the sediments, mostly

present in C and previously identified in the North of the Mexican Pacific <sup>76,78</sup>, represent a risk for aquaculture activities (shrimp farming and the fattening of fishes in captivity), marine megafauna and human health <sup>79,80</sup>, such as *Alexandrium leei*, *A. ostenfeldii*, *A. pohangense*, *Amphidinium klebsii*, *Prorocentrum triestinum*, *Lingulodinium polyedrum* and *Gonyaulax spinifera* <sup>77,78,81</sup>. Other non-toxic and grazer dinoflagellates were found too, *Gyrodinium jinhaense*, *Pellucidodinium psammophilum*, and *Nusuttodinium amphidinioides* <sup>82,83</sup>. The algal blooms in these lagoons may be associated with the resuspension of cysts from the sediment to the water column due to dredging, anthropogenic contamination, eutrophication and hypoxia that reaches these water bodies <sup>84</sup>. Furthermore, a total of 981 OTUs showed no hit on the Genebank; this represents a great amount of biodiversity that is yet to be discovered.

*Taxonomic composition and structure of the marine-coastal metazoan and eukaryotic community and its relation with environmental lagoon conditions*

The results obtained from the ANOVA show that the variations in the physicochemical parameters in the two lagoons over the two collection periods, show a typical characteristic of a coastal lagoon, where seasonal changes in the flow of rivers, changes in waves and tides, and meteorological variations, modify their salinity, temperature, dissolved oxygen, pH and depth <sup>1,8</sup>. Clear differences can be found between the areas near the mouth of the lagoon with marine influence, and far from the mouth of the lagoon with influence of rivers or freshwater sources. Being the middle zone, the transition zone between the other two areas, it is possible that here there is a mix of terrestrial, freshwater and marine MOTUs given the nature of the system. It is also plausible that we may have several MOTUs associated with individual taxa.

The distribution of benthic diversity in these lagoons has a strong relationship with environmental parameters, both lagoons show a transition from freshwater to seawater near the mouth of the system. This transition is not only observed in the physicochemical parameters, as it is more evident with salinity, but also with the biological community that inhabits the system. Salinity in these water bodies

is the environmental characteristic that has the greatest effect on the biota <sup>85</sup>, however, it should be taken into account that these environmental variables do not necessarily act independently on organisms <sup>86,87</sup>. It is well known that salinity has an impact on the richness of crustaceans <sup>9,88</sup>, molluscs <sup>86,89,90</sup> and cnidarians <sup>91</sup>; as well as in the microeukaryotic community, such as Ochrophyta (diatoms) <sup>92</sup>. There is a strong correlation between salinity and the protist community in the coastal lagoons, generating a gradient in diversity <sup>93-95</sup>. Distinct differences in richness of taxa between the lagoons was observed, with CH being richer in metazoan and microeukaryotes MOTUs than C, considering the two seasons. Our results show that although the two lagoon systems are similar in terms of the composition of metazoans and microeukaryotes, they are different in relative abundance in each lagoon, resulting in regional partitioning of the diversity for CH. This regional partitioning is clearer in the dry season, and salinity seems to be the driving factor in community composition. The dominant taxa driving this dissimilarity between regions were Arthropoda (148 MOTUs), Cnidaria (33 MOTUs), Mollusca (32 MOTUs) and Annelida (30 MOTUs). In other Mexican coastal lagoons, the diversity of marine metazoans (vertebrates and invertebrates) is usually slightly higher in groups such as Mollusca, Crustacea and Polychaeta <sup>96</sup>. However, the lower diversity presented in C can be explained by the varied environmental conditions due to shallow depth and restricted communication with the sea, as has been observed in Mediterranean lagoons <sup>97</sup>. Clearly, for C the diversity in the region near the mouth of the lagoon was greater in the two seasons for the metazoans and microeukaryotes; in CH, a clear predominance of marine species was observed in microeukaryotes, whereas in metazoans brackish species predominate. This result shows that the values of diversity indices tend to decrease as the degree of confinement within the lagoons increases <sup>97</sup>.

Even though the composition of taxa in the two systems is very similar, differences are found in the total number of MOTUs of metazoans and microeukaryotes in the two lagoon systems which could have been down to the differences in the sampling effort for both lagoons. The protected system (CH) is more diverse, with clear differences in the composition between regions due to their environmental

differences. Clearly, the middle region of CH represents the transition, both physiochemically and biologically, between the marine and brackish environments. The opposite occurs in C, where the environmental characteristics are more homogeneous between regions at each time throughout the lagoon system. This may be due to the more restricted communication with the sea. Therefore, when the mouth of the lagoon is closed, it has a bigger influence of freshwater, which drastically changes the environmental configuration of the system and consequently the distribution of the biological community. Another factor that can directly affect diversity in C is the dredging carried out with high periodicity and the deposition of sediments in different parts of the system. Dredging moves organisms from one region to another, causing the loss of diversity that a heterogeneous environment usually provides. This effect is more evident in the metazoan community, which includes groups of commercial and alimentary importance, evidencing the benefits of the partial state of conservation of the CH system and the importance of Ramsar sites.

Although the comparison between previous studies and the present was one of our main research questions in order to give perspective to the efficiency of the metabarcoding technique, this has proven to be very difficult due to a couple of reasons. Previous biodiversity studies in Chacahua have focused primarily on certain species of invertebrates (polychaetes and molluscs), so the comparison would be limited only to these taxa<sup>98,99</sup>. Secondly, when doing this comparison of species, we found only a few coincidences of conspicuous species such as *Mytella strigata* (mollusc of commercial importance). These could be mainly because although through the years there has been several efforts to characterise the biodiversity of these groups in the area, these efforts have not been accompanied by the genetic characterisation of the specimens, therefore a species reference library is not available, for this reason some of the BLAST hits would not be able to find the exact species and will give the closest register they have. Another reason is that some of the species have changed names, for example *Tryonia robusta* is now *Ipnobius robustus* and *Neritina granosa* is now *Neritona granosa*, these changes in taxonomic situation are difficult to identify if you are not a specialist in the group.

Regarding polychaetes, several genera have already been registered in the Southern Mexican Pacific such as *Branchiomma*, *Neanthes*, and *Polydora*, but they include numerous species that most likely have not been sequenced. There are other groups of meiofauna annelids that have not been studied in the Southern Mexican Pacific at all (*Doliodrilus*, *Thalassodrilides*, *Pontoscolex*, *Protodrilus*), our results becoming their first registers.

In conclusion, eDNA metabarcoding of sediments has proven an important contribution to the documentation of relevant species and groups in tropical coastal lagoons expanding the information contained in databases for a very biodiverse area. It also provides insight into the space-time landscape of this type of ecosystem and reveals the presence of some groups of metazoans and microeukaryotes that had not been previously registered in Mexico's coastal lagoons, such as oligochaetes, rotifers, nematodes, gills, turbellarians, cestodes and bryozoans. It was also possible to observe the regional partitioning of diversity in both lagoons depending on the distance from the mouth (entry of marine water and changes in salinity). Although spatial differences are observed in the two lagoon systems at two different times, there is a clear regional partitioning of the diversity (in terms of dominant groups). In order to establish a clear seasonal pattern, it is recommended that future studies extend the time and/or the periodicity of the samplings. Despite this limitation of the current study, a temporal component can be seen in both lagoon systems.

The species registered in this study and the reproducibility of this technique in future samplings will allow increasing knowledge and monitoring of the diversity dynamics of these ecosystems, since some are of fishing, commercial and bioprospecting importance. It is also crucial to monitor the presence of previously undetected groups that could be related to anthropogenic impact such as parasites, invasive species and toxic algal blooms. For all these reasons, metabarcoding turns out to be a fairly efficient means to monitor biodiversity, providing fast information on the distribution and abundance of species in a changing world where the rate of loss and extinction may surpass our understanding of it, especially in communities where small size organisms are found <sup>66,100,101</sup>.

However, eDNA metabarcoding should go hand in hand with traditional taxonomy to improve the development of more precise barcoding reference libraries that will allow for a more efficient biomonitoring and species inventory especially in areas of great diversity with the potential to find new species<sup>102</sup>.

#### *Data accessibility*

Raw sequence data was uploaded to the European Nucleotide Archive under the project accession: PRJEB46791

Environmental data and OTU tables are uploaded as supplementary information.

#### **CRedit authorship contribution statement**

**M.L. Castro-Cubillos:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing - Original Draft and Visualization.

**J.D. Taylor:** Methodology, Software, Resources, Data Curation, Investigation, Supervision, Writing - Review & Editing.

**A. Mastretta-Yanes:** Writing - Review & Editing.

**F. Benítez-Villalobos:** Methodology, Writing - Review & Editing.

**V. Islas-Villanueva:** Resources, Investigation, Writing - Review & Editing, Funding acquisition, Project administration.

#### **Declaration of competing interest**

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### **Acknowledgements**

The authors thank the authorities and the community of Lagunas de Chacahua National Park and the community of Corralero for allowing us to sample in these two lagoon systems. To Máximo Mayren, José Manuel Martino Domínguez and Vicente Pizá Romero. To Sergio Vásquez Mendoza, Eladio Espinosa, Andrés Pacheco for their assistance during the sampling. To Dr. Rolando Bastida-Zavala

and Dra. Norma A. Luján-Barrientos for their insights into the taxonomy of Annelida and Mollusca from Oaxaca. To Prof. Stefano Mariani for his recommendations to the project. To Dr. Amy Deacon from the University of West Indies and Miss Anna Cortessio for proofreading this manuscript. To CONACYT for the personal doctoral scholarship for Margoth Liliana Castro Cubillos, (CVU): 696644/591840. This work was carried out under the financing of the CONACYT Project PDCPN2015\_1418. Joe Taylor was funded by a University of Salford Career Development Fellowship.

### Supplementary data

### References

1. Basset, A., Elliott, M., West, R. J. & Wilson, J. G. Estuarine and lagoon biodiversity and their natural goods and services. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **132**, 1–4 (2013).
2. Newton, A. *et al.* Assessing, quantifying and valuing the ecosystem services of coastal lagoons. *J. Nat. Conserv.* **44**, 50–65 (2018).
3. Heck, K. L., Able, K. W., Roman, C. T. & Fahay, M. P. Composition, abundance, biomass, and production of macrofauna in a New England estuary: Comparisons among eelgrass meadows and other nursery habitats. *Estuaries* **18**, 379–389 (1995).
4. Franco, A. *et al.* Use of shallow water habitats by fish assemblages in a Mediterranean coastal lagoon. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **66**, 67–83 (2006).
5. Barbosa, F. A. R., Scarano, F. R., Sabará, M. . & Esteves, F. A. Brazilian LTER : Ecosystem and Biodiversity Information in Support of Decision-Making. *Environ. Monit. Assess.* **90**, 121–133 (2004).
6. Esteves, F. *et al.* Neotropical coastal lagoons : An appraisal of their biodiversity , functioning , threats and conservation management. *Braz. J. Biol.* **68**, 967–981 (2008).
7. Kjerfve, B. Coastal lagoons. *Elsevier Oceanogr. Ser.* **60**, 1–8 (1994).
8. Whitfield, A. K. Coastal Lagoons – Critical Habitats of Environmental Change. *Mar. Biol. Res.* **7**, 416–417 (2011).
9. Obolewski, K. *et al.* Patterns of salinity regime in coastal lakes based on structure of benthic invertebrates. *PLoS One* **13**, 1–19 (2018).
10. Schallenberg, M., Hall, C. J. & Burns, C. W. Consequences of climate-induced salinity increases on zooplankton abundance and diversity in coastal lakes. *Mar. Ecol. - Prog. Ser.* **251**, 181–189 (2003).
11. Broman, E. *et al.* Salinity drives meiofaunal community structure dynamics across the Baltic ecosystem. *Mol. Ecol.* **28**, 3813–3829 (2019).

12. Bird, E. C. F. Physical Setting and Geomorphology of Coastal Lagoons. in *Elsevier Oceanography Series* vol. 60 9–39 (1994).
13. Barnes, N., Bamber, R. N., Moncrieff, C. B., Shearer, M. & Ferrero, T. J. Estuarine , Coastal and Shelf Science Meiofauna in closed coastal saline lagoons in the United Kingdom : Structure and biodiversity of the nematode assemblage. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **79**, 328–340 (2008).
14. Frühe, L. *et al.* Supervised machine learning is superior to indicator value inference in monitoring the environmental impacts of salmon aquaculture using eDNA metabarcodes. *Mol. Ecol.* **00**, 1–19 (2020).
15. Cordier, T. *et al.* Multi-marker eDNA metabarcoding survey to assess the environmental impact of three offshore gas platforms in the North Adriatic Sea (Italy). *Mar. Environ. Res.* **146**, 24–34 (2019).
16. Balzano, S., Abs, E. & Leterme, S. C. Protist diversity along a salinity gradient in a coastal lagoon. *Aquat. Microb. Ecol.* **74**, 263–277 (2015).
17. Polinski, J. M., Bucci, J. P., Gasser, M. & Bodnar, A. G. Metabarcoding assessment of prokaryotic and eukaryotic taxa in sediments from Stellwagen Bank National Marine Sanctuary. *Sci. Rep.* **9**, 14820 (2019).
18. López-Escardó, D. *et al.* Metabarcoding analysis on European coastal samples reveals new molecular metazoan diversity. *Sci. Rep.* **8**, 1–14 (2018).
19. Günther, B., Knebelberger, T., Neumann, H., Silke, L. & Arbizu, P. M. Metabarcoding of marine environmental DNA based on mitochondrial and nuclear genes. *Sci. Rep.* **8**, 1–13 (2018).
20. Park, D. S. & Razafindratsima, O. H. Anthropogenic threats can have cascading homogenizing effects on the phylogenetic and functional diversity of tropical ecosystems. *Ecography (Cop.)*. **42**, 148–161 (2019).
21. Pan, Y., Yang, J., McManus, G. B., Lin, S. & Zhang, W. Insights into protist diversity and biogeography in intertidal sediments sampled across a range of spatial scales. *Limnol. Oceanogr.* **65**, 1103–1115 (2020).
22. Wangensteen, O. S., Palacín, C., Guardiola, M. & Turon, X. DNA metabarcoding of littoral hard-bottom communities: high diversity and database gaps revealed by two molecular markers. *PeerJ* **6**, e4705 (2018).
23. Polanco Fernández, A. *et al.* Comparing environmental DNA metabarcoding and underwater visual census to monitor tropical reef fishes. *Environ. DNA* **00**, 1–15 (2020).
24. Armeli Minicante, S. *et al.* Habitat Heterogeneity and Connectivity: Effects on the Planktonic Protist Community Structure at Two Adjacent Coastal Sites (the Lagoon and the Gulf of Venice, Northern Adriatic Sea, Italy) Revealed by Metabarcoding. *Front. Microbiol.* **10**, 1–16 (2019).
25. Alves-De-Souza, C. *et al.* Does environmental heterogeneity explain temporal  $\beta$  diversity of small eukaryotic phytoplankton? Example from a tropical eutrophic coastal lagoon. *J. Plankton Res.* **39**, 698–714 (2017).

26. Grzebyk, D. *et al.* Insights into the harmful algal flora in northwestern Mediterranean coastal lagoons revealed by pyrosequencing metabarcodes of the 28S rRNA gene. *Harmful Algae* **68**, 1–16 (2017).
27. Lallias, D. *et al.* Environmental metabarcoding reveals heterogeneous drivers of microbial eukaryote diversity in contrasting estuarine ecosystems. *ISME J.* **9**, 1208–1221 (2015).
28. Avó, A. P. *et al.* DNA Barcoding and Morphological Identification of Benthic Nematodes Assemblages of Estuarine Intertidal Sediments: Advances in Molecular Tools for Biodiversity Assessment. *Front. Mar. Sci.* **4**, 1–16 (2017).
29. Behera, P. *et al.* Salinity and macrophyte drive the biogeography of the sedimentary bacterial communities in a brackish water tropical coastal lagoon. *Sci. Total Environ.* **595**, 472–485 (2017).
30. Alsaffar, Z. *et al.* The role of seagrass vegetation and local environmental conditions in shaping benthic bacterial and macroinvertebrate communities in a tropical coastal lagoon. *Sci. Rep.* **10**, 1–17 (2020).
31. Spalding, M. D. *et al.* Marine Ecoregions of the World : A Bioregionalization of Coastal and Shelf Areas. *Bioscience* **57**, 573–583 (2007).
32. Lara-Lara, J. Los ecosistemas marinos. *Cap. Nat. México I*, 135–159 (2008).
33. García-Grajales, J. & Buenrostro-Silva, A. El Parque Nacional Lagunas de Chacahua , Oaxaca : perspectivas a sus 75 años. *Cienc. Ergo Sum* **21**, 149–153 (2014).
34. Zamorano, P., Barrientos-Luján, N. A. & Ahumada-Sempoal, M. Á. Moluscos bentónicos de dos sistemas lagunares de la costa chica de Oaxaca, México y su relación con parámetros fisicoquímicos. *Cienc. y Mar* **14**, 13–28 (2012).
35. Sanay-González, R., Monreal Gómez, M. A. & Salas de León, D. A. Simulación de la circulación en el sistema lagunar Chacahua-Pastoría, Oaxaca, México. *Cienc. y Mar* **10**, 3–16 (2006).
36. Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca. *Obras de dragado y escolleras en Boca de Oro, laguna de Corralero, Oaxaca.* (2010).
37. Sánchez-Meraz, B. & Martínez-Vega, J. A. Inmigración de Postlarvas de Camarón *Litopenaeus* sp. y *Farfantepenaeus* sp. a través la Boca El Oro del Sistema Lagunar Corralero-Alotengo, Oaxaca. *Cienc. y Mar* **4**, 29–46 (2000).
38. Angel-Pérez, C., Serrano-Guzmán, S. J. & Ahumada-Sempoal, M. A. Ciclo reproductivo del molusco *Atrina maura* (Pterioidea: Pinnidae) en un sistema lagunar costero, al sur del Pacífico tropical mexicano. *Rev. Biol. Trop.* **55**, 839–852 (2007).
39. Sánchez Méndez, E., Urbano Alonso, B., Sierra Hernández, S. & Garcés Salazar, J. L. Características malacológicas y sociales de la pesquería artesanal de moluscos en la Laguna de Chacahua, Oaxaca, México. *Cienc. y Mar* **19**, 3–11 (2015).
40. Cowart, D. A. *et al.* Metabarcoding Is Powerful yet Still Blind : A Comparative Analysis of Morphological and Molecular Surveys of Seagrass Communities. *PLoS One* **10**, 1–26 (2015).

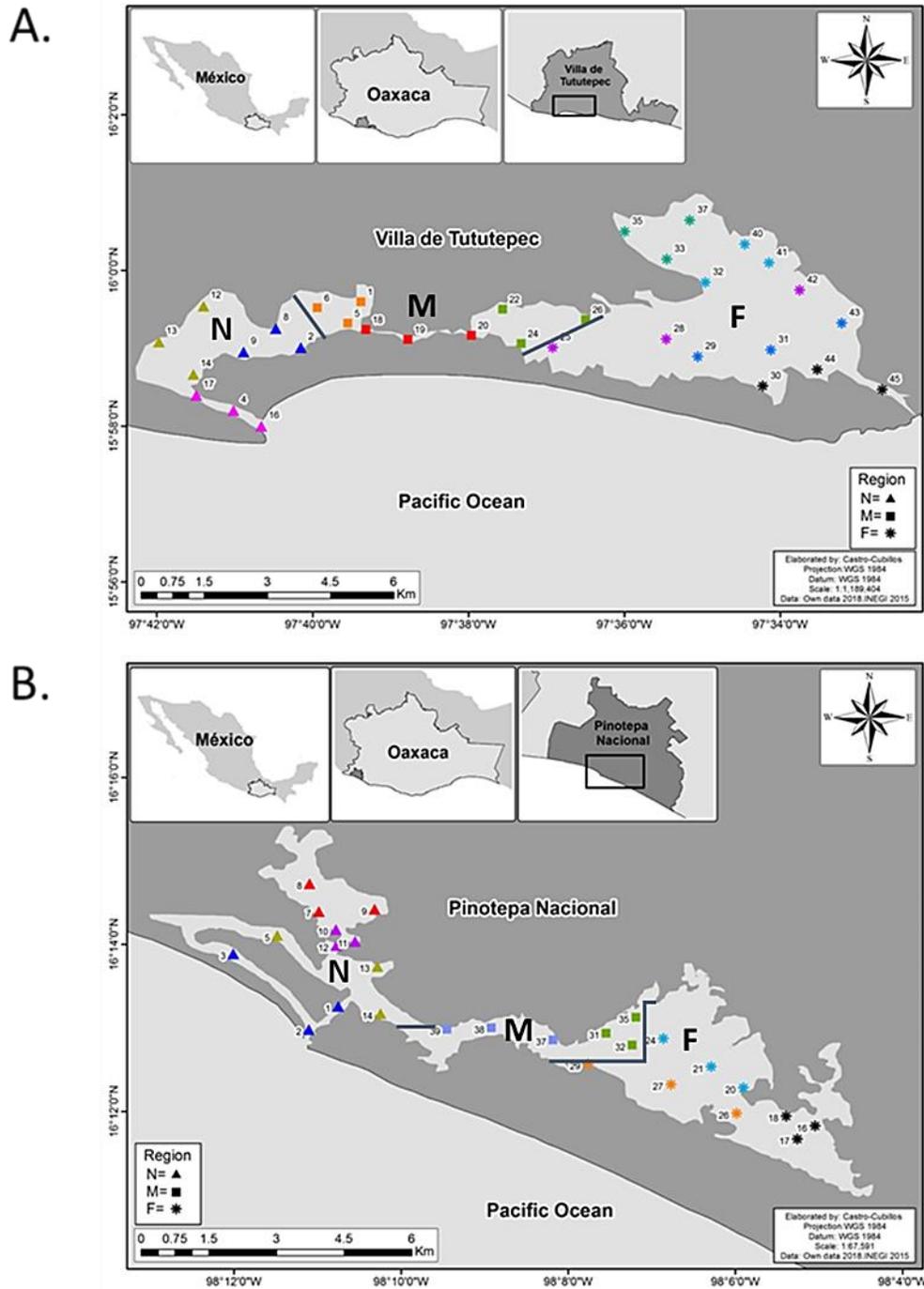
41. Holman, L. E. *et al.* Detection of novel and resident marine species using environmental DNA metabarcoding of sediment and water. *Sci. Rep.* **9**, (2019).
42. Bojorges-Baños, J. C. Riqueza y diversidad de especies de aves asociadas a manglar en tres sistemas lagunares en la región costera de Oaxaca, México. *Rev. Mex. Biodivers.* **82**, 205–215 (2011).
43. Ahumada-Sempoal, M. Á. & Ruiz-García, N. Características fisicoquímicas de la Laguna Pastoría, Oaxaca, México. *Cienc. y Mar* **12**, 3–17 (2008).
44. Aylagas, E., Mendibil, I., Borja, Á. & Rodríguez-ezpeleta, N. Marine Sediment Sample Pre-processing for Macroinvertebrates Metabarcoding: Mechanical Enrichment and Homogenization. **3**, 1–8 (2016).
45. Hestetun, J. T., Lanzén, A., Skaar, K. S. & Dahlgren, T. G. The impact of DNA extract homogenization and replication on marine sediment metabarcoding diversity and heterogeneity. *Environ. DNA* **3**, 997–1006 (2021).
46. Comeau, M., Li, W. K. W., Carmack, E. C. & Lovejoy, C. Arctic Ocean Microbial Community Structure before and after the 2007 Record Sea Ice Minimum. *PLoS One* **6**, 1–12 (2011).
47. Caporaso, J. G. *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* **7**, 335–336 (2010).
48. Edgar, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **26**, 2460–2461 (2010).
49. Martin, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* **17.1** **17**, 10–12 (2011).
50. Edgar, R. C. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat. Methods* **10**, 996–998 (2013).
51. Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C. & Knight, R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* **27**, 2194–2200 (2011).
52. Quast, C. *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project : improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* **41**, 590–596 (2013).
53. Ratnasingham, S. & Hebert, P. D. N. BOLD : The Barcode of Life Data System. *Mol. Ecol. Notes* **7**, 355–364 (2007).
54. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. (2018).
55. Anderson, M. J. Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA). *Wiley StatsRef Stat. Ref. Online* 1–15 (2017) doi:10.1002/9781118445112.stat07841.
56. Ter Braak, C. J. F. Canonical Correspondence Analysis: A New Eigenvector Technique for Multivariate Direct Gradient Analysis. *Ecology* **67**, 1167–1179 (1986).
57. Ter Braak, C. J. F. The analysis of vegetation-environment relationships by canonical correspondence analysis\*. *Vegetatio* **69**, 69–77 (1987).
58. Hammer, Ø., Harper, D. A. T. & Ryan, P. D. PAST : Paleontological statisticssoftware package

- for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.* **4**, 1–9 (2001).
59. Coan, E. V. & Valentich-Scott, P. *Bivalve seashells of tropical west America. Marine bivalve mollusks from Baja California to Northern Peru.* (Santa Barbara Museum of Natural History, 2012).
  60. MolluscaBase. MolluscaBase eds. *Mytella strigata (Hanley, 1843)* (2022).
  61. Aylagas, E., Borja, Á., Muxika, I. & Rodríguez-ezpeleta, N. Adapting metabarcoding-based benthic biomonitoring into routine marine ecological status assessment networks. *Ecol. Indic.* **95**, 194–202 (2018).
  62. Cronin-O'Reilly, S. *et al.* Limited congruence exhibited across microbial, meiofaunal and macrofaunal benthic assemblages in a heterogeneous coastal environment. *Sci. Rep.* **8**, 1–10 (2018).
  63. Forster, D. *et al.* Benthic protists: The under-charted majority. *FEMS Microbiol. Ecol.* **92**, 1–11 (2016).
  64. Kim, H., Kim, H., Hwang, H. S. & Kim, W. Metagenomic analysis of the marine coastal invertebrates of South Korea as assessed by Illumina MiSeq. *Animal Cells Syst. (Seoul)*. **21**, 37–44 (2017).
  65. Brannock, P. M., Wang, L., Ortmann, A. C., Waits, D. S. & Halanych, K. M. Genetic assessment of meiobenthic community composition and spatial distribution in coastal sediments along northern Gulf of Mexico. *Mar. Environ. Res.* **119**, 166–175 (2016).
  66. Guardiola, M. *et al.* Spatio-temporal monitoring of deep-sea communities using metabarcoding of sediment DNA and RNA. *PeerJ* **4**, e2807 (2016).
  67. Barnes, M. A. & Turner, C. R. The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conserv. Genet.* **17**, 1–17 (2016).
  68. Bastida-Zavala, J. R. *et al.* Marine and coastal biodiversity of Oaxaca , Mexico. *Check List* **9**, 329–390 (2013).
  69. Nascimento, F. J. A., Lallias, D., Bik, H. M. & Creer, S. Sample size effects on the assessment of eukaryotic diversity and community structure in aquatic sediments using high-throughput sequencing. *Sci. Rep.* 1–12 (2018) doi:10.1038/s41598-018-30179-1.
  70. *In the wrong place: alien marine crustaceans: distribution, biology and impacts.* vol. 6 (2011).
  71. Rodríguez-Almaraz, G. a & García-Madrigal, M. D. S. Crustáceos exóticos invasores. *Especies acuáticas invasoras en México* 347–371 (2014).
  72. Gómez, S., Fleeger, J. W., Rocha-, A. & Foltz, D. Four new species of Cletocamptus Schmanke-witsch , 1875 , closely related to Cletocamptus deitersi ( Richard , ) ( Copepoda : Harpacticoida ). 37–41 (2010) doi:10.1080/0022293031000156240.
  73. Ciro's Pérez, J., Silva Briano, M. & Elías Gutierrez, M. A new species of Macrothrix ( Anomopoda : Macrothricidae ) from Central Mexico. *Hydrobiologia* **319**, 159–166 (1996).
  74. Fuentes-Reines, J. M., De Roa, E. Z., Morón, E., Gámez, D. & López, C. Conocimiento de la fauna de cladocera (Crustacea: Branchiopoda) de la ciénaga grande de Santa Marta, Colombia.

- Bol. Investig. Mar. y Costeras* **41**, 121–164 (2012).
75. Thakur, R. K., Jindal, R., Singh, U. B. & Ahluwalia, A. S. Plankton diversity and water quality assessment of three freshwater lakes of Mandi (Himachal Pradesh, India) with special reference to planktonic indicators. *Environ. Monit. Assess.* **185**, 8355–8373 (2013).
  76. Band-Schmidt, C. J., Bustillos-Guzmán, J. J., López-Cortés, D. J., Núñez-Vázquez, E. & Hernández-Sandoval, F. E. The actual state of the study of harmful algal blooms in Mexico. *Hidrobiológica* **21**, 381–413 (2011).
  77. Maciel-Baltazar, E. Dinoflagelados ( Dinoflagellata ) tóxicos de la costa de Chiapas , México , Pacífico centro oriental. *UNED Res. J.* **7**, 39–48 (2015).
  78. Okolodkov, Y. B. & Gárate-Izárraga, I. An annotated checklist of dinoflagellates (Dinophyceae) from the Mexican Pacific. *Acta Bot. Mex.* **74**, 1–154 (2006).
  79. Murray, S. A. *et al.* A fish kill associated with a bloom of *Amphidinium carterae* in a coastal lagoon in Sydney, Australia. *Harmful Algae* **49**, 19–28 (2015).
  80. Gárate-Lizárraga, I. *et al.* Seasonality of the dinoflagellate *Amphidinium cf. carterae* (Dinophyceae: Amphidinales) in Bahía de la Paz, Gulf of California. *Mar. Pollut. Bull.* **146**, 532–541 (2019).
  81. Varona-Cordero, F. & Gutiérrez, J. Seasonal phytoplankton composition of two coastal lagoons of the tropical Pacific. *Hidrobiológica* **16**, 159–174 (2006).
  82. Hyeon, S. & Jin, H. *Gyrodinium jinhaense* n . sp ., a New Heterotrophic Unarmored Dinoflagellate from the Coastal Waters of Korea. *J. Eukaryot. Microbiol.* **66**, 821–835 (2019).
  83. Onuma, R., Watanabe, K. & Horiguchi, T. *Pellucidodinium psammophilum* gen. & sp. nov. and *Nusuttodinium desymbiontum* sp. nov. (Dinophyceae), two novel heterotrophs closely related to kleptochloroplastidic dinoflagellates. *Phycologia* **54**, 192–209 (2015).
  84. Elliott, M. & Whitfield, A. K. Challenging paradigms in estuarine ecology and management. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **94**, 306–314 (2011).
  85. Sreenivasulu, G., Jayaraju, N. & Sundara Raja, R. Physico-chemical parameters of coastal water from Tupilipalem coast, Southeast coast of India. *J. Coast. Sci.* **2**, 34–39 (2015).
  86. Landa-Jaime, V. Benthic mollusc assemblage of the Agua Dulce / El Ermitaño lagoon estuarine system , Jalisco , Mexico. *Ciencias Mar.* **29**, 169–184 (2003).
  87. Smyth, K. & Elliott, M. Effects of changing salinity on the ecology of the marine environment. in *Stressors in the Marine Environment: Physiological and ecological responses; societal implications* (eds. Solan, M. & Whiteley, N.) 384 (Oxford University Press, 2016). doi:10.1093/acprof.
  88. Rivera-Velázquez, G., Soto, L. A., Salgado-Ugarte, I. H. & Naranjo, E. J. Growth, mortality and migratory pattern of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Crustacea, Penaeidae) in the Carretas-Pereyra coastal lagoon system, Mexico. *Rev. Biol. Trop.* **56**, 523–533 (2008).
  89. Gainey, L. F. & Greenberg, M. J. Physiological Basis of the Species Abundance-Salinity Relationship in Molluscs : A Speculation \*. *Mar. Biol.* **40**, 41–49 (1977).

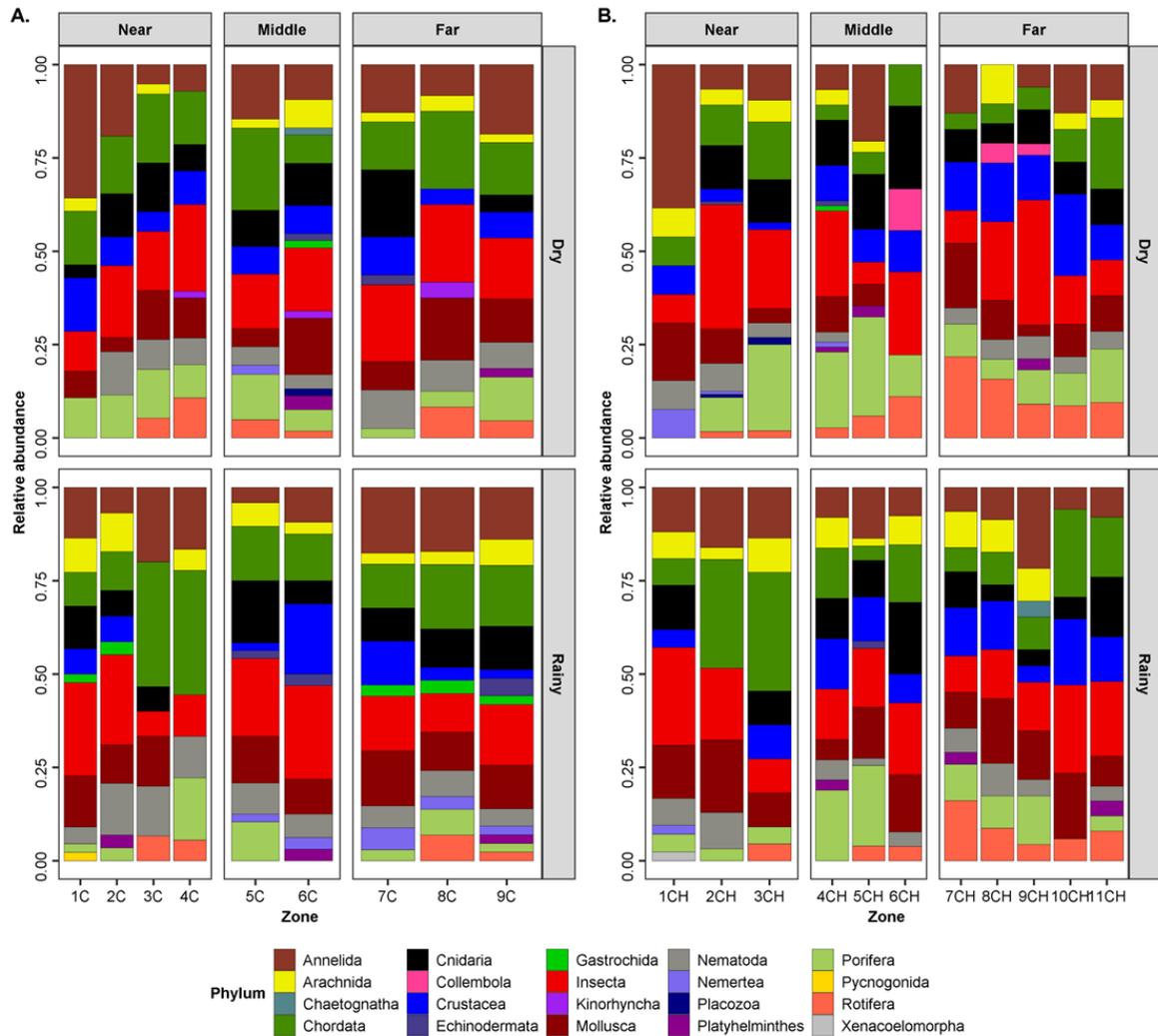
90. Baqueiro-Cárdenas, E. R., Borabe, L. & Goldaracena-Islas, C. G. Mollusks and pollution . A review. *Rev. Mex. Biodivers.* **78**, 1–7 (2007).
91. Purcell, J. E., Uye, S. & Lo, W. Anthropogenic causes of jellyfish blooms and their direct consequences for humans : a review. *Mar. Ecol. - Prog. Ser.* **350**, 153–174 (2007).
92. Nemcová, Y., Pusztai, M., Skaloudová, M. & Neustupa, J. Silica-scaled chrysophytes ( Stramenopiles , Ochrophyta ) along a salinity gradient : a case study from the Gulf of Bothnia western shore ( northern Europe ). *Hydrobiologia* **764**, 187–197 (2016).
93. Li, R., Jiao, N., Warren, A. & Xu, D. Changes in community structure of active protistan assemblages from the lower Pearl River to coastal Waters of the South China Sea. *Eur. J. Protistol.* **63**, 72–82 (2018).
94. Kataoka, T. & Kondo, R. Estuarine , Coastal and Shelf Science Protistan community composition in anoxic sediments from three salinity- disparate Japanese lakes ☆. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **224**, 34–42 (2019).
95. Sun, P. *et al.* Marked seasonality and high spatial variation in estuarine ciliates are driven by exchanges between the ‘ abundant ’ and ‘ intermediate ’ biospheres. *Sci. Rep.* 1–12 (2017) doi:10.1038/s41598-017-10308-y.
96. Contreras, E. F. O., Castañeda, L. R., Torres, A. & Pérez, M. A. H. Problemática sobre las lagunas costeras mexicanas V, Pesquerías. *ContactoSS* **25**, 36–46 (1998).
97. Reizopoulou, S. & Nicolaidou, A. Benthic diversity of coastal brackish-water lagoons in western Greece. *Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.* **14**, 93–102 (2004).
98. Zamorano, P., Barrientos-luján, N. a & Ramírez-luna, S. Malacofauna del infralitoral rocoso de Agua Blanca , Santa Elena Cozaltepec , Oaxaca. *Cienc. y Mar* **12**, 19–33 (2008).
99. Chávez-lópez, Y. & Cruz-gómez, C. New records of polychaetes ( Annelida : Polychaeta ) from three locations of Oaxaca , Mexico. **67**, 157–168 (2019).
100. Thomsen, P. F. *et al.* Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Mol. Ecol.* **21**, 2565–2573 (2012).
101. Thomsen, P. F. & Willerslev, E. Environmental DNA - An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biol. Conserv.* **183**, 4–18 (2015).
102. Miller, S. E., Hausmann, A., Hallwachs, W. & Janzen, D. H. Advancing taxonomy and bioinventories with DNA barcodes. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **371**, 20150339 (2016).

## Figures and tables



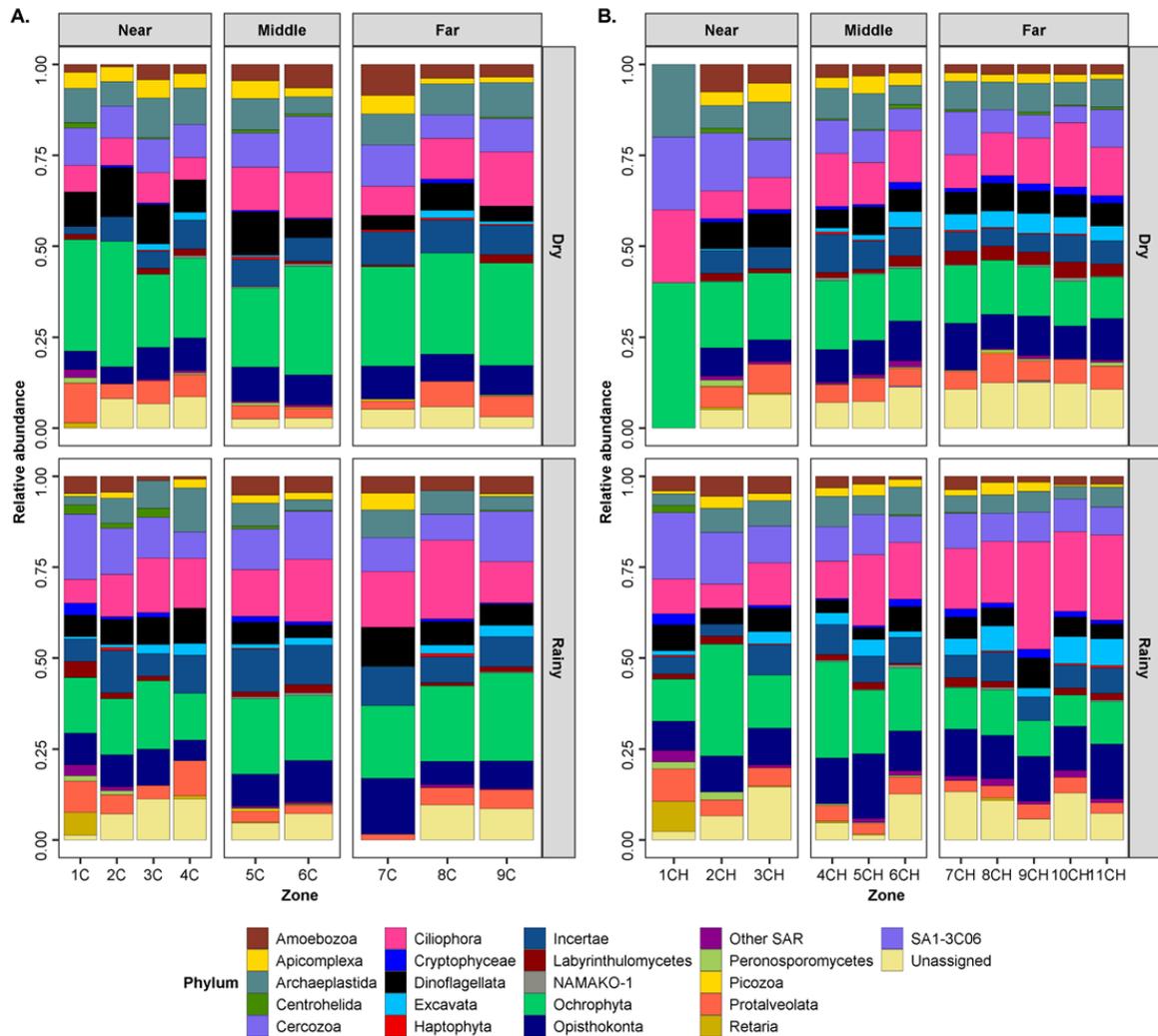
**Figure 1.** Study area and sampling locations in both lagoon systems. A) CH, B) C. Symbols indicate regions ( $\blacktriangle$  = near (N),  $\blacksquare$  = middle (M),  $*$  = far (F)) and different colours indicate areas within regions. The maps in this figure were created with ArcGIS Desktop (Version 10.2), <https://www.esri.com>.

They were generated with own data (sampling points) and data from INEGI (National Institute of Statistics and Geography), <https://en.www.inegi.org.mx>.



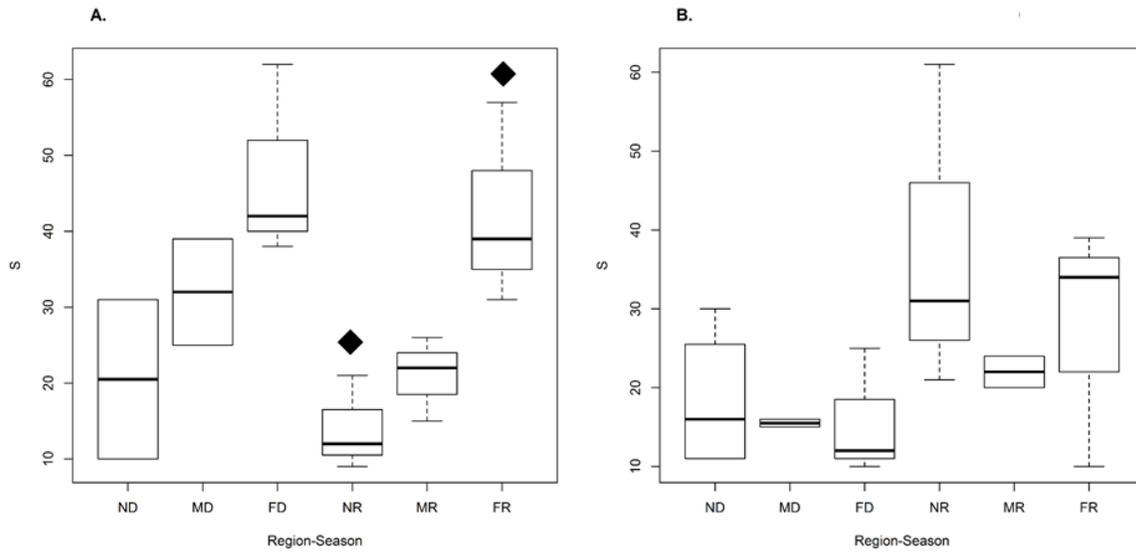
**Figure 2.** Relative abundance of MOTUs of Metazoan phyla in COI amplicon sequence libraries generated from sediments collected from Chacahua-Pastoria and Corralero-Alotengo lagoon systems throughout seasons, regions and lagoon zones. A.) C: Corralero-Alotengo Dry and Rainy seasons. Regions in the lagoon systems (distance to the mouth), N: Near (Zones: 1, 2, 3, 4), M: Middle (Zones: 5, 6) and F: Far (Zones: 7, 8, 9). B.) CH: Chacahua-Pastoria Dry and Rainy seasons. Regions in the

lagoon systems (distance to the mouth), N: Near (Zones: 1, 2, 3), M: Middle (Zones: 4, 5, 6) and F: Far (Zones: 7, 8, 9, 10, 11).

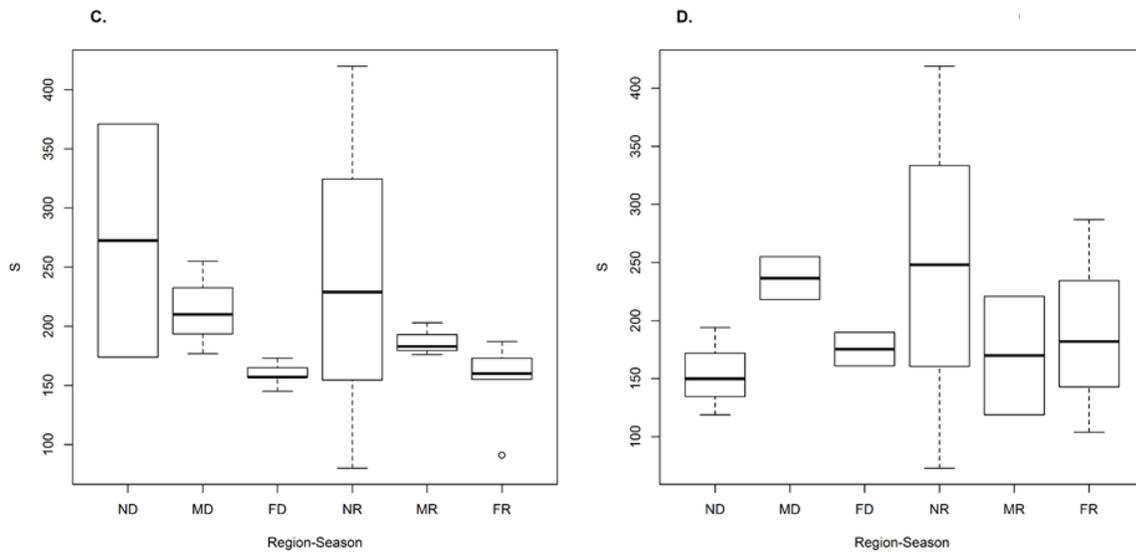


**Figure 3.** Relative abundance of MOTUs of microeukaryotic phyla in 18S-V4 amplicon sequence libraries generated from sediments collected from Chacahua-Pastoria and Corralero-Alotengo lagoon systems throughout seasons, regions and lagoon zones. A.) C: Corralero-Alotengo Dry and Rainy seasons. Regions in the lagoon systems (distance to the mouth), N: Near (Zones: 1, 2, 3, 4), M: Middle (Zones: 5, 6) and F: Far (Zones: 7, 8, 9). B.) CH: Chacahua-Pastoria Dry and Rainy seasons. Regions in the lagoon systems (distance to the mouth), N: Near (Zones: 1, 2, 3), M: Middle (Zones: 4, 5, 6) and F: Far (Zones: 7, 8, 9, 10, 11).

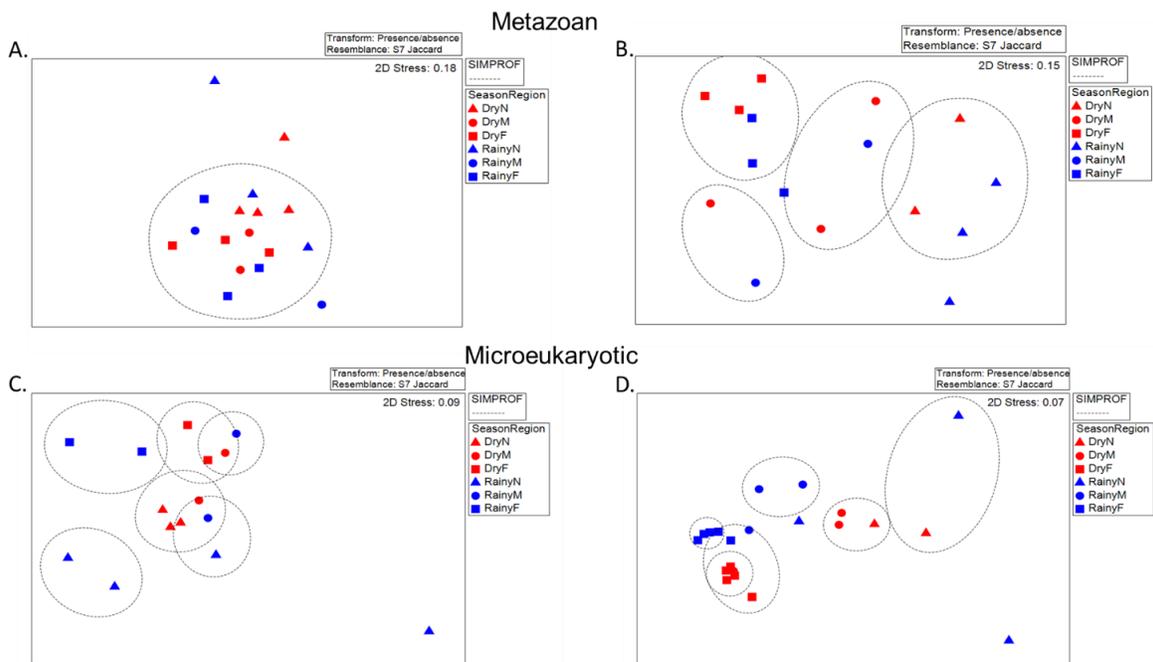
## Metazoan



## Microeukaryotic



**Figure 4.** Boxplots for alpha diversity- richness (S) comparisons of metazoan and micro-eukaryotic communities between the lagoon systems: Metazoans A) CH, B) C; microeukaryotic C) CH, D) C. ♦ indicates significant differences between the pairs of regions analysed (ANOVA,  $F_{2,6} = 7.926$ ,  $p = 0.0207$ ), (Tukey HSD,  $p = 0.0205$ ). On the x-axis (Season-Region) the first letter indicates the region (N, M and F) and the second letter indicates the season (D and R). On the Y axis, the richness of MOTUs is represented.



**Figure 5.** nMDS for metazoan and microeukaryotic communities identified in Corralero-Alotengo and Chachhua-Pastoria lagoon systems in both seasons. Metazoans: A.) C, B) CH. Microeukaryotics: C.) C, D) CH. All the representations have a stress value, for each one a presence/absence transformation and a Jaccard similarity test were applied. Groups were defined by the SIMPROF analysis.

## CONCLUSIONES GENERALES

El metabarcoteo de eDNA de sedimentos ha contribuido de forma importante a la lista de verificación de especies y grupos relevantes en lagunas costeras tropicales, ampliando la información contenida en las bases de datos para un área muy biodiversa. También, permite reconocer la dinámica espacio-temporal de este tipo de ecosistemas y revela la presencia de algunos grupos de metazoos y microeucariotas que no habían sido registrados en las lagunas costeras de México, como oligoquetos, rotíferos, nematodos, braquiopodos, turbelarios, cestodos y briozoos. Se observó la regionalización de la diversidad, de metazoos y micro eucariotas, en ambas lagunas en función de la distancia a la desembocadura (entrada de agua marina y cambios de salinidad).

Se observaron claras diferencias en la riqueza de taxones entre las lagunas, siendo CH más rico en MOTUs de metazoos y microeucariotas que C. Los resultados muestran que, aunque los dos sistemas de lagunas son similares en términos de composición de metazoos y microeucariotas, son diferentes en estructura, lo que resulta en una regionalización de la diversidad para CH. Esta regionalización es más clara en la estación seca y la salinidad parece ser el factor determinante en la composición de la comunidad. Los taxones dominantes que impulsaron esta diferencia entre regiones fueron los artrópodos (148 MOTUs), los cnidarios (33 MOTUs), los moluscos (32 MOTUs) y los anélidos (30 MOTUs).

La composición de la comunidad de procariotas de los sistemas lagunares mostró que hay diferencias entre CH y C, y entre los mismos de secas a lluvias. La composición de la comunidad de procariotas mostró una fuerte correlación con la salinidad en ambos sistemas lagunares, más estrictamente en CH. Tanto en CH como en C, se encontró que la diversidad de arqueas es mayor en la zona marina, tal y como se ha visto en otros sistemas lagunares costeros, donde la diversidad de este grupo incrementó con la salinidad en comparación con las zonas de agua dulce. Los filos bacterianos dominantes fueron Proteobacteria, Chloroflexi y Bacteroidetes en ambos sistemas; en el caso de las arqueas fue Euryarchaeota.

La composición taxonómica de hongos estuvo dominada por Ascomycota en más del 50 % en los dos sistemas lagunares durante las dos temporadas de estudio, al igual que en sedimentos de zonas de manglar en otros sistemas. En cuanto a los hongos, no se observaron diferencias entre temporadas, regiones y las mismas regiones para C, pero sí para CH entre temporadas y regiones. Lo cual obedece a que en CH hay una mayor regionalización en la concentración salina de la columna de agua. Además, los factores ambientales que mayor correlación tuvieron con la distribución de la

comunidad de hongos fue la salinidad, el OD y la temperatura, tal y como se ha observado para otras comunidades de hongos en sistemas marinos donde estos factores impulsan la variación en las mismas.

La composición de la comunidad de procariotas mostró una fuerte correlación con el endosulfán  $\alpha$ , el HCH  $\alpha$ , el DDT y el endrín, en temporada de secas y en general para la laguna Pastoría, permitiendo diferenciar así los grupos de muestras para las dos temporadas y para las dos lagunas dentro del sistema. Por su parte, la comunidad de hongos tuvo una fuerte correlación con el DDD, HCH  $\beta$ , endosulfán  $\alpha$  y el HCH Lindano. Aunque no se ha demostrado el efecto nocivo de alguno de estos compuestos sobre la comunidad de hongos y bacterias en estos sistemas, sí se ha confirmado que los pesticidas contienen algunos compuestos que generalmente persisten en el medio acuático y con el tiempo, las descargas continuas pueden formar mayores depósitos de residuos en los sedimentos.

En la identificación con taxonomía tradicional se detectaron 112 OTUs, mientras que para COI se hallaron 124 MOTUs, 414 MOTUs con 18S-V4 y 402 MOTUs con 18S-V9. Basándose en la cantidad de taxones detectados, los marcadores moleculares mostraron ser más efectivos que la morfología; esto puede deberse a que en algunos grupos los estadios de desarrollo inicial, como larvas y juveniles, resultan difíciles de identificar por su morfología, mientras que con su DNA suele ser menos complicado; también a la presencia de organismos incompletos para los cuales no se cuenta con los apéndices o caracteres morfológicos completos que permitan su identificación. Aunque, la similitud en la composición de la fauna entre las muestras identificadas con técnicas tradicionales y las moleculares resultó ser baja, el código de barras metagenómico ha demostrado en otros estudios, ser sensible para el monitoreo a largo plazo debido a que puede replicar patrones ecológicos en varios años.

## RECOMENDACIONES

Se recomienda hacer uso de marcadores moleculares de diferente tipo, por ejemplo, mitocondriales y nucleares, como los acá usados para lograr detectar una mayor cantidad de grupos taxonómicos y así hacer más eficiente el monitoreo biológico basado en eDNA. Así mismo, el metabarcoding de eDNA debe ir de la mano con la taxonomía tradicional para mejorar el desarrollo de bibliotecas de referencia de códigos de barras más precisas, que permitan un biomonitoreo y un inventario de especies más eficientes, especialmente en áreas de gran diversidad con potencial para encontrar nuevas especies.

Si bien, se observan diferencias espaciales en los dos sistemas lagunares en dos temporadas diferentes, existe una clara regionalización de la diversidad (en términos de grupos dominantes), sin embargo, al tener solo un grupo de muestras por temporada en cada sistema lagunar, estas diferencias no se pueden atribuir a patrones estacionales, se recomienda hacer un muestreo periódico en varios años al mismo tiempo para confirmar esto. Aun así, se puede apreciar un componente temporal en ambos sistemas lagunares.

## REFERENCIAS

- Abreu, C., G. Jurgens, P. De Marco, A. Saano, y A. A. Bordalo. 2001. Crenarchaeota and euryarchaeota in temperate estuarine sediments. *Journal of Applied Microbiology* 90:713–718.
- Achterberg, E. P. 2014. Grand challenges in marine biogeochemistry. *Frontiers in Marine Science* 1:7.
- Adler, P. H. 2004. Sibling Species. *Página Encyclopedia of Entomology*. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Aguilar Jiménez, E. E. 2020. Plaguicidas organoclorados en sedimentos superficiales del sistema lagunar Chacahua-Pastoría, Oaxaca, México. Universidad del Mar.
- Akberali, H. B., y E. R. Trueman. 1985. Effects of Environmental Stress on Marine Bivalve Molluscs. *Advances in Marine Biology* 22:101–198.
- Aldeguer-Riquelme, B., E. Rubio-Portillo, J. Álvarez-Rogel, F. Giménez-Casalduero, X. L. Otero, M. D. Belando, J. Bernardeau-Esteller, R. García-Muñoz, A. Forcada, J. M. Ruiz, F. Santos, y J. Antón. 2022. Factors structuring microbial communities in highly impacted coastal marine sediments (Mar Menor lagoon, SE Spain). *Frontiers in Microbiology* 13:1–18.
- Aldhebiani, A. Y. 2017. Species Concept and Speciation *Saudi Journal of Biological Sciences* Species concept and speciation. *Saudi Journal of Biological Sciences*.
- Alvarado, R. 1966. Sistemática, taxonomía, clasificación y nomenclatura. COL-PA. Publicaciones del Departamento de Paleontología 9:3–8.
- Alvarez-Arellano, A. D., y J. Gaitán Morán. 1994. Lagunas Costeras y el Litoral Mexicano: Geología. *Lagunas Costeras y el Litoral Mexicano*:13–74.
- Alves-De-Souza, C., T. S. Benevides, J. B. O. Santos, P. Von Dassow, L. Guillou, y M. Menezes. 2017. Does environmental heterogeneity explain temporal  $\beta$  diversity of small eukaryotic phytoplankton? Example from a tropical eutrophic coastal lagoon. *Journal of Plankton Research* 39:698–714.
- Amézquita, E. M., J. A. Seim, L. C. Romero, V. Manuel, y M. Rodríguez. 2015. Distribution of trace elements and organic matter in sediments Pastoría-Chacahua lagoon system, Oaxaca. *Revista Latinoamericana el Ambiente y las Ciencias* 6:20–29.
- Anderson, M. J. 2017. *Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA)*. Wiley

StatsRef: Statistics Reference Online:1–15.

- Anderson, M. J., P. J. Somerfield, y Richard M. Warwick, editores. 2021. Special Issue:Analysing Marine Biodiversity Data - In appreciation of K. Robert Clarke. *Austral Ecology* 46:889–1007.
- Angel-Pérez, C., S. J. Serrano-Guzmán, y M. A. Ahumada-Sempoal. 2007. Ciclo reproductivo del molusco *Atrina maura* (Pterioidea: Pinnidae) en un sistema lagunar costero, al sur del Pacífico tropical mexicano. *Revista de Biología Tropical* 55:839–852.
- Anschutz, P., y P. Lecroart. 2007. Phosphorus diagenesis in sediment of the Thau Lagoon. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 72:447–456.
- Anthony, A., J. Atwood, P. August, C. Byron, S. Cobb, C. Foster, C. Fry, A. Gold, K. Hagos, L. Heffner, D. O. Kellog, K. Lellis-Dibble, J. J. Opaluch, C. Oviatt, A. Pfeiffer-Herbet, N. Rohr, L. Smith, T. Smythe, J. Swift, y N. Vinhateiro. 2009. Coastal lagoons and climate change: Ecological and social ramifications in U . S . Atlantic and gulf coast ecosystems. *Ecology and Society* 14:8.
- Avó, A. P., T. J. Daniell, R. Neilson, S. Oliveira, J. Branco, y H. Adão. 2017. DNA Barcoding and Morphological Identification of Benthic Nematodes Assemblages of Estuarine Intertidal Sediments : Advances in Molecular Tools for Biodiversity Assessment. *Frontiers in Marine Science* 4:1–16.
- Aylagas, E., Á. Borja, I. Muxika, y N. Rodríguez-ezpeleta. 2018. Adapting metabarcoding-based benthic biomonitoring into routine marine ecological status assessment networks. *Ecological Indicators* 95:194–202.
- Azevedo, J., J. T. Antunes, A. M. Machado, V. Vasconcelos, P. N. Leão, y E. Froufe. 2020. Monitoring of biofouling communities in a Portuguese port using a combined morphological and metabarcoding approach. *Scientific Reports* 10.
- Baker, R., y R. D. Radley. 2006. SPECIATION IN MAMMALS AND THE GENETIC SPECIES CONCEPT. *Journal of Mammalogy* 87:643–662.
- Balzano, S., E. Abs, y S. C. Leterme. 2015. Protist diversity along a salinity gradient in a coastal lagoon. *Aquatic Microbial Ecology* 74:263–277.
- Band-Schmidt, C. J., J. J. Bustillos-Guzmán, D. J. López-Cortés, E. Núñez-Vázquez, y F. E. Hernández-Sandoval. 2011. The actual state of the study of harmful algal blooms in Mexico.

Hidrobiológica 21:381–413.

- Bandeira, B., J. L. Jamet, D. Jamet, y J. M. Ginoux. 2013. Mathematical convergences of biodiversity indices. *Ecological Indicators* 29:522–528.
- Banerji, A., M. Bagley, M. Elk, E. Pilgrim, J. Martinson, y J. Santo Domingo. 2018. Spatial and temporal dynamics of a freshwater eukaryotic plankton community revealed via 18S rRNA gene metabarcoding. *Hydrobiologia* 818:71–86.
- Baqueiro-Cárdenas, E. R., L. Borabe, y C. G. Goldaracena-Islas. 2007. Mollusks and pollution . A review. *Revista Mexicana De Biodiversidad* 78:1–7.
- Barbosa, F. A. R., F. R. Scarano, M. . Sabará, y F. A. Esteves. 2004. Brazilian LTER : Ecosystem and Biodiversity Information in Support of Decision-Making. *Environmental Monitoring and Assessment* 90:121–133.
- Barnes, M. A., y C. R. Turner. 2016. The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics* 17:1–17.
- Barnes, N., R. N. Bamber, C. B. Moncrieff, M. Shearer, y T. J. Ferrero. 2008. Estuarine , Coastal and Shelf Science Meiofauna in closed coastal saline lagoons in the United Kingdom : Structure and biodiversity of the nematode assemblage. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 79:328–340.
- Basset, A., M. Elliott, R. J. West, y J. G. Wilson. 2013. Estuarine and lagoon biodiversity and their natural goods and services. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 132:1–4.
- Basset, Y., M. Hajibabaei, M. T. G. Wright, A. M. Castillo, D. A. Donoso, S. T. Segar, D. Souto-Vilarós, D. Y. Soliman, T. Roslin, M. A. Smith, G. P. A. Lamarre, L. F. De León, T. Decaëns, J. G. Palacios-Vargas, G. Castaño-Meneses, R. H. Scheffrahn, M. Rivera, F. Perez, R. Bobadilla, Y. Lopez, J. A. Ramirez Silva, M. M. Cruz, A. A. Galván, y H. Barrios. 2022. Comparison of traditional and DNA metabarcoding samples for monitoring tropical soil arthropods (Formicidae, Collembola and Isoptera). *Scientific Reports* 12:1–16.
- Bastida-Zavala, J. R., y M. S. García-Madrugal. 2022. Invertebrados marinos y costeros del Pacífico sur de México José Rolando Bastida-Zavala. Página (J. R. Bastida Zavala y M. del S. García-Madrugal, Eds.). Universidad del Mar.
- Bastida-Zavala, J. R., M. S. García-Madrugal, E. F. Rosas-Alquicira, R. A. López-Pérez, F. Benítez-Villalobos, J. F. Meraz-Hernando, M. Torres-Huerta, A. Montoya-Márquez, y N. A.

- Barrientos-Luján. 2013. Marine and coastal biodiversity of Oaxaca , Mexico. *Check List* 9:329–390.
- Behera, P., S. Mahapatra, M. Mohapatra, J. Y. Kim, T. K. Adhya, V. Raina, M. Suar, A. K. Pattnaik, y G. Rastogi. 2017. Salinity and macrophyte drive the biogeography of the sedimentary bacterial communities in a brackish water tropical coastal lagoon. *Science of the Total Environment* 595:472–485.
- Berkes, F., y C. S. Seixas. 2005. Building resilience in lagoon social-ecological systems: A local-level perspective. *Ecosystems* 8:967–974.
- Bertrán, C., P. Fierro, E. Encalada, F. Peña-Cortés, J. Tapia, E. Hauenstein, y L. Vargas-Chacoff. 2016. Macrobenthos of the coastal Budi Lagoon, southern Chile: Changes associated with seasonal environmental variation. *BJOCE* 64:239–248.
- Bessa De Queiroz, Mariana Khadija, J., J. A. Margarito Vista, Xochitl Souza Leroy, S. R. Basílio Silva Gomes, y B. Tomio Goto. 2015. Occurrence of Glomeromycota species in aquatic habitats: a global overview. *Mycotaxon* 33:36–37.
- Bird, E. C. F. 1994. *Physical Setting and Geomorphology of Coastal Lagoons*. Páginas 9–39 Elsevier Oceanography Series.
- Bittleston, L. S., C. C. M. Baker, L. B. Strominger, A. Pringle, y N. E. Pierce. 2015. Metabarcoding as a tool for investigating arthropod diversity in *Nepenthes* pitcher plants. *Austral Ecology*:1–13.
- Blaxter, M. 2016. Imagining Sisyphus happy: DNA barcoding and the unnamed majority. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 371:20150329.
- Blazejak, A., y A. Schippers. 2010. High abundance of JS-1- and Chloroflexi-related Bacteria in deeply buried marine sediments revealed by quantitative, real-time PCR. *FEMS Microbiology Ecology* 72:198–207.
- Boero, F., G. Belmonte, G. Fanelli, S. Piraino, y F. Rubino. 1996. The continuity of living matter and the discontinuities of its constituents: Do plankton and benthos really exist? *Trends in Ecology and Evolution* 11:177–180.
- Borja, A., J. Franco, y V. Pérez. 2000. A marine Biotic Index to establish the ecological quality of soft-bottom benthos within European estuarine and coastal environments. *Marine Pollution Bulletin* 40:1100–1114.

- Bouchet, P., J. P. Rocroi, B. Hausdorf, A. Kaim, Y. Kano, A. Nützel, P. Parkhaev, M. Schrödl, y E. E. Strong. 2017. Revised classification, nomenclator and typification of gastropod and monoplacophoran families. *Malacologia* 61:1–527.
- Brannock, P. M., y K. M. Halanych. 2015. Meiofaunal community analysis by high-throughput sequencing : Comparison of extraction , quality fi ltering , and clustering methods. *Marine Genomics* 23:67–75.
- Brannock, P. M., A. C. Ortmann, A. G. Moss, y K. M. Halanych. 2016a. Metabarcoding reveals environmental factors influencing spatio-temporal variation in pelagic micro-eukaryotes. *Molecular Ecology* 25:3593–3604.
- Brannock, P. M., D. S. Waits, J. Sharma, y K. M. Halanych. 2014. High-throughput sequencing characterizes intertidal meiofaunal communities in Northern Gulf of Mexico (Dauphin Island and Mobile Bay, Alabama). *Biological Bulletin* 227:161–174.
- Brannock, P. M., L. Wang, A. C. Ortmann, D. S. Waits, y K. M. Halanych. 2016b. Genetic assessment of meiobenthic community composition and spatial distribution in coastal sediments along northern Gulf of Mexico. *Marine Environmental Research* 119:166–175.
- Broman, E., C. Raymond, C. Sommer, J. S. Gunnarsson, S. Creer, y F. J. A. Nascimento. 2019. Salinity drives meiofaunal community structure dynamics across the Baltic ecosystem. *Molecular Ecology* 28:3813–3829.
- Butler, B. Y. P. A. 2019. Pesticides in the Marine Environment Author ( s ): Philip A . Butler Source : *Journal of Applied Ecology* , Vol . 3 , Supplement : Pesticides in the Environment and Their Effects on Wildlife . ( Jun ., 1966 ), pp . 253-259 Published by : British Ecological 3:253–259.
- Cadena, S., M. L. Aguirre-Macedo, D. Cerqueda-García, F. J. Cervantes, J. A. Herrera-Silveira, y J. Q. García-Maldonado. 2019. Community structure and distribution of benthic Bacteria and Archaea in a stratified coastal lagoon in the Southern Gulf of Mexico. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 230.
- Caporaso, J. G., C. L. Lauber, W. A. Walters, D. Berg-Lyons, J. Huntley, N. Fierer, S. M. Owens, J. Betley, L. Fraser, M. Bauer, N. Gormley, J. A. Gilbert, G. Smith, y R. Knight. 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME Journal* 6:1621–1624.

- Di Capua, I., R. Piredda, M. G. Mazzocchi, y A. Zingone. 2021. Metazoan diversity and seasonality through eDNA metabarcoding at a Mediterranean long-term ecological research site. *ICES Journal of Marine Science* 78:3303–3316.
- Carvalho, F. P. 2017. Pesticides, environment, and food safety. *Food and Energy Security* 6:48–60.
- Carvalho, F. P., F. Gonzalez-Farias, J. P. Villeneuve, C. Cattini, M. Hernandez-Garza, L. D. Mee, y S. W. Fowler. 2002. Distribution, fate and effects of pesticide residues in tropical coastal lagoons of northwestern Mexico. *Environmental Technology (United Kingdom)* 23:1257–1270.
- Carvalho, F. P., J. P. Villeneuve, C. Cattini, J. Rendón, y J. M. De Oliveira. 2009. Ecological risk assessment of PCBs and other organic contaminant residues in Laguna de Terminos, Mexico. *Ecotoxicology* 18:403–416.
- Castro-Cubillos, M. L., J. D. Taylor, A. Mastretta-Yanes, F. Benítez-Villalobos, y V. Islas-Villanueva. 2022. Monitoring of benthic eukaryotic communities in two tropical coastal lagoons through eDNA metabarcoding: a spatial and temporal approximation. *Scientific Reports* 12.
- Chaca, R. 2017, agosto 5. Chacahua: dejan morir hábitat de la Laguna Pastoría. *El Universal*.
- Chariton, A. A., L. N. Court, D. M. Hartley, M. J. Colloff, y C. M. Hardy. 2010. Ecological assessment of estuarine sediments by pyrosequencing eukaryotic ribosomal DNA. *Frontiers in Ecology and the Environment* 8:233–238.
- Chávez-López, Y., y C. Cruz-Gómez. 2019. New records of polychaetes ( Annelida : Polychaeta ) from three locations of Oaxaca , Mexico 67:157–168.
- Chiappa-Carrara, X., C. Enríquez, V. Papiol, I. Mariño-Tapia, y C. Reyes-Hernández. 2019. Pacific Coast of Mexico. Páginas 655–671 *World Seas: An environmental evaluation*.
- Ciros Pérez, J., M. Silva Briano, y M. Elías Gutierrez. 1996. A new species of Macrothrix ( Anomopoda : Macrothricidae ) from Central Mexico. *Hydrobiologia* 319:159–166.
- Clarke, K. R. 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology* 18:117–143.
- Coan, E. V., y P. Valentich-Scott. 2012. Bivalve seashells of tropical west America. Marine bivalve mollusks from Baja California to Northern Peru. Santa Barbara Museum of Natural History.

- Coan, E. V., y P. Valentich-Scott. 2014. Bivalvia. Páginas 807–859 *The Light and Smith Manual . Intertidal invertebrates from Central California to Oregon .*
- Comeau, M., W. K. W. Li, E. C. Carmack, y C. Lovejoy. 2011. Arctic Ocean Microbial Community Structure before and after the 2007 Record Sea Ice Minimum. *PLoS ONE* 6:1–12.
- CONABIO-CONANP-TNC-PRONATURA. 2007. Análisis de vacíos y omisiones en conservación de la biodiversidad marina de México: océanos, costas e islas. Página (CONABIO-CONANP-TNC-PRONATURA, Ed.). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, The Nature Conservancy-Programa México, Pronatura, A.C., México D.F.
- Contreras, E. F. O., L. R. Castañeda, A. Torres, y M. A. H. Pérez. 1998. Problemática sobre las lagunas costeras mexicanas V, Pesquerías. *ContactoSS* 25:36–46.
- Contreras, F., y O. Castañeda. 2004. La biodiversidad de las lagunas costeras. *Ciencias* 76:46–56.
- El Convenio sobre la Diversidad Biológica. 2024. Artículo 2. Términos utilizados. <https://www.cbd.int/convention/articles?a=cbd-02>.
- Córdova-Tapia, F., y L. Zambrano. 2015. La diversidad funcional en la ecología de comunidades. *Ecosistemas* 24:78–87.
- Corinaldesi, C., F. Beolchini, y A. Dell’Anno. 2008. Damage and degradation rates of extracellular DNA in marine sediments: Implications for the preservation of gene sequences. *Molecular Ecology* 17:3939–3951.
- Corinaldesi, C., A. Dell’Anno, y R. Danovaro. 2007. Early diagenesis and trophic role of extracellular DNA in different benthic ecosystems. *Limnology and Oceanography* 52:1710–1717.
- Cowart, D. A., M. Pinheiro, O. Mouchel, M. Maguer, J. Grall, J. Miné, y S. Arnaud-haond. 2015. Metabarcoding Is Powerful yet Still Blind : A Comparative Analysis of Morphological and Molecular Surveys of Seagrass Communities. *PLoS ONE* 10:1–26.
- Cristescu, M. E. 2014. Cristescu, M. E. (2014). From barcoding single individuals to metabarcoding biological communities : towards an integrative approach to the study of global biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution*, 29(10), 566–571. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.0>. *Trends in Ecology & Evolution* 29:566–571.

- Cronin-O'Reilly, S., J. D. Taylor, I. Jermyn, A. L. Allcock, M. Cunliffe, y M. P. Johnson. 2018. Limited congruence exhibited across microbial, meiofaunal and macrofaunal benthic assemblages in a heterogeneous coastal environment. *Scientific Reports* 8:1–10.
- Cyril, C. A., y T. H. Guy. 2009. Preliminary survey of potentially harmful dinoflagellates in Nigeria's coastal waters. *Fottea* 9:107–120.
- Danovaro, R., y A. Pusceddu. 2007. Biodiversity and ecosystem functioning in coastal lagoons: Does microbial diversity play any role? *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 75:4–12.
- Darwin, C. 1854. A monograph on the sub-class Cirripedia, with figures of all the species. London. Ray Society.
- Dasilva, C. R., W. K. W. Li, y C. Lovejoy. 2014. Phylogenetic diversity of eukaryotic marine microbial plankton on the Scotian Shelf Northwestern Atlantic Ocean. *Journal of Plankton Research* 36:344–363.
- Deepak, J., y H. Mahadevan. 2020. Molecular Markers and Their Optimization : Addressing the Problems of Nonhomology Using Decapod COI Gene. Página 206 *en* O.-M. Boldura, C. Balta, y N. S. Awwad, editores. *Biochemical Analysis Tools*.
- DeLorenzo, M. E., G. I. Scott, y P. E. Ross. 2001. Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: A review. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20:84–98.
- Derycke, S., J. Vanaverbeke, A. Rigaux, T. Backeljau, y T. Moens. 2010. Exploring the use of cytochrome oxidase c subunit 1 (COI) for DNA barcoding of free-living marine nematodes. *PLoS ONE* 5.
- Domínguez, J. C., A. J. Sánchez, y R. Florido. 2003. Distribución de macrocrustáceos en Laguna Mecoacán , al sur del Golfo de México Macrocrustaceans distribution in Laguna Mecoacan , south Gulf of Mexico. *Hidrobiológica* 13:127–135.
- Duck, R. W., y J. F. da Silva. 2012. Coastal lagoons and their evolution: A hydromorphological perspective. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 110:2–14.
- Ellegren, H., y N. Ellegren. 2016. Determinants of genetic diversity. *Nature Publishing Group* 17:422–433.
- Elliott, M., y A. K. Whitfield. 2011. Challenging paradigms in estuarine ecology and management. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 94:306–314.

- Esparza, M. A., y A. R. Guerra Mendoza. 2010. Caracterización de la fauna y calidad de agua del sistema de humedales y del sistema lagunar estuarino y zona costera de la región baja del Río Verde, Oaxaca (2009-2010).
- Esteves, F., A. Caliman, J. Santangelo, R. M. Guariento, V. Farjalla, y R. Bozelli. 2008. Neotropical coastal lagoons : An appraisal of their biodiversity , functioning , threats and conservation management. *Braz. J. Biol.* 68:967–981.
- Feng, C., J. Jia, C. Wang, M. Han, C. Dong, B. Huo, D. Li, y X. Liu. 2019. Phytoplankton and bacterial community structure in two chinese lakes of different trophic status. *Microorganisms* 7.
- Fischer, W., F. Krupp, W. Schneider, C. Sommer, K. E. Carpenter, y V. H. Niem. 1995. Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico centro-oriental.
- Fjord, G., Q. Haenel, O. Holovachov, U. Jondelius, P. Sundberg, y S. J. Bourlat. 2017. NGS-based biodiversity and community structure analysis of meiofaunal eukaryotes in shell sand from Hällö island , Smögen , and soft mud from.
- Fonseca, C. R., y G. Ganade. 2001. Species functional redundancy , random extinctions and the stability of ecosystems. *Journal of Ecology* 89:118–125.
- Fonseca, V. G., A. Kirse, H. Giebner, B. J. Vause, T. Drago, D. M. Power, L. S. Peck, y M. S. Clark. 2022. Metabarcoding the Antarctic Peninsula biodiversity using a multi-gene approach. *ISME Communications* 2:1–11.
- Forster, D., M. Dunthorn, F. Mahé, J. R. Dolan, S. Audic, D. Bass, L. Bittner, C. Boutte, R. Christen, J. M. Claverie, J. Decelle, B. Edvardsen, E. Egge, W. Eikrem, A. Gobet, W. H. C. F. Kooistra, R. Logares, R. Massana, M. Montresor, F. Not, H. Ogata, J. Pawlowski, M. C. Pernice, S. Romac, K. Shalchian-Tabrizi, N. Simon, T. A. Richards, S. Santini, D. Sarno, R. Siano, D. Vaultot, P. Wincker, A. Zingone, C. De Vargas, y T. Stoeck. 2016. Benthic protists: The under-charted majority. *FEMS Microbiology Ecology* 92:1–11.
- Franco, A., P. Franzoi, S. Malavasi, F. Riccato, P. Torricelli, y D. Mainardi. 2006. Use of shallow water habitats by fish assemblages in a Mediterranean coastal lagoon. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 66:67–83.
- Fuentes-Reines, J. M., E. Z. De Roa, E. Morón, D. Gámez, y C. López. 2012. Conocimiento de la fauna de cladocera (Crustacea: Branchiopoda) de la ciénaga grande de Santa Marta, Colombia.

- Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras 41:121–164.
- Fuerst, J. A., y E. Sagulenko. 2011. Beyond the bacterium: Planctomycetes challenge our concepts of microbial structure and function. *Nature Reviews Microbiology* 9:403–413.
- Gainey, L. F., y M. J. Greenberg. 1977. Physiological Basis of the Species Abundance-Salinity Relationship in Molluscs : A Speculation \*. *Marine Biology* 40:41–49.
- Galéron, J., M. Sibuet, A. Vanreusel, K. Mackenzie, A. J. Gooday, A. Dinét, y G. A. Wolff. 2001. Temporal patterns among meiofauna and macrofauna taxa related to changes in sediment geochemistry at an abyssal NE Atlantic site. *Progress in Oceanography* 50:303–324.
- Galil, B., P. Clark, y J. Carlton, editores. 2011. In the wrong place: alien marine crustaceans: distribution, biology and impacts.
- Gambi, C., C. Totti, y E. Manini. 2003. Impact of Organic Loads and Environmental Gradients on Microphytobenthos and Meiofaunal Distribution in a Coastal Lagoon. *Chemistry and Ecology* 19:207–223.
- Gárate-Lizárraga, I., R. González-Armas, G. Verdugo-Díaz, Y. B. Okolodkov, B. Pérez-Cruz, y J. A. Díaz-Ortíz. 2019. Seasonality of the dinoflagellate *Amphidinium* cf. *carterae* (Dinophyceae: Amphidiniiales) in Bahía de la Paz, Gulf of California. *Marine Pollution Bulletin* 146:532–541.
- García-Grajales, J., y A. Buenrostro-Silva. 2014. El Parque Nacional Lagunas de Chacahua , Oaxaca : perspectivas a sus 75 años. *Ciencia Ergo Sum* 21:149–153.
- García-López, R., F. Cornejo-granados, A. A. Lopez-zavala, A. Cota-Huízar, R. R. Sotelo-Mundo, B. Gómez-Gil, y A. Ochoa-Leyva. 2021. OTUs and ASVs Produce Comparable Taxonomic and Diversity using tailored abundance filters. *Genes* 12:564.
- Giere, O. 2009. Introduction to Meiobenthology. Página 526 *en* Springer-Verlag, editor. *Meiobenthology*. 2nd edición. Berlin.
- Gómez, S., J. W. Fleeger, A. Rocha-, y D. Foltz. 2010. Four new species of *Cletocamptus* Schrankewitsch , 1875 , closely related to *Cletocamptus deitersi* ( Richard , ) ( Copepoda : Harpacticoida ):37–41.
- González-Farías, F., X. Cisneros Estrada, C. Fuentes Ruíz, G. Díaz González, y A. V. Botello. 2002. Pesticides distribution in sediments of a tropical coastal lagoon adjacent to an irrigation

- district in northwest Mexico. *Environmental Technology (United Kingdom)* 23:1247–1256.
- González-Pérez, G., M. Briones-Salas, y A. M. Alfaro. 2004. Integración del conocimiento faunístico del estado. Páginas 449–466 *Biodiversidad de Oaxaca*. Instituto de Biología (UNAM), Fondo Oaxaqueño para la conservación de la naturaleza, World Wide Fund., México.
- Gray, J. S. 2000. The measurement of marine species diversity, with an application to the benthic fauna of the Norwegian continental shelf. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 250:23–49.
- Guardiola, M., M. J. Uriz, P. Taberlet, E. Coissac, O. S. Wangensteen, y X. Turon. 2015. Deep-sea, deep-sequencing: Metabarcoding extracellular DNA from sediments of marine canyons. *PLoS ONE* 10:1–26.
- Guardiola, M., O. S. Wangensteen, P. Taberlet, E. Coissac, M. J. Uriz, y X. Turon. 2016. Spatio-temporal monitoring of deep-sea communities using metabarcoding of sediment DNA and RNA. *PeerJ* 4:e2807.
- Günther, B., T. Kneib, H. Neumann, L. Silke, y P. M. Arbizu. 2018. Metabarcoding of marine environmental DNA based on mitochondrial and nuclear genes. *Scientific Reports* 8:1–13.
- Hadziavdic, K., K. Lekang, A. Lanzen, I. Jonassen, E. M. Thompson, y C. Troedsson. 2014. Characterization of the 18S rRNA gene for designing universal eukaryote specific primers. *PLoS ONE* 9:1–10.
- Haider, N., M. Nishimura, y K. Kogure. 2016. Bacterial Community Structure and Diversity of Closely Located Coastal Areas:423–439.
- Hajibabaei, M., D. J. Baird, N. A. Fahner, R. Beiko, y G. B. Golding. 2016. A new way to contemplate Darwin's tangled bank: how DNA barcodes are reconnecting biodiversity science and biomonitoring. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 371:20150330.
- Hajibabaei, M., S. Shokralla, X. Zhou, G. A. C. Singer, y D. J. Baird. 2011. Environmental barcoding: A next-generation sequencing approach for biomonitoring applications using river benthos. *PLoS ONE* 6.
- Hajibabaei, M., G. A. C. Singer, P. D. N. Hebert, y D. A. Hickey. 2007. DNA barcoding: how it

complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics* 23:167–172.

- Hajibabaei, M., J. L. Spall, S. Shokralla, y S. van Konynenburg. 2012. Assessing biodiversity of a freshwater benthic macroinvertebrate community through non-destructive environmental barcoding of DNA from preservative ethanol. *BMC Ecology* 12:28.
- Halpern, B. S., S. Walbridge, K. A. Selkoe, C. V. Kappel, F. Micheli, C. D'Agrosa, J. F. Bruno, K. S. Casey, C. Ebert, H. E. Fox, R. Fujita, D. Heinemann, H. S. Lenihan, E. M. P. Madin, M. T. Perry, E. R. Selig, M. Spalding, R. Steneck, y R. Watson. 2008. A global map of human impact on marine ecosystems 319:948–953.
- Hamilton, D. P., y I. C. Duggan. 2014. Plankton. Páginas 117–132 *Waters of the Waikato: Ecology of New Zealand's Longest River*. Environment Waikato/University of Waikato.
- Hays, G., A. Richardson, y C. Robinson. 2005. Climate change and marine plankton. *Trends in Ecology & Evolution* 20:337–344.
- He, Y., J. G. Caporaso, X.-T. Jiang, H.-F. Sheng, S. M. Huse, J. R. Rideout, R. C. Edgar, E. Kopylova, W. A. Walters, R. Knight, y H.-W. Zhou. 2015. Stability of operational taxonomic units: an important but neglected property for analyzing microbial diversity. *Microbiome* 3:1–10.
- Hebert, P. D. N., S. Ratnasingham, y J. R. de Waard. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270:S96–S99.
- Heck, K. L., K. W. Able, C. T. Roman, y M. P. Fahay. 1995. Composition, abundance, biomass, and production of macrofauna in a New England estuary: Comparisons among eelgrass meadows and other nursery habitats. *Estuaries* 18:379–389.
- Holman, L. E., M. de Bruyn, S. Creer, G. Carvalho, J. Robidart, y M. Rius. 2019. Detection of novel and resident marine species using environmental DNA metabarcoding of sediment and water. *Scientific Reports* 9.
- Huston, M. A. 1985. Patterns of species diversity on coral reefs. *Annual review of ecology and systematics*. Vol. 16:149–177.
- Hyde, K. D., E. B. G. Jones, E. Leañó, S. B. Pointing, A. D. Poonyth, y L. L. P. Vrijmoed. 1998. Role of fungi in marine ecosystems. *Biodiversity and Conservation* 7:1147–1161.

- Hyeon, S., y H. Jin. 2019. *Gyrodinium jinhaense* n. sp., a New Heterotrophic Unarmored Dinoflagellate from the Coastal Waters of Korea. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 66:821–835.
- Ihrmark, K., I. T. M. Bodeker, K. Cruz-martinez, H. Friberg, A. Kubartova, K. E. Clemmensen, J. Schenck, Y. Strid, J. Stenlid, M. Brandstrom-Durling, y K. Clemmensen. 2012. New primers to amplify the fungal ITS2 region – evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS Microbiology Ecology* 82:666–677.
- IllescasEspinoza, O., C. Alejo, M. Á. Ahumada Sempoal, J. F. Meraz Hernando, y R. Cardeña López. 2018. Los Nautilus de papel (Cephalopoda: Argonautidae) del Pacífico sur mexicano. *Ciencia y Mar*.
- Illumina. 2013. 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation. *Illumina.com*:1–28.
- Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. 2024. OBIS. Ocean Biodiversity Information System. <https://obis.org>.
- Janos, I., y P. Laszlo. 2000. A link between ecological diversity indices and measures of biodiversity. *Ecological Modelling* 130:151–156.
- Jeffries, T. C., N. J. Curlevski, M. V. Brown, D. P. Harrison, M. A. Doblin, K. Petrou, P. J. Ralph, y J. R. Seymour. 2016. Partitioning of fungal assemblages across different marine habitats. *Environmental Microbiology Reports* 8:235–238.
- Jones, E. B. G., S. Suetrong, J. Sakayaroj, A. H. Bahkali, M. A. Abdel-Wahab, T. Boekhout, y K. L. Pang. 2015. Classification of marine Ascomycota, Basidiomycota, Blastocladiomycota and Chytridiomycota. *Fungal Diversity* 73.
- Kale, S. P., N. B. K. Murthy, K. Raghu, P. D. Sherkhane, y F. P. Carvalho. 1999. Studies on degradation of 14C-DDT in the marine environment. *Chemosphere* 39:959–968.
- Karami, A., M. Sarshar, R. Ranjbar, y R. S. Zanjani. 2014. Spirochaetaceae Phylum. The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea:1–1028.
- Kataoka, T., y R. Kondo. 2019. Estuarine, Coastal and Shelf Science Protistan community composition in anoxic sediments from three salinity- disparate Japanese lakes ☆. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 224:34–42.
- Keen, A. M. 1971. Sea shells of tropical West America. Marine mollusks from Baja California to

- Peru. Second. Stanford University Press, Stanford, California.
- Keen, A. M., y E. Coan. 1974. Marine molluscan genera of western North America (from Baja California to Peru). Standford University Press, Stanford, California.
- Kennish, M., y H. Paerl. 2011. Coastal Lagoons-Critical Habitats of Environmental Change. Páginas 1–16 Coastal Lagoons- Critical Habitats of Environmental Change.
- Kessler, W. S. 2006. Progress in Oceanography The circulation of the eastern tropical Pacific : A review. *Progress in Oceanography* 69:181–217.
- Kim, H., H. Kim, H. S. Hwang, y W. Kim. 2017. Metagenomic analysis of the marine coastal invertebrates of South Korea as assessed by Ilumina MiSeq. *Animal Cells and Systems* 21:37–44.
- Kjerfve, B. 1994. Coastal lagoons. *Elsevier oceanography series* 60:1–8.
- Kodzius, R., y T. Gojobori. 2015. Marine metagenomics as a source for bioprospecting. *Marine Genomics* 24:21–30.
- Kotov, A. A., y M. Gololobova. 2016. Traditional taxonomy - quo vadis ? *Integrative Zoology* 11:490–495.
- Koziol, A., M. Stat, T. Simpson, S. Jarman, J. D. DiBattista, E. S. Harvey, M. Marnane, J. McDonald, y M. Bunce. 2018. Environmental DNA metabarcoding studies are critically affected by substrate selection. *Molecular Ecology Resources* 00:1–11.
- Lallias, D., J. G. Hiddink, V. G. Fonseca, J. M. Gaspar, W. Sung, S. P. Neill, N. Barnes, T. Ferrero, N. Hall, P. J. D. Lamshead, M. Packer, W. K. Thomas, y S. Creer. 2015. Environmental metabarcoding reveals heterogeneous drivers of microbial eukaryote diversity in contrasting estuarine ecosystems. *The ISME Journal* 9:1208–1221.
- Landa-Jaime, V. 2003. Benthic mollusc assemblage of the Agua Dulce / El Ermitaño lagoon estuarine system , Jalisco , Mexico. *Ciencias Marinas* 29:169–184.
- Lara-Lara, J. 2008. Los ecosistemas marinos. *Capital natural de México* I:135–159.
- Lara Domínguez, A. L., F. Contreras Espinosa, O. Castañeda-López, E. Barba-Macías, y M. A. Pérez-Hernández. 2011. Lagunas costeras y estuarios.
- Lazar, C. S., B. J. Baker, K. Seitz, A. S. Hyde, G. J. Dick, K. U. Hinrichs, y A. P. Teske. 2016. Genomic evidence for distinct carbon substrate preferences and ecological niches of

- Bathymicrobiota in estuarine sediments. *Environmental Microbiology* 18:1200–1211.
- Leal-Acosta, M. L., P. de Jesús Bastidas-Bastidas, E. Cruz-Acevedo, E. E. Aguilar-Jiménez, X. P. Perea-Domínguez, I. G. Martínez-Álvarez, y J. B. Leyva-Morales. 2022. Pesticides in water and sediments of Chacahua-Pastoria Lagoon System, Oaxaca, Mexico. *Marine Pollution Bulletin* 174.
- Lemay, M. A., P. T. Martone, K. R. Hind, S. C. Lindstrom, y L. W. Parfrey. 2018. Alternate life history phases of a common seaweed have distinct microbial surface communities. *Molecular Ecology*:1–14.
- De León González, J. A., J. R. Bastida Zavala, L. F. Carrera Parra, M. E. García Garza, A. Peña Rivera, S. I. Salazar Vallejo, y V. Solís Weiss, editores. 2009. *Poliquetos (Annelida: Polychaeta) de México y América Tropical*.
- Leray, M., y N. Knowlton. 2015. DNA barcoding and metabarcoding of standardized samples reveal patterns of marine benthic diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112:2076–81.
- Leray, M., y N. Knowlton. 2016. Censusing marine eukaryotic diversity in the twenty-first century. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 371:20150331.
- Lew, S., K. Glińska-Lewczuk, P. Burandt, K. Kulesza, S. Kobus, y K. Obolewski. 2022. Salinity as a Determinant Structuring Microbial Communities in Coastal Lakes. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19.
- Li, R., N. Jiao, A. Warren, y D. Xu. 2018. Changes in community structure of active protistan assemblages from the lower Pearl River to coastal Waters of the South China Sea. *European Journal of Protistology* 63:72–82.
- Lin, R., D. Huang, Y. Guo, Y. Chang, Y. Cao, y J. Wang. 2014. Abundance and distribution of meiofauna in the Chukchi Sea. *Acta Oceanologica Sinica* 33:90–94.
- Liu, J., y H. Zhang. 2021. Combining Multiple Markers in Environmental DNA Metabarcoding to Assess Deep-Sea Benthic Biodiversity. *Frontiers in Marine Science* 8:1–9.
- Liu, X., J. Pan, Y. Liu, M. Li, y J. D. Gu. 2018. Diversity and distribution of Archaea in global estuarine ecosystems. *Science of the Total Environment* 637–638:349–358.

- Liu, X., Y. Wang, y J. D. Gu. 2021. Ecological distribution and potential roles of Woesearchaeota in anaerobic biogeochemical cycling unveiled by genomic analysis. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 19:794–800.
- Lobo, J., P. M. Costa, M. AL Teixeira, M. S. Ferreira, M. H. Costa, y F. O. Costa. 2013. Enhanced primers for amplification of DNA barcodes from a broad range of marine metazoans. *BMC Ecology* 13:34.
- Lobo, J., S. Shokralla, M. H. Costa, M. Hajibabaei, y F. O. Costa. 2017. DNA metabarcoding for high-throughput monitoring of estuarine macrobenthic communities 2 3. *bioRxiv*.
- López-Escardó, D., J. Paps, C. De Vargas, R. Massana, I. Ruiz-Trillo, y J. Del Campo. 2018. Metabarcoding analysis on European coastal samples reveals new molecular metazoan diversity. *Scientific Reports* 8:1–14.
- López-Pérez, R. A., R. Bastida-Zavala, M. S. García- Madrigal, N. A. Barriento-Luján, y A. M. Torres-Huerta. 2012. ¿Cuánto sabemos de la diversidad de la fauna marina y costera de Oaxaca? *Recursos acuáticos costeros del Sureste*:435–449.
- Lu, Q., L. Qiu, L. Yu, S. Zhang, R. A. de Toledo, H. Shim, y S. Wang. 2019. Microbial transformation of chiral organohalides: Distribution, microorganisms and mechanisms. *Journal of Hazardous Materials* 368:849–861.
- Luis, P., G. Saint-Genis, L. Vallon, C. Bourgeois, M. Bruto, C. Marchand, E. Record, y M. Hugoni. 2019. Contrasted ecological niches shape fungal and prokaryotic community structure in mangroves sediments. *Environmental Microbiology* 21:1407–1424.
- Machida, R. J., y N. Knowlton. 2012. PCR Primers for Metazoan Nuclear 18S and 28S Ribosomal DNA Sequences. *PLoS ONE* 7.
- Machouart-Dubach, M., C. Lacroix, C. Vaury, M. Feuilhade de Chauvin, C. BellannÃ©, F. Derouin, y F. Lorenzo. 2002. Nucleotide structure of the *Scytalidium hyalinum* and *Scytalidium dimidiatum* 18S subunit ribosomal RNA gene: evidence for the insertion of a group IE intron in the rDNA gene of *S. dimidiatum* . *FEMS Microbiology Letters* 208:187–196.
- Maciel-Baltazar, E. 2015. Dinoflagelados ( Dinoflagellata ) tóxicos de la costa de Chiapas , México , Pacífico centro oriental. *UNED Research Journal* 7:39–48.
- Magni, P., S. Micheletti, D. Casu, A. Floris, G. De Falco, A. Castelli, S. Micheletti, D. Casu, A.

- Floris, G. De Falco, y A. Castelli. 2004. Macrofaunal community structure and distribution in a muddy coastal lagoon. *Chemistry and Ecology* 20:397–409.
- Magurran, A. . 2004. *Measuring biological diversity*. Blackwell Science, UK.
- Marcus, N. H., y F. Boero. 1998. Minireview: The importance of benthic-pelagic coupling and the forgotten role of life cycles in coastal aquatic systems. *Limnology and Oceanography* 43:763–768.
- Marshall, H. G. 2009. Neuston in Aquatic Ecosystems. *Ecosystems* 1:97–102.
- Martínez-Ramírez, E. ., J. A. Estrada-Godinez, M. P. Mora-Flores, D. G. Rodríguez-Cázares, J. L. Castro-Aguirre, E. Cruz-Arenas, y G. I. Cruz-Ruiz. 2008. Proyecto. Ictiofauna Del Sistema Lagunar Costero Chacahua-La Pastoría, Oaxaca. Sip 20070713 Y 20080420.:1–26.
- Massana, R., A. Gobet, S. Audic, D. Bass, L. Bittner, C. Boutte, A. Chambouvet, R. Christen, J. M. Claverie, J. Decelle, J. R. Dolan, M. Dunthorn, B. Edvardsen, I. Forn, D. Forster, L. Guillou, O. Jaillon, W. H. C. F. Kooistra, R. Logares, F. Mahé, F. Not, H. Ogata, J. Pawlowski, M. C. Pernice, I. Probert, S. Romac, T. Richards, S. Santini, K. Shalchian-Tabrizi, R. Siano, N. Simon, T. Stoeck, D. Vaultot, A. Zingone, y C. de Vargas. 2015. Marine protist diversity in European coastal waters and sediments as revealed by high-throughput sequencing. *Environmental Microbiology* 17:4035–4049.
- Mayr, E. 1969. The biological meaning of species \*. *Bio1.J. Liizn. Soc.* 1:311–320.
- Mcarthur, V. E., D. Koutsoubas, N. Lampadariou, y C. Dounas. 2000. The meiofaunal community structure of a Mediterranean lagoon ( Gialova lagoon , Ionian Sea ). *Helgol Mar Res* 54:7–17.
- Mcdevitt, A. D., C. Benvenuto, N. Guimarães, S. Samuel, A. O. Sparnenn, S. Mariani, O. S. Wangenstein, y I. Coscia. 2019. Environmental DNA metabarcoding as an effective and rapid tool for fish monitoring in canals. *Journal of Fish Biology*:1–4.
- McIlroy, J. S., y P. H. Nielsen. 2006. The Family Saprospiraceae. Páginas 863–889 *en* T. F. Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., editor. *The Prokaryotes*.
- McMurdie, P. J., y S. Holmes. 2013. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE* 8.
- Miller, J., T. Dikow, D. Agosti, G. Sautter, T. Catapano, y L. Penev. 2012. From taxonomic literature to cybertaxonomic content. *BMC Biology* 10:1–5.

- Miller, S. E., A. Hausmann, W. Hallwachs, y D. H. Janzen. 2016. Advancing taxonomy and bioinventories with DNA barcodes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 371:20150339.
- Murray, S. A., G. S. Kohli, H. Farrell, Z. B. Spiers, A. R. Place, J. J. Dorantes-Aranda, y J. Ruszczyk. 2015. A fish kill associated with a bloom of *Amphidinium carterae* in a coastal lagoon in Sydney, Australia. *Harmful Algae* 49:19–28.
- Nascimento, F. J. A., D. Lallias, H. M. Bik, y S. Creer. 2018. Sample size effects on the assessment of eukaryotic diversity and community structure in aquatic sediments using high-throughput sequencing. *Scientific Reports*:1–12.
- Navarrete-Euan, H., Z. Rodríguez-Escamilla, E. Pérez-Rueda, K. Escalante-Herrera, y M. A. Martínez-Núñez. 2021. Comparing sediment microbiomes in contaminated and pristine wetlands along the coast of yucatan. *Microorganisms* 9:1–17.
- Nemcová, Y., M. Pusztai, M. Skaloudová, y J. Neustupa. 2016. Silica-scaled chrysophytes ( Stramenopiles , Ochrophyta ) along a salinity gradient : a case study from the Gulf of Bothnia western shore ( northern Europe ). *Hydrobiologia* 764:187–197.
- Newton, A., A. C. Brito, J. D. Icely, V. Derolez, I. Clara, S. Angus, G. Schernewski, M. Inácio, A. I. Lillebø, A. I. Sousa, B. Béjaoui, C. Solidoro, M. Tosic, M. Cañedo-Argüelles, M. Yamamuro, S. Reizopoulou, H. C. Tseng, D. Canu, L. Roselli, M. Maanan, S. Cristina, A. C. Ruiz-Fernández, R. F. d. Lima, B. Kjerfve, N. Rubio-Cisneros, A. Pérez-Ruzafa, C. Marcos, R. Pastres, F. Pranovi, M. Snoussi, J. Turpie, Y. Tuchkovenko, B. Dyack, J. Brookes, R. Povilanskas, y V. Khokhlov. 2018. Assessing, quantifying and valuing the ecosystem services of coastal lagoons. *Journal for Nature Conservation* 44:50–65.
- Obi, C. C., S. A. Adebusoye, E. O. Ugoji, M. O. Ilori, O. O. Amund, y W. J. Hickey. 2016. Microbial Communities in Sediments of Lagos Lagoon , Nigeria : Elucidation of Community Structure and Potential Impacts of Contamination by Municipal and Industrial Wastes 7:1–16.
- Obolewski, K., K. Glinska-Lewczuk, M. Szymanska, N. Mrozinska, M. Bakowska, A. Astel, S. Lew, y E. Paturej. 2018. Patterns of salinity regime in coastal lakes based on structure of benthic invertebrates. *PLoS ONE* 13:1–19.
- Okolodkov, Y. B., R. Bastida-Zavala, A. L. Ibáñez, J. W. Chapman, E. Suárez-Morales, F. F. Pedroche, y F. J. Gutiérrez-Mendieta. 2007. Especies acuáticas no indígenas en México. *Ciencia y Mar* 11:29–67.

- Okolodkov, Y. B., y I. Gárete-Izárraga. 2006. An annotated checklist of dinoflagellates (Dinophyceae) from the Mexican Pacific. *Acta Botanica Mexicana* 74:1–154.
- Olguín, E. J., M. E. Hernández, y G. Sánchez-Galván. 2007. Contaminación de manglares por hidrocarburos y estrategias de biorremediación, fitorremediación y restauración. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 23:139–154.
- Onuma, R., K. Watanabe, y T. Horiguchi. 2015. *Pellucidodinium psammophilum* gen. & sp. nov. and *Nusuttodinium desymbiontum* sp. nov. (Dinophyceae), two novel heterotrophs closely related to kleptochloroplastidic dinoflagellates. *Phycologia* 54:192–209.
- Ortega-Arbulú, A. S., M. Pichler, A. Vuillemin, y W. D. Orsi. 2019. Effects of organic matter and low oxygen on the mycobenthos in a coastal lagoon. *Environmental Microbiology* 21:374–388.
- Ostfeld, R. S. 2009. Biodiversity loss and the rise of zoonotic pathogens. *Clinical Microbiology and Infection* 15:40–43.
- Ostfeld, R. S., y F. Keesing. 2000a. Biodiversity and disease risk: The case of Lyme disease. *Conservation Biology: the journal of the Society for Conservation Biology* 14:722–728.
- Ostfeld, R. S., y F. Keesing. 2000b. Biodiversity series: The function of biodiversity in the ecology of vector-borne zoonotic diseases. *Canadian Journal of Zoology* 78:2061–2078.
- Palacín, C., D. Martín, y J. M. Gili. 1991. Features of spatial distribution of benthic infauna in a Mediterranean shallow-water bay. *Marine Biology* 110:315–321.
- Pan, Y., J. Yang, G. B. McManus, S. Lin, y W. Zhang. 2020. Insights into protist diversity and biogeography in intertidal sediments sampled across a range of spatial scales. *Limnology and Oceanography* 65:1103–1115.
- Pantaleón-López, B., G. Aceves, y I. A. Castellanos. 2005. Distribución y abundancia del zooplancton del complejo lagunar Chacahua-La Pastoría, Oaxaca, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 76:63–70.
- Pantó, G., F. Pasotti, L. Macheriotou, y A. Vanreusel. 2021. Combining Traditional Taxonomy and Metabarcoding: Assemblage Structure of Nematodes in the Shelf Sediments of the Eastern Antarctic Peninsula. *Frontiers in Marine Science* 8:1–19.
- Park, D. S., y O. H. Razafindratsima. 2019. Anthropogenic threats can have cascading

- homogenizing effects on the phylogenetic and functional diversity of tropical ecosystems. *Ecography* 42:148–161.
- Pawlik, J. R. 1992. Chemical Ecology of the Settlement of Benthic Marine-Invertebrates. *Oceanography and Marine Biology* 30:273–335.
- Pearman, J. K., X. Irigoien, y S. Carvalho. 2016. Extracellular DNA amplicon sequencing reveals high levels of benthic eukaryotic diversity in the central Red Sea. *Marine Genomics* 26:29–39.
- Pech, D., y P. L. Ardisson. 2010. Diversidad en el bentos marino-costero. *Biodiversidad Marina y Costera de México*:144–146.
- Pentinsaari, M., H. Salmela, M. Mutanen, y T. Roslin. 2016. Molecular evolution of a widely-adopted taxonomic marker ( COI ) across the animal tree of life. *Nature Publishing Group*:1–12.
- Pereyra, L. C., y C. E. Moreno. 2013. Divide y vencerás : revisión de métodos para la partición de la diversidad regional de especies en sus componentes alfa y beta. *Revista Chilena de Historia Natural*:231–239.
- Petchey, O. L., y K. J. Gaston. 2006. Functional diversity: Back to basics and looking forward. *Ecology Letters* 9:741–758.
- Piccini, C., D. Conde, C. Alonso, R. Sommaruga, y J. Pernthaler. 2006. Blooms of single bacterial species in a coastal lagoon of the southwestern Atlantic Ocean. *Applied and Environmental Microbiology* 72:6560–6568.
- Polanco Fernández, A., V. Marques, F. Fopp, J.-B. Juhel, G. H. Borrero-Pérez, M.-C. Cheutin, T. Dejean, J. D. González Corredor, A. Acosta-Chaparro, R. Hocdé, D. Eme, E. Maire, M. Spescha, A. Valentini, S. Manel, D. Mouillot, C. Albouy, y L. Pellissier. 2020a. Comparing environmental DNA metabarcoding and underwater visual census to monitor tropical reef fishes. *Environmental DNA* 00:1–15.
- Polanco Fernández, A., V. Marques, F. Fopp, J. Juhel, G. H. Borrero-Pérez, M. Cheutin, T. Dejean, J. D. González Corredor, A. Acosta-Chaparro, R. Hocdé, D. Eme, E. Maire, M. Spescha, A. Valentini, S. Manel, D. Mouillot, C. Albouy, y L. Pellissier. 2020b. Comparing environmental DNA metabarcoding and underwater visual census to monitor tropical reef fishes. *Environmental DNA* 3:142–156.
- Poli, A., A. Vizzini, V. Prigione, y G. C. Varese. 2018. Basidiomycota isolated from the

- Mediterranean Sea – Phylogeny and putative ecological roles. *Fungal Ecology* 36:51–62.
- Polinski, J. M., J. P. Bucci, M. Gasser, y A. G. Bodnar. 2019. Metabarcoding assessment of prokaryotic and eukaryotic taxa in sediments from Stellwagen Bank National Marine Sanctuary. *Scientific reports* 9:14820.
- Purcell, J. E., S. Uye, y W. Lo. 2007. Anthropogenic causes of jellyfish blooms and their direct consequences for humans : a review. *Marine Ecology - Progress Series* 350:153–174.
- Quast, C., E. Pruesse, P. Yilmaz, J. Gerken, T. Schweer, F. O. Glo, y P. Yarza. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project : improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* 41:590–596.
- Raghukumar, S. 2017. Fungi in coastal and oceanic marine ecosystems: Marine fungi. *Fungi in Coastal and Oceanic Marine Ecosystems: Marine Fungi*:1–378.
- Ramakrishnan, B., K. Venkateswarlu, N. Sethunathan, y M. Megharaj. 2019. Local applications but global implications: Can pesticides drive microorganisms to develop antimicrobial resistance? *Science of the Total Environment* 654:177–189.
- Ratnasingham, S., y P. D. N. Hebert. 2007a. BOLD : The Barcode of Life Data System. *Molecular Ecology Notes* 7:355–364.
- Ratnasingham, S., y P. D. N. Hebert. 2007b. The Barcode of Life Data System ([www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)). *Molecular Ecology Notes* 7:355–364.
- Rawat, U. S., y N. K. Agarwal. 2015. Biodiversity : Concept , Threats and Conservation. *Environment Conservation Journal* 16:18–28.
- Reed, D. H., y R. Frankham. 2003. Correlation between Fitness and Genetic Diversity. *Conservation Biology* 17:230–237.
- Regan, T. 1925. Organic Evolution. *Nature* 116:398–401.
- Reizopoulou, S., y A. Nicolaidou. 2004. Benthic diversity of coastal brackish-water lagoons in western Greece. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 14:93–102.
- Rivera-Velázquez, G., L. A. Soto, I. H. Salgado-Ugarte, y E. J. Naranjo. 2008. Growth, mortality and migratory pattern of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Crustacea, Penaeidae) in the Carretas-Pereyra coastal lagoon system, Mexico. *Revista de Biología Tropical* 56:523–533.
- Rodríguez-Almaraz, G. a, y M. D. S. García-Madrigal. 2014. Crustáceos exóticos invasores.

- Especies acuáticas invasoras en México:347–371.
- Rohal, M., D. Thistle, y E. E. Easton. 2014. Deep-Sea Research I Meiofaunal abundances and faunal similarity on the continental rise off the coast of California 93:131–144.
- Ruiz-Fernández, A. C., M. Frignani, C. Hillaire-Marcel, B. Ghaleb, M. D. Arvizu, J. R. Raygoza-Viera, y F. Páez-Osuna. 2009. Trace Metals ( Cd , Cu , Hg , and Pb ) Accumulation Recorded in the Intertidal Mudflat Sediments of Three Coastal Lagoons in the Gulf of California , Mexico. *Estuaries and Coasts* 32:551–564.
- Sánchez-Meraz, B., y J. A. Martínez-Vega. 2000. Inmigración de Postlarvas de Camarón *Litopenaeus* sp. y *Farfantepenaeus* sp. a través la Boca El Oro del Sistema Lagunar Corralero-Alotengo, Oaxaca. *Ciencia y Mar* 4:29–46.
- Sánchez Méndez, E., B. Urbano Alonso, S. Sierra Hernández, y J. L. Garcés Salazar. 2015. Características malacológicas y sociales de la pesquería artesanal de moluscos en la Laguna de Chacahua, Oaxaca, México. *Ciencia y Mar* 19:3–11.
- Säwström, C., G. A. Hyndes, B. D. Eyre, M. J. Huggett, M. W. Fraser, P. S. Lavery, P. G. Thomson, F. Tarquinio, P. D. Steinberg, y B. Laverock. 2016. Coastal connectivity and spatial subsidy from a microbial perspective:6662–6671.
- Scarabino, V., y F. Scarabino. 2010. A new genus and thirteen new species of Scaphopoda (Mollusca) from the tropical Pacific Ocean. *Zoosystema* 32:409–423.
- Schmidt, P., M. Bálint, B. Greshake, C. Bandow, J. Römbke, y I. Schmitt. 2013. Illumina metabarcoding of a soil fungal community. *Soil Biology and Biochemistry* 65:128–132.
- Schroeder, A., D. Stanković, A. Pallavicini, F. Gionchetti, M. Pansera, y E. Camatti. 2020. DNA metabarcoding and morphological analysis - Assessment of zooplankton biodiversity in transitional waters. *Marine Environmental Research* 160:104946.
- Semarnat, y Conanp. 2014. Programa de manejo Parque Nacional Lagunas de Chacahua 2014. Primera ed. México.
- Semprucci, F., M. Balsamo, F. Frontalini, A. Disteva, y U. Urbino. 2014. The nematode assemblage of a coastal lagoon ( Lake Varano , southern Italy ): ecology and biodiversity patterns. *Scientia Marina* 78:579–588.
- Shokralla, S., J. F. Gibson, H. Nikbakht, D. H. Janzen, W. Hallwachs, y M. Hajibabaei. 2014. Next-

- generation DNA barcoding: Using next-generation sequencing to enhance and accelerate DNA barcode capture from single specimens. *Molecular Ecology Resources* 14:892–901.
- Sinniger, F., J. Pawlowski, S. Harii, A. J. Gooday, H. Yamamoto, P. Chevaldonné, T. Cedhagen, G. Carvalho, y S. Creer. 2016. Worldwide Analysis of Sedimentary DNA Reveals Major Gaps in Taxonomic Knowledge of Deep-Sea Benthos. *Frontiers in Marine Science* 3:1–14.
- Smith, N. P. 1994. Water, Salt and Heat Balance of Coastal Lagoons. Elsevier Oceanography Series 60:69–101.
- Smyth, K., y M. Elliott. 2016. Effects of changing salinity on the ecology of the marine environment. Página 384 *en* M. Solan y N. Whiteley, editores. *Stressors in the Marine Environment: Physiological and ecological responses; societal implications*. Oxford University Press, Oxford.
- Sorof Uddin, M., y Q. Cheng. 2015. Recent application of biotechniques for the improvement of mango research. Página *Applied Plant Genomics and Biotechnology*. Elsevier Ltd.
- Spagnoli, F., G. Bartholini, M. Marini, y P. Giordano. 2004. Biogeochemical processes in sediments of the Manfredonia Gulf (Southern Adriatic Sea): early diagenesis of carbon and nutrient and benthic exchange. *Biogeosciences Discussions* 1:803–823.
- Spalding, M. D., H. E. Fox, G. R. Allen, N. Davidson, Z. A. Ferdaña, M. Finlayson, B. S. Halpern, M. A. Jorge, A. Lombana, S. A. Lourie, K. D. Martin, E. Mcmanus, J. Molnar, C. A. Recchia, y J. Robertson. 2007. Marine Ecoregions of the World : A Bioregionalization of Coastal and Shelf Areas. *BioScience* 57:573–583.
- Sreenivasulu, G., N. Jayaraju, y R. Sundara Raja. 2015. Physico-chemical parameters of coastal water from Tupilipalem coast, Southeast coast of India. *Journal of Coastal Sciences* 2:34–39.
- Steiner, G., y A. R. Kabat. 2001. Catalogue of supra specific taxa of Scaphopoda (Mollusca). *Zoosystem* 23:433–460.
- Stoeck, T., D. Bass, M. Nebel, R. Christen, M. D. M. Jones, H. W. Breiner, y T. A. Richards. 2010a. Multiple marker parallel tag environmental DNA sequencing reveals a highly complex eukaryotic community in marine anoxic water. *Molecular Ecology* 19:21–31.
- Stoeck, T., D. Bass, M. Nebel, R. Christen, y D. Meredith. 2010b. Multiple marker parallel tag environmental DNA sequencing reveals a highly complex eukaryotic community in marine anoxic water. *Molecular Ecology* 19:21–31.

- Sun, P., L. Huang, D. Xu, B. Huang, N. Chen, y A. Warren. 2017. Marked seasonality and high spatial variation in estuarine ciliates are driven by exchanges between the ‘ abundant ’ and ‘ intermediate ’ biospheres. *Scientific Reports*:1–12.
- Sundberg, P. E. R., y M. H. Arlin. 1998. Taxonomy and Philosophy of Names. *Biology and Philosophy* 13:233–244.
- Suominen, S., D. M. van Vliet, I. Sánchez-Andrea, M. T. J. van der Meer, J. S. Sinninghe Damsté, y L. Villanueva. 2021. Organic Matter Type Defines the Composition of Active Microbial Communities Originating From Anoxic Baltic Sea Sediments. *Frontiers in Microbiology* 12.
- Taanman, J., R. H. Street, y L. Nw. 1999. The mitochondrial genome : structure , transcription , translation and replication 1410.
- Taberlet, P., E. Coissac, F. Pompanon, C. Brochmann, y E. Willerslev. 2012. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular Ecology* 21:2045–2050.
- Thakur, R. K., R. Jindal, U. B. Singh, y A. S. Ahluwalia. 2013. Plankton diversity and water quality assessment of three freshwater lakes of Mandi (Himachal Pradesh, India) with special reference to planktonic indicators. *Environmental Monitoring and Assessment* 185:8355–8373.
- Thomas, F., J. H. Hehemann, E. Rebuffet, M. Czjzek, y G. Michel. 2011. Environmental and gut Bacteroidetes: The food connection. *Frontiers in Microbiology* 2:1–16.
- Thomsen, P. F., J. Kielgast, L. L. Iversen, C. Wiuf, M. Rasmussen, M. T. P. Gilbert, L. Orlando, y E. Willerslev. 2012. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology* 21:2565–2573.
- Thomsen, P. F., y E. Willerslev. 2015. Environmental DNA - An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation* 183:4–18.
- Tilman, D. 2001. Functional Diversity. Páginas 109–120 *Encyclopedia of Biodiversity: Second Edition*. Elsevier Ltd.
- Tisthammer, K. H., G. M. Cobian, y A. S. Amend. 2016. Global biogeography of marine fungi is shaped by the environment. *Fungal Ecology* 19:39–46.
- Torres-Alvarado, M. D. R. 2016. Anaerobic microbiota: spatial-temporal changes in the sediment of

- a tropical coastal lagoon with ephemeral inlet. *Revista de Biología Tropical* 64:1759–1770.
- Trivedi, S., A. A. Aloufi, H. Rehman, S. Saggu, y S. K. Ghosh. 2016. DNA barcoding: Tool for assessing species identification in Reptilia. *Journal of Entomology and Zoology Studies JEZS* 332:332–337.
- Tuomisto, H. 2010. A diversity of beta diversities: Straightening up a concept gone awry. Part 1. Defining beta diversity as a function of alpha and gamma diversity. *Ecography* 33:2–22.
- Valdemarsen, T., C. O. Quintana, S. W. Thorsen, y E. Kristensen. 2018. Benthic macrofauna bioturbation and early colonization in newly flooded coastal habitats. *PLoS ONE* 13:1–21.
- Vargas de, C., S. Audic, N. Henry, J. Decelle, F. Mahe, R. Logares, E. Lara, C. Berney, N. Le Bescot, I. Probert, M. Carmichael, J. Poulain, S. Romac, S. Colin, J.-M. Aury, L. Bittner, S. Chaffron, M. Dunthorn, S. Engelen, O. Flegontova, L. Guidi, A. Horak, O. Jaillon, G. Lima-Mendez, J. Luke, S. Malviya, R. Morard, M. Mulot, E. Scalco, R. Siano, F. Vincent, A. Zingone, C. Dimier, M. Picheral, S. Searson, S. Kandels-Lewis, S. G. Acinas, P. Bork, C. Bowler, G. Gorsky, N. Grimsley, P. Hingamp, D. Iudicone, F. Not, H. Ogata, S. Pesant, J. Raes, M. E. Sieracki, S. Speich, L. Stemmann, S. Sunagawa, J. Weissenbach, P. Wincker, E. Karsenti, E. Boss, M. Follows, L. Karp-Boss, U. Krzic, E. G. Reynaud, C. Sardet, M. B. Sullivan, y D. Velayoudon. 2015. Eukaryotic plankton diversity in the sunlit ocean. *Science* 348:1261605–1261605.
- Varona-Cordero, F., y J. Gutiérrez. 2006. Seasonal phytoplankton composition of two coastal lagoons of the tropical Pacific. *Hidrobiológica* 16:159–174.
- Velázquez-Velázquez, E., M. E. Vega-Cendejas, y J. Navarro-Alberto. 2008. Spatial and temporal variation of fish assemblages in a coastal lagoon of the Biosphere Reserve La Encrucijada , Chiapas , Mexico. *Rev. biol. trop* 56:557–574.
- Violle, C., M.-L. Navas, D. Vile, E. Kazakou, C. Fortunel, I. Hummel, y E. Garnier. 2007. Let the concept of trait be functional ! *Oi* 116:882–892.
- Walters, W., E. R. Hyde, D. Berg-lyons, G. Ackermann, G. Humphrey, A. Parada, J. Gilbert, J. Jansson, G. Caporaso, J. Fuhrman, A. Apprill, y R. Knight. 2015. Improved Bacterial 16S rRNA Gene (V4 and V4-5) and Fungal Internal Transcribed Spacer Marker Gene Primers for Microbial Community Surveys. *mSystems* 1:1–10.
- Wangenstein, O. S., C. Palacín, M. Guardiola, y X. Turon. 2018. DNA metabarcoding of littoral

- hard-bottom communities: high diversity and database gaps revealed by two molecular markers. *PeerJ* 6:e4705.
- Warwick, R. M., y K. R. Clarke. 2001. Practical measures of marine biodiversity based on relatedness of species. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review* 39:207–231.
- Webster, G., L. A. O’Sullivan, Y. Meng, A. S. Williams, A. M. Sass, A. J. Watkins, R. J. Parkes, y A. J. Weightman. 2015. Archaeal community diversity and abundance changes along a natural salinity gradient in estuarine sediments. *FEMS Microbiology Ecology* 91:1–18.
- Whitfield, A. K. 2011. Coastal Lagoons – Critical Habitats of Environmental Change. *Marine Biology Research* 7:416–417.
- Whittaker, R. H. 1972. Evolution-and-measurement-of-species-diversity. *TAXON* 21:213–251.
- Whitton, B. A. 2012. Ecology of cyanobacteria II: Their diversity in space and time. Página Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time.
- Widenfalk, A., S. Bertilsson, I. Sundh, y W. Goedkoop. 2008. Effects of pesticides on community composition and activity of sediment microbes - responses at various levels of microbial community organization. *Environmental Pollution* 152:576–584.
- Winter, M., V. Devictor, y O. Schweiger. 2012. Phylogenetic diversity and nature conservation : where are we ? *Trends in Ecology & Evolution* XX:1–6.
- Worm, B., E. B. Barbier, N. Beaumont, J. E. Duffy, C. Folke, B. S. Halpern, J. B. C. Jackson, H. K. Lotze, F. Micheli, S. R. Palumbi, E. Sala, K. A. Selkoe, J. J. Stachowicz, y R. Watson. 2006. Impacts of biodiversity loss on ocean ecosystem services. *Science* 314:787–790.
- Yu, D. W., Y. Ji, B. C. Emerson, X. Wang, C. Ye, C. Yang, y Z. Ding. 2012. Biodiversity soup: Metabarcoding of arthropods for rapid biodiversity assessment and biomonitoring. *Methods in Ecology and Evolution* 3:613–623.
- Zamorano, P., N. A. Barrientos-Luján, y M. Á. Ahumada-Sempoal. 2010. Moluscos bentónicos de dos sistemas lagunares de la costa chica de Oaxaca, México y su relación con parámetros fisicoquímicos. *Ciencia y Mar* 14:13–28.
- Zhang, G. K., F. J. J. Chain, C. L. Abbott, y M. E. Cristescu. 2018. Metabarcoding using multiplexed markers increases species detection in complex zooplankton communities. *Evolutionary Applications* 11:1901–1914.

## ANEXOS

Anexo 1. Matriz de datos (presencia (1)/ausencia (0)) de OTUs identificados morfológicamente en los sistemas lagunares Chacahua-Pastoría y Corralero-Alotengo por temporada (secas y lluvias).

OTU	Filo	Clase	Familia	Género	Especie	Chacahua Secas	Chacahua Lluvias	Corralero Secas	Corralero Lluvias
1	Annelida	Polychaeta	Spionidae	Boccardiella	<i>Boccardiella uncata</i>	1	0	0	0
2	Annelida	Polychaeta	Capitellidae	Capitella	<i>Capitella capitata</i>	1	1	0	0
3	Annelida	Polychaeta	Ctenodrilidae	Ctenodrilus	<i>Ctenodrilus sp.</i>	1	0	1	0
4	Annelida	Polychaeta	Hesionidae	-	<i>Hesionidae sp.</i>	1	0	0	0
5	Annelida	Polychaeta	Nereididae	-	<i>Nereidade sp.</i>	1	0	0	0
6	Annelida	Polychaeta	Capitellidae	-	<i>Capitellidae sp.</i>	1	0	0	0
7	Annelida	Polychaeta	Capitellidae	Capitella	<i>Capitella sp.</i>	1	0	1	1
8	Annelida	Polychaeta	Capitellidae	Capitella	<i>Capitella sp2</i>	0	0	1	1
9	Annelida	Polychaeta	Capitellidae	Capitella	<i>Capitella cf. capitata</i>	0	0	1	0
10	Annelida	Polychaeta	Capitellidae	Capitella	<i>Capitella cf. ovincola</i>	0	0	1	0
11	Annelida	Polychaeta	Serpulidae	-	<i>Serpulidae sp.</i>	1	1	1	1
12	Annelida	Polychaeta	Serpulidae	Spirobranchus	<i>Spirobranchus minutus</i>	0	1	1	1
13	Annelida	Polychaeta	Cirratulidae	Aphelochaeta	<i>Aphelochaeta monilaris</i>	1	1	0	0
14	Annelida	Polychaeta	Pilargidae	Cabira	<i>Cabira sp.</i>	1	0	0	0
15	Annelida	Polychaeta	-	-	<i>Eunicida sp.</i>	1	0	0	0

16	Annelida	Polychaeta	Hesionidae	Gyptini	<i>Gyptini sp.</i>	1	0	0	0
17	Annelida	Polychaeta	Orbiniidae	Leitoscoloplos	<i>Leitoscoloplos sp.</i>	1	1	1	0
18	Annelida	Polychaeta	Orbiniidae	Nainereis	<i>Nainereis sp.</i>	1	0	0	0
19	Annelida	Polychaeta	Hesionidae	Ophiodromus	<i>Ophiodromus sp.</i>	1	0	0	1
20	Annelida	Polychaeta	Hesionidae	Podarkeopsis	<i>Podarkeopsis sp.</i>	1	1	1	1
21	Annelida	Polychaeta	Spionidae	Polydora	<i>Polydora sp.</i>	1	1	1	0
22	Annelida	Polychaeta	Spionidae	Pseudopolydora	<i>Pseudopolydora sp.</i>	1	1	1	0
23	Annelida	Polychaeta	Spionidae	Pygospio	<i>Pygospio sp.</i>	1	0	1	1
24	Annelida	Polychaeta	Spionidae	Pygospio	<i>Pygospio sp. 2</i>	1	0	0	0
25	Annelida	Polychaeta	Sigalionidae	Sigalion	<i>Sigalion sp.</i>	1	0	1	0
26	Annelida	Polychaeta	Pilargidae	Sigambra	<i>Sigambra ocellata</i>	1	1	1	1
27	Annelida	Polychaeta	Pilargidae	Sigambra	<i>Sigambra sp.</i>	1	1	1	1
28	Annelida	Polychaeta	Spionidae	-	<i>Spionidae sp.</i>	1	0	0	0
29	Annelida	Polychaeta	Glyceridae	-	<i>Glyceridae</i>	0	1	0	0
30	Annelida	Polychaeta	Orbiniidae	Leitoscoloplos	<i>Leitoscoloplos cf. panamensis</i>	0	1	0	0
31	Annelida	Polychaeta	Orbiniidae	Leodamas	<i>Leodamas sp.</i>	0	1	0	0
32	Annelida	Polychaeta	Orbiniidae	Naineris	<i>Naineris cf. setosa</i>	0	1	0	0
33	Annelida	Polychaeta	Sigalionidae	Pisione	<i>Pisione sp.</i>	0	1	0	0
34	Annelida	Polychaeta	Spionidae	Rhynchospio	<i>Rhynchospio sp.</i>	0	0	1	0
35	Annelida	Polychaeta	Hesionidae	Oxydromus	<i>Oxydromus minutus</i>	0	0	1	0

36	Annelida	Polychaeta	Cirratulidae	Aphelochaeta	<i>Aphelochaeta monilaris</i>	0	0	1	0
37	Annelida	Polychaeta	-	-	<i>Errantia sp.</i>	0	0	1	0
38	Annelida	Polychaeta	Syllidae	-	<i>Exagonia</i>	0	0	1	0
39	Annelida	Polychaeta	Orbiniidae	Leitoscoloplos	<i>Leitoscoloplos sp2</i>	0	0	1	0
40	Annelida	Polychaeta	Nereididae	Neanthes	<i>Neanthes sp.</i>	0	0	1	1
41	Annelida	Polychaeta	Opheliidae	-	<i>Opheliidae sp.</i>	0	0	1	1
42	Annelida	Polychaeta	Nereididae	Nereis	<i>Nereis sp.</i>	0	0	0	1
43	Annelida	Polychaeta	Orbiniidae	Ophiodromos	<i>Ophiodromos sp.</i>	0	0	1	0
44	Annelida	Polychaeta	Pectinariidae	-	<i>Pectinariidae</i>	0	0	0	1
45	Artropoda	Hexanauplia	Balanidae	-	<i>Balanidae sp.</i>	1	1	0	1
46	Artropoda	Ostracoda	Cytheruridae	-	<i>Cytheruridae sp.</i>	1	0	0	0
47	Artropoda	Ostracoda	Cyprididae	-	<i>Cyprididae 1</i>	0	0	0	0
48	Artropoda	Ostracoda	Cyprididae	-	<i>Cyprididae 2</i>	0	0	0	0
49	Artropoda	Ostracoda	Cyprididae	-	<i>Cyprididae 3</i>	0	0	0	0
50	Artropoda	Ostracoda	-	-	<i>Podocopida</i>	0	0	0	0
51	Artropoda	Hexanauplia	-	-	<i>Balanomorpha sp.</i>	0	1	0	1
52	Artropoda	Ostracoda	Cytheruridae	-	<i>Cytheruridae 1</i>	1	0	1	0
53	Artropoda	Ostracoda	Cytheruridae	-	<i>Cytheruridae 2</i>	1	0	1	0
54	Artropoda	Ostracoda	Cytheruridae	-	<i>Cytheruridae 3</i>	1	0	0	0
55	Artropoda	Malacostraca	-	-	<i>Decapoda sp.</i>	0	1	0	0
56	Artropoda	Malacostraca	Alpheidae	Metalpheus	<i>Metalpheus sp.</i>	0	1	1	0

57	Artropoda	Ostracoda	-	-	<i>Ostracoda sp.</i>	0	1	0	1
58	Artropoda	Malacostraca	Pinnotheridae	Pinnixa	<i>Pinnixa sp.</i>	0	1	1	0
59	Artropoda	Malacostraca	Portunidae	Portunus	<i>Portunus cf. tuberculatus</i>	0	1	0	0
60	Artropoda	Hexanauplia	Balanidae	Amphibalanus	<i>Amphibalanus sp.</i>	0	0	1	0
61	Artropoda	Hexanauplia	Balanidae	-	<i>Balanidae 1</i>	0	0	1	0
62	Artropoda	Hexanauplia	Balanidae	-	<i>Balanidae 2</i>	0	0	1	0
63	Artropoda	Malacostraca	Alpheidae	Metalpheus	<i>Metalpheus sp. 2</i>	0	0	1	0
64	Artropoda	Malacostraca	-	Thalassinoidea	<i>Thalassinoidea sp.</i>	0	0	1	0
65	Mollusca	Gastropoda	Tornatinidae	Acteocina	<i>Acteocina infrequens</i>	1	1	0	1
66	Mollusca	Gastropoda	Cerithiidae	Alabina	<i>Alabina effusa</i>	1	1	0	1
67	Mollusca	Gastropoda	Assimineidae	Angustassiminea	<i>Angustassiminea californica</i>	1	1	1	1
68	Mollusca	Bivalvia	Anomiidae	Anomia	<i>Anomia peruviana</i>	0	0	0	1
69	Mollusca	Bivalvia	Noetiidae	Arcopsis	<i>Arcopsis solida</i>	0	0	0	1
70	Mollusca	Gastropoda	Caecidae	Caecum	<i>Caecum insculptum</i>	0	0	0	1
71	Mollusca	Bivalvia	Arcidae	Calloarca	<i>Calloarca alternata</i>	0	0	0	1
72	Mollusca	Bivalvia	Corbulidae	Caryocorbula	<i>Caryocorbula colimensis</i>	0	0	0	1
73	Mollusca	Gastropoda	Potamididae	Cerithideopsis	<i>Cerithideopsis montagnei</i>	1	1	1	1
74	Mollusca	Gastropoda	Cerithiidae	Cerithium	<i>Cerithium vulgatum</i>	0	1	0	1
75	Mollusca	Bivalvia	Caecidae	Chione	<i>Chione compta</i>	0	0	0	1
76	Mollusca	Bivalvia	Caecidae	Chionopsis	<i>Chionopsis amathusia</i>	0	0	0	1

77	Mollusca	Gastropoda	Cylichnidae	Cylichnella	<i>Cylichnella defuncta</i>	0	0	0	1
78	Mollusca	Bivalvia	Donacidae	Donax	<i>Donax californicus</i>	1	1	0	1
79	Mollusca	Bivalvia	Tellinidae	Eurytellina	<i>Eurytellina regia</i>	1	1	0	1
80	Mollusca	Bivalvia	Ungulinidae	Felaniella	<i>Felaniella sericata</i>	1	0	1	1
81	Mollusca	Gastropoda	Pisaniidae	Hesperisternia	<i>Hesperisternia elegans</i>	1	1	1	1
82	Mollusca	Gastropoda	Pisaniidae	Hesperisternia	<i>Hesperisternia panamica</i>	1	0	1	1
83	Mollusca	Gastropoda	Caecidae	Ilioichione	<i>Ilioichione subrugosa</i>	1	1	1	1
84	Mollusca	Bivalvia	Lasaeidae	Kelliopsis	<i>Kelliopsis obliqua</i>	0	0	0	1
85	Mollusca	Bivalvia	Cardiidae	Laevicardium	<i>Laevicardium elatum</i>	0	0	0	1
86	Mollusca	Bivalvia	Veneridae	Leukoma	<i>Leukoma asperrima</i>	1	1	1	1
87	Mollusca	Bivalvia	Mytilidae	Mytella	<i>Mytella charruana</i>	1	1	1	1
88	Mollusca	Gastropoda	Nassariidae	Nassarius	<i>Nassarius bailyi</i>	0	0	1	1
89	Mollusca	Gastropoda	Nassariidae	Nassarius	<i>Nassarius nodicinctus</i>	1	0	1	1
90	Mollusca	Gastropoda	Naticidae	Natica	<i>Natica sp.</i>	1	1	1	1
91	Mollusca	Gastropoda	Neritidae	Vitta	<i>Vitta virginea</i>	1	1	1	1
92	Mollusca	Bivalvia	Lucinidae	Parvilucina	<i>Parvilucina mazatlanica</i>	0	0	0	1
93	Mollusca	Gastropoda	Nassariidae	Phrontis	<i>Phrontis complanata</i>	0	0	1	1
94	Mollusca	Bivalvia	Solecurtidae	Tagelus	<i>Tagelus longisinuatus</i>	1	1	1	1
95	Mollusca	Bivalvia	Solecurtidae	Tagelus	<i>Tagelus politus</i>	1	1	1	1
96	Mollusca	Gastropoda	Cerithiopsidae	Seila	<i>Seila assimilata</i>	1	0	0	0
97	Mollusca	Gastropoda	Muricidae	Stramonita	<i>Stramonita biserialis</i>	1	0	0	0

98	Mollusca	Gastropoda	Naticidae	Notocochlis	<i>Notocochlis chemnitzii</i>	1	0	0	0
99	Mollusca	Gastropoda	Turritellidae	Turritella	<i>Turritella sp.</i>	1	0	0	0
100	Mollusca	Gastropoda	Columbellidae	Mazatlania	<i>Mazatlania fulgurata</i>	1	0	0	0
101	Mollusca	Bivalvia	Veneridae	Cyclinella	<i>Cyclinella subquadrata</i>	1	0	0	0
102	Bryozoa	-	-	-	-	1	0	1	1
103	Cordata	-	-	-	-	1	0	1	0
104	Foraminifera	-	-	-	-	0	1	1	1
105	Cnidaria	Hydrozoa	-	-	-	0	1	0	0
106	Artropoda	Insecta	-	-	-	1	0	0	1
107	Nemertea	-	-	-	-	1	0	1	1
108	Phoronida	-	-	-	-	0	0	1	0
109	Sipunculida	-	-	-	-	0	0	1	1
110	Echinodermata	Ophiuroidea	-	-	-	0	0	1	1
111	Artropoda	-	-	-	-	0	1	0	0
112	Cordata	-	-	-	-	0	1	0	0

**Anexo 2.** MOTUs de metazoos por filo en cada una de los sistemas lagunares estudiados

Filo	No Total de MOTUs	Chacahua-Pastoría No. MOTUs	Corralero- Alotengo No. MOTUs
Arthropoda	148	110	81
Cnidaria	33	26	22
Mollusca	32	26	21
Annelida	30	23	23
Porifera	25	23	15
Chordata	24	20	18
Nematoda	15	10	10
Rotifera	9	7	8
Echinodermata	3	2	2
Nemertea	3	2	2
Platyhelminthes	3	1	3
Chaetognatha	2	1	1
Placozoa	2	1	1
Gastrochida	1	1	1
Kinorhyncha	1	0	1
Xenacoelomorpha	1	1	0

**Anexo 3.** Nuevos reportes. Resultados de BLAST en NCBI para nuevos registros potenciales en la región.

<b>Metazoos</b>								
OTU ID	Descripción	Max. Score	Total Score	Query Cover	E. Value	Porcentaje de identidad	Accession	Número de lecturas
OTU_146	Amphibalanus eburneus isolate ES_ebur01 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	555	555	100.0%	7E-154	100.0%	MK240317.	71
OTU_199	Macrothrix sp. HE-364 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	551	551	100.0%	9E-153	99.7%	KC617066.1	37
OTU_1120	Calanus propinquus isolate CAPR3 cytochrome c oxidase subunit 1 (cox1) gene, partial cds; mitochondrial	538	538	100.0%	7E-149	99.0%	KC754433.1	6
<b>Microeucariotas</b>								
OTU ID	Descripción	Max. Score	Total Score	Query Cover	E. Value	Porcentaje de identidad	Accession	Número de lecturas
OTU_412	Alexandrium leei Al_KOCHI genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence	684	684	100%	0	100.00%	LC474142.1	250
OTU_991	Amphidinium klebsii isolate CMSTAC018 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	684	684	100%	0	100.00%	EU046335.1	19
OTU_257	Gyrodinium jinhaense strain GSBS1612 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	684	684	100%	0	100.00%	MH665395.1	479

OTU_1298	Lingulodinium polyedrum gene for 18S rRNA, partial sequence, country: USA: California, San Pedro Harbor	656	656	100%	0	98.65%	AB693196.1	45
OTU_237	Prorocentrum triestinum isolate NY13S_196 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	673	673	100%	0	99.46%	KY980052.1	417
OTU_860	Pellucidodinium psammophilum gene for 18S ribosomal RNA, partial sequence, isolate: Nosappu	656	656	100%	0	98.65%	LC027032.1	99
OTU_2803	Nusuttodinium aeruginosum genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, large subunit ribosomal RNA, partial and complete sequence	590	590	100.0%	2E-164	95.4%	AB921311.1	3
OTU_1756	Alexandrium ostenfeldii JS9 gene for 18S ribosomal RNA, partial sequence	667	667	100%	0	99.19%	LC433644.1	203
OTU_19	Alexandrium pohangense genomic DNA sequence contains 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene, strain APPH1409, isolate#1	673	673	100%	0	99.46%	LN811348.1	14801
OTU_597	Gonyaulax spinifera genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, 28S rRNA gene, culture collection CCAP 1118/2	673	673	100%	0	99.46%	FR865625.1	194