



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas  
Programa de Magíster en Ciencias con mención en Oceanografía

## **Caracterización de la microbiota gastro-intestinal del zooplancton asociado a la Zona de Mínimo Oxígeno frente a Chile**



Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias con mención en  
Oceanografía

**BELÉN ANAÍ FRANCO CISTERNA**  
**CONCEPCIÓN-CHILE**  
2016

Profesora Guía: Pamela Hidalgo Díaz  
Departamento de Oceanografía, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas  
Universidad de Concepción

Profesor Co-guía: Osvaldo Ulloa Quijada  
Departamento de Oceanografía, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas  
Universidad de Concepción

La Tesis de “Magister en Ciencias con mención en Oceanografía” titulada “CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA GASTRO-INTESTINAL DEL ZOOPLANCTON ASOCIADO A LA ZONA DE MÍNIMO OXÍGENO FRENTE A CHILE”, de la Srta. “BELÉN ANAÍS FRANCO CISTERNA” y realizada bajo la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, ha sido aprobada por la siguiente Comisión de Evaluación:

Dra. Pamela Hidalgo Díaz  
Profesora Guía  
Universidad de Concepción

---

Dr. Osvaldo Ulloa Quijada  
Profesor Co-Guía  
Universidad de Concepción

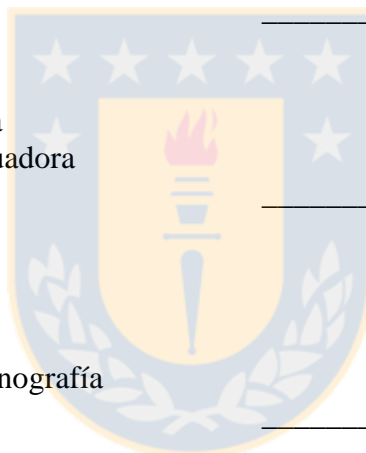
---

Dr. Alejandro Murillo Córdova  
Miembro de la Comisión Evaluadora  
Universidad de Concepción

---

Dra. Laura Farías  
Directora  
Programa de Magister en Oceanografía  
Universidad de Concepción

---



Esta tesis se la dedico a las hermosas mujeres que forman parte de mi vida, apoyándome e impulsándome a lograr mis metas: mamá, hermana, tías y abuelitas. Porque desde el universo y el nido, incentivan y resguardan mi andar.



## AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer sentidamente a todos quienes con su colaboración y apoyo hicieron posible el desarrollo y término de esta tesis.

En primer lugar, agradezco a los miembros de mi comisión de tesis. A mi profesora guía, Pamela Hidalgo, por apoyarme tanto académica como emocionalmente en este largo camino de formación desde el pregrado hasta hoy. A mi profesor co-guía, Osvaldo Ulloa, por permitirme desarrollar esta idea y abrirme las puertas para seguir aprendiendo del tema. A Alejandro Murillo por enseñarme, orientarme y avanzar conmigo todo el camino que significó esta tesis, con sus altos y bajos.

En segundo lugar, agradezco a Ramiro Riquelme y Carlos Henríquez por invitarme a desarrollar la investigación asociada al krill y por entregarme, generosamente, sus conocimientos y experiencias en el tema.

Con mucho cariño, agradezco a mis compañeros y amigos del Grupo de Estudio en Ecología y Biodiversidad del Plancton, Pamela Fierro, Guillermo Feliú, Richard Cobo, Sonia Yañez, Paula Ruz, Katherine Aníñir y Johanna Gaete. Por su colaboración en distintos aspectos académicos, pero por sobre todo, por su cariño, alegría y compañerismo.

Agradezco también al grupo de trabajo del Laboratorio de Oceanografía Microbiana, especialmente a Marcela Montoya y Montserrat Aldunate, por la enseñanza y paciencia en mi aprendizaje de las técnicas de análisis molecular.

También, deseo agradecer a todo el equipo de extensión del Instituto Milenio de Oceanografía, especialmente a Tamara Luna, Bárbara Léniz y Jean Pierre Molina por la posibilidad que me entregaron de socializar los conocimientos científicos a la comunidad de la región del Bío-bío y, aunque no formó parte de mi tesis propiamente tal, fue un trabajo paralelo igualmente importante, donde pude aportar con un granito de arena a la divulgación de las ciencias como parte del rol social de los científicos.

Agradezco a las distintas fuentes de financiamiento que me permitieron estudiar este magister: Beca Premio Universidad de Concepción, Beca de Magister Nacional CONICYT (CONICYT-PCHA/Magister Nacional/2014-22141263), Beca para postgrados del Instituto

Milenio de Oceanografía, Fondecyt 1161483 del Dr. Osvaldo Ulloa y Proyecto de colaboración internacional CONICYT Chile-USA 2012-0006 de la Dra. Pamela Hidalgo.

Agradezco a *International Associated Laboratory Marine Biogeochemistry and Functional Ecology* (LIA MORFUN), por financiar mi estadía de entrenamiento en el Observatorio Oceanográfico de Banyuls sur Mer, Universidad Pierre et Marie Curie, Francia.

Finalmente, agradezco profundamente a mi papá y mamá, Osvaldo y Jeanette, a mi hermano Mauricio y a mi hermana Pía, por su apoyo constante y amor incondicional.



## CURRICULUM VITAE

Belén Anaís Franco Cisterna

Nacida el 14 de mayo de 1991, en Buin, Chile

2014-2016: Magíster en Ciencias mención Oceanografía, Universidad de Concepción, Chile.

2009-2014: Título profesional de Biólogo Marino, Universidad de Concepción, Chile.

2009-2013: Grado de Licenciado en Biología Marina, Universidad de Concepción, Chile.

### ÁREAS DE INVESTIGACIÓN

Principal: Oceanografía Biológica

Secundaria: Ecología pelágica

### PUBLICACIONES

Franco-Cisterna, B., Hidalgo, P., Murillo A.A. & Ulloa, O. 2016. Revised approach to the study of the gut microbiome of copepods. Enviado a *Marine Biology*.

Ruz, P.M., Hidalgo, P., Franco-Cisterna, B., Cornejo, M. & Riquelme-Bugueño, R. Vertical distribution of copepod eggs at the Oxygen Minimum Zone off Mejillones Bay (23°S) in the Humboldt Current Ecosystem. Enviado a *Marine Ecology Progress Series*.

### EXPERIENCIA PROFESIONAL

2013-2015. Ayudante de Investigación en Proyecto de colaboración internacional CONICYT Chile-USA 2012-0006 “*Ecological consequences of low-oxygen water masses on mesozooplankton in the Humboldt Current ecosystem*”.

### EXPERIENCIA DOCENTE

2012, 2014, 2015. Ayudante del curso Fundamentos de la investigación Científica, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

2013. Ayudante del curso Ecología y taxonomía de copépodos, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

2013. Ayudante del curso Tópicos en Biología Marina y Oceanografía, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

#### CRUCEROS OCEANOGRÁFICOS Y EXPERIENCIA EN TERRENO

2016. Crucero *Mesoscale Ocean Plankton Expedition* (MOPEX). Instituto Milenio de Oceanografía, Chile. Septiembre de 2016.

2013-2015. Muestreos de zooplancton y medición de variables oceanográficas en bahía de Mejillones, Proyecto de colaboración internacional CONICYT Chile-USA 2012-0006.

#### CURSOS Y PASANTÍAS

2016. IX Curso Internacional “*Ecology and Diversity of Marine Microorganisms*” (ECODIM), *Austral Summer Institute* (ASI). Estación de Biología Marina, Universidad de Concepción, Dichato, Chile. 11 al 30 de enero de 2016.

2015. Estudio molecular de la microbiota intestinal de copépodos del Pacífico-Sur oriental: diversidad y coevolución. Tutor: Dr. Yves Desdevises. Observatorio Oceanográfico de Banyuls/Mer, Universidad Pierre et Marie Curie. Francia. Noviembre-diciembre de 2015.

2014. Entrenamiento en el estudio de interacciones parásitas entre componentes zoo y fitoplanctónicos. Tutor: Dr. Fernando Gómez. Estación Marina de Ubatuba, Instituto Oceanográfico de la Universidad de Sao Paulo. Brasil. Noviembre de 2014.

2013. Minicurso Adaptación evolutiva del zooplancton al cambio global, en el marco del XV COLACMAR, Punta el Este, Uruguay. 30 de octubre de 2013.

2012. Curso de Aves y Mamíferos Marinos, Estación Costera de Investigaciones Marinas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Las Cruces, Chile. Marzo y julio de 2012.

#### BECAS Y PREMIOS

2016. Beca para postgrados del Instituto Milenio de Oceanografía.

2016. Beca para tesis Fondecyt 1161483.

2014-2015. Beca CONICYT-PCHA/Magister Nacional/2014-22141263.

2014-2015. Beca Premio Universidad de Concepción

2014. Premio Universidad de Concepción.

## EXTENSIÓN Y DIVULGACIÓN CIENTÍFICA

2014-2016. Organizadora y monitora en talleres del Océano, Campamentos Científicos ChileVa!-Explora. Pinto y Tomé, Chile. CICAT e IMO.

2015-2016. Monitora científica en Proyecto de Proyección al Medio Externo "Muestra Audiovisual Científica Itinerante (MACI)". IMO y PAR Explora BíoBio.

2015-2016. Apoyo científico a Academia de Ciencias, Colegio Salesiano Concepción. Preparación y ejecución de proyectos científicos escolares.





## Tabla de contenidos

Índice de tablas .....	x
Índice de figuras .....	xi
RESUMEN .....	xiv
ABSTRACT .....	xvi
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Sistema de Corrientes de Humboldt y Zona de Mínimo Oxígeno .....	1
1.2 Zooplancton y Zona de Mínimo Oxígeno .....	2
1.3 Microbiota gastro-intestinal del zooplancton .....	3
1.4 Aproximaciones al estudio de la microbiota en el zooplancton .....	5
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	9
2.1 Objetivo general .....	9
2.2 Hipótesis de Trabajo .....	9
2.3 Objetivos específicos .....	9
3. METODOLOGÍA .....	10
3.1 Área de estudio .....	10
3.2 Obtención de datos bio-oceanográficos y muestras zooplanctónicas .....	10
3.3 Preparación de las muestras de copépodos y eufáusidos .....	10
3.4 Estudio de la microbiota intestinal de copépodos .....	11
3.5 Estudio de la microbiota estomacal de eufáusidos .....	12
3.6 Análisis filogenético .....	16
4. RESULTADOS .....	17
Capítulo 1: Revisión de aproximaciones metodológicas para el estudio del microbioma intestinal de copépodos .....	17
Capítulo 2: Caracterización taxonómica de la microbiota intestinal de copépodos mediante técnicas moleculares de secuenciación masiva .....	58
Capítulo 3: Identificación de la microbiota estomacal del krill de la corriente de Humboldt mediante citometría de flujo, <i>cell-sorting</i> , y secuenciación .....	59
5. DISCUSIÓN .....	66
5.1 Aproximaciones metodológicas .....	66
5.2 Microbioma intestinal de copépodos .....	67
5.3 Microbioma estomacal de eufáusidos .....	70
5.4 Perspectivas futuras .....	72
6. CONCLUSIONES .....	75
7. REFERENCIAS .....	77

## Índice de tablas

CAPÍTULO 1: Revisión de aproximaciones metodológicas para el estudio del microbioma intestinal de copépodos

Table 1. Size classes defined for the copepods *Paracalanus cf indicus*, *Acartia tonsa*, *Centropages brachiatus*, *Calanus chilensis*, *Rhincalanus nasutus* and *Eucalanus inermis*, and metadata of sampling areas, dates, season, number of guts utilized for each extraction, method of DNA extraction and results..... 46

Table 2. Summary of the primer sets utilized during this study..... 48

Table 3. PCR results for each sample with different primer couples. Symbols means: \* Expected band; \*\* Expected and unspecific bands; - Negative; / No PCR..... 49

CAPÍTULO 3: Identificación de la microbiota estomacal del krill de la corriente de Humboldt mediante citometría de flujo, *cell-sorting*, y secuenciación.

Tabla 1. Afiliación filogenética, número y metodología de obtención de secuencias de clones del estómago de *Euphausia mucronata* del centro-sur de Chile..... 61

## Índice de figuras

### METODOLOGÍA

Figura 1. Principales pasos del protocolo diseñado para el estudio de la microbiota intestinal de copéodos..... 14

Figura 2. Principales pasos de las metodologías aplicadas para el estudio de la microbiota estomacal de eufáusidos..... 15

### CAPÍTULO 1: Revisión de aproximaciones metodológicas para el estudio del microbioma intestinal de copéodos

Figure 1. Areas of sampling in the Humboldt Current System, off coast of Chile. A) Indicates the South American continent and location of Chile, facing the Pacific Ocean. B) Shows the localization of Mejillones bay, in the north part of the country, and the sampling station 3. C) Shows the localization of Coliumo bay, in the center-south of Chile, and the sampling station 18..... 50

Figure 2. Morphology and body size of the copepods that dominates the Humboldt Current System and were utilized in this study. A) *Paracalanus* cf. *indicus*, B) *Acartia tonsa*, C) *Centropages brachiatus*, D) *Calanus chilensis*, E) *Rhincalanus nasutus* and F) *Eucalanus inermis*. For each copepod the morphology and size of the gut is shown as inset, the scale bar for A, B, C and D = 0.2 mm and for E and F = 1 mm. The guts were extracted with the technique described in this work..... 51

Figure 3. Latitudinal and vertical distribution of the dominant copepods: *Paracalanus* cf. *indicus*, *Centropages brachiatus*, *Acartia tonsa*, *Calanus chilensis*, *Eucalanus inermis* and *Rhincalanus nasutus* in the Humboldt Current System and were utilized in this study. Arrows indicate Diel Vertical Migration behavior and blue dotted lines indicate dissolved oxygen vertical profiles..... 52

Figure 4. Short protocol derived from the results of this work. Summary of the steps that led us to a successful result. For specific development of each step, please see Materials and Methods..... 53

Figure 5. Phylogenetic analysis for Bacterial 16S rRNA sequences obtained with universal primers. The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Kimura 2-parameter model (Kimura 1980). The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches (bootstrap). A discrete

Gamma distribution was used to model evolutionary rate differences among sites (5 categories (+G, parameter = 0.5922)). The rate variation model allowed for some sites to be evolutionarily invariable ([+I], 12.3290% sites). The analysis involved 432 nucleotide sequences. In A) and B) are shown subtrees of the complete tree, where the sequences of interest are located. The black dots denoted collapsed branches that are formed by several sequences, where the taxonomic level is indicated (Class, Family or Genus), in order to reduce the tree size. Evolutionary analyses were conducted in MEGA 6 (Tamura et al. 2013)..... 54

Figure 6. Phylogenetic analysis for Archaeal 16S rRNA sequences obtained with universal primers. The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Kimura 2-parameter model (Kimura 1980). A discrete Gamma distribution was used to model evolutionary rate differences among sites (5 categories (+G, parameter = 0.6482)). The rate variation model allowed for some sites to be evolutionarily invariable ([+I], 17.2932% sites). In the figure is shown a subtree of the complete tree, where the sequences of interest are located. The analysis involved a total of 138 nucleotide sequences. Evolutionary analyses were conducted in MEGA 6 (Tamura et al. 2013)..... 56

Figure 7: Phylogenetic analysis for Bacterial 16S rRNA sequences, obtained with the new primer sets 448F/925R and 276F/801R. The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Kimura 2-parameter model (Kimura 1980). A discrete Gamma distribution was used to model evolutionary rate differences among sites (5 categories (+G, parameter = 0.7535)). The analysis involved a total of 124 nucleotide sequences. The sequences derived from *Rhincalanus nasutus* are depicted in red and those derived from *Eucalanus inermis* are depicted in blue. Evolutionary analyses were conducted in MEGA 6 (Tamura et al. 2013)..... 57

**CAPÍTULO 3: Identificación de la microbiota estomacal del krill de la corriente de Humboldt mediante citometría de flujo, *cell-sorting*, y secuenciación.**

Figura 1. Características físico-químicas de la columna de agua en la Estación 18, 2 de marzo de 2016. A) Oxígeno disuelto, Temperatura y Salinidad. B) Fluorescencia y Radiación Fotosintéticamente Activa..... 62

Figura 2. Citogramas del contenido estomacal de *Euphausia mucronata* y muestras ambientales de la ST-18, 2 de marzo de 2016. A) Muestra de agua de mar a 10 m, autofluorescente. B) Muestra de agua de mar a 10 m, teñida con SYBR Green I. C) Contenido estomacal del krill autofluorescente. D) Contenido estomacal del krill teñido con SYBR Green I..... 63

Figura 3. Amplificación por PCR del contenido gastro-intestinal de *Euphausia mucronata* con partidores universales de bacterias 358F-907Rm. A) Comunidad total extraída desde el tejido gastro-intestinal. Cada carril corresponde a muestras de a) 4 estómagos, b) 7 intestinos,

c) 2 estómagos, d) 5 intestinos, e) 10 intestinos, f) 1 estómago, g) 2 intestinos, h) positivo, i) negativo. B) Muestras de células bacterianas separadas por *cell-sorting*. Cada carril corresponde a muestras de a)  $2 \times 10^4$  células, b)  $1,5 \times 10^4$  células, c) positivo, d) negativo..  
..... 64

Figura 4. Análisis filogenético de secuencias bacterianas del estómago del krill obtenidas con los partidores universales 358F-907Rm. La historia evolutiva fue inferida mediante *Fasttree*. En color rojo se observan las secuencias obtenidas por citometría de flujo y *cell-sorting* y en negro las secuencias obtenidas desde extracción de ADN directa del estómago del krill. En paréntesis se indica el número de clones. Los círculos indican un valor de soporte de 0.5 a 1..... 65



## RESUMEN

El zooplancton es un grupo funcional clave para la estructura y funcionamiento del ecosistema pelágico, representando un componente esencial en las tramas tróficas marinas y también, un nicho específico para el desarrollo de microorganismos. En los últimos años, se han incrementado los estudios acerca del microbioma intestinal de distintos animales, debido a la influencia de los microorganismos en aspectos fisiológicos, metabólicos e inmunológicos del hospedador, como también en los ciclos biogeoquímicos globales. En este sentido, los copépodos, que representan el componente más abundante del zooplancton en el Sistema de Corrientes de Humboldt (SCH), han sido sometidos a estudios de microbioma, sin embargo, la mayoría de los microbiomas descritos para estos organismos no han hecho distinción entre microorganismos endo- y ecto-biontes.

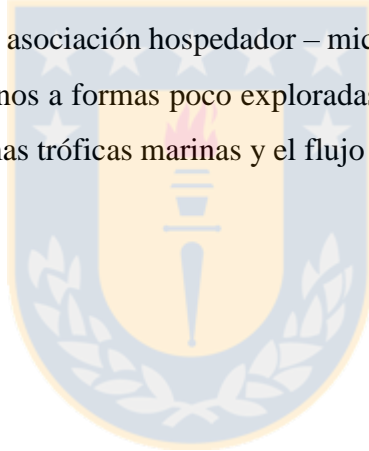
En esta tesis se diseñó un protocolo para el estudio específico del microbioma intestinal de copépodos, que fue testeado en especies dominantes en dos áreas de surgencia costera en el SCH: Bahía de Mejillones (St-3; 23° 00.2' S, 70°28.2' W) y Bahía de Coliumo (St-18; 36° 30' 46'' S; 73° 7' 38'' W) frente a Chile. Nuestro protocolo incluyó una aproximación para la remoción del intestino de los copépodos, el número de intestinos necesario para análisis moleculares, un protocolo de extracción de ADN eficiente para baja cantidad de tejido, y dos nuevas parejas de partidores para la amplificación del gen 16S rRNA de bacterias con mínima contaminación cruzada con otros dominios. Se estudió el microbioma intestinal de dos copépodos asociados a la Zona de Mínimo Oxígeno, *Eucalanus inermis* y *Rhincalanus nasutus*. Las inferencias filogenéticas mostraron que el intestino de *E. inermis* estuvo habitado principalmente por Gamma-proteobacteria, con dominancia de OTUs afiliados a *Vibrio* sp. El intestino de *R. nasutus*, por otro lado, presentó OTUs de Alpha- y Gamma-proteobacteria, principalmente asociados a *Candidatus Pelagibacter ubique*, *Pseudomonas* sp., *Pseudoalteromonas* sp. y *Vibrio* sp. Además, se reportó la presencia de arqueas afiliadas al Grupo Marino II de Euryarchaea en el intestino de *Acartia tonsa*, representando el primer registro de arqueas como componente de la microbiota intestinal de copépodos.

Adicionalmente, se estudió el microbioma estomacal de krill endémico del SCH, *Euphausia mucronata*, mediante técnicas moleculares tradicionales en conjunto con citometría de flujo y *cell-sorting*. El microbioma estomacal del krill estuvo dominado por bacterias del género

*Balneola* sp., las que no habían sido previamente reportadas en la columna de agua del área de estudio ni tampoco como componentes de la microbiota de invertebrados marinos. Estas bacterias sólo fueron detectadas mediante citometría de flujo, reflejando especificidad en el análisis y ofreciendo una nueva herramienta metodológica que aporta información previamente desconocida y complementaria a el estudio tradicional del microbioma estomacal de eufáusidos.

Nuestros resultados sugieren que el microbioma gastro-intestinal del zooplancton tiene un componente común entre organismos de distintos ambientes y un componente especie-específico caracterizado por microorganismos particulares de cada copépodo o eufáusido y, probablemente, influenciado por el habitat y la historia de vida del hospedador.

Nuestro protocolo permitiría obtener conocimiento en mayor profundidad acerca del microbioma intestinal del zooplancton en diferentes sistemas, al igual que las consecuencias fisiológicas y ambientales de la asociación hospedador – microorganismos simbiotes. Tales conocimientos podrían acercarnos a formas poco exploradas de entender el funcionamiento de estos grupos claves, las tramas tróficas marinas y el flujo de los elementos en el ambiente pelágico.



## ABSTRACT

Zooplankton is a key functional group for the structure and functioning of the pelagic environment, representing a key component in food webs and a specific niche for microbes. In recent years, studies of gut microbiome of different animals have increased, due to the potential implications of microorganisms in physiologic, metabolic and immunological aspects of the host and in biogeochemical cycles. Thus, copepods, which are the most abundant component of zooplankton in the Humboldt Current System (HCS), have been studied. However, most of the microbiomes described for copepods have made no distinction between endo- and ecto-bionts.

We designed a protocol for the specific study of the gut microbiome of copepods, which was tested in the dominant species from two upwelling areas in the HCS: Mejillones Bay (St-3; 23° 00.2' S, 70°28.2' W) and Coliumo Bay (St-18; 36° 30' 46'' S; 73° 7' 38'' W) off Chile. Our protocol includes an approach for the removal of the copepod gut, the number of copepod intestines necessary for molecular analysis, an efficient DNA extraction protocol for little tissue, and a new primers pair for bacterial 16S rRNA gene amplification with minimum cross-domain contamination. The gut microbiome of two copepods associated with the Oxygen Minimum Zone, *Eucalanus inermis* and *Rhincalanus nasutus*, was assessed. Phylogenetic inference showed that the gut of *E. inermis* was inhabited mainly by Gamma-proteobacteria, with the dominance of OTUs affiliated with *Vibrio* spp. The gut of *R. nasutus*, on the other hand, presented OTUs from Alpha- and Gamma-proteobacteria, mainly associated with *Candidatus Pelagibacter ubique*, *Pseudomonas* sp., *Pseudoalteromonas* sp. and *Vibrio* sp. Besides, this study contributed the first report of the presence of archaea detected in the gut of *Acartia tonsa*.

Additionally, stomach microbiome of the Humboldt Current krill, *Euphausia mucronata*, was studied by traditional molecular techniques coupled with flow cytometry and cell-sorting. The stomach microbiome of krill was dominated by *Balneola* sp., which have not been previously reported in the water column in the study area and neither as a component of the microbiota of other marine invertebrates. These bacteria were only detected by flow cytometry, reflecting specificity in the analysis and offering a new approach that provides



unknown information and complements the traditional study of the stomach microbioma of euphausiid.

Our results suggest that the gastro-intestinal microbiome of zooplankton has a common component between organisms of different environments and a specie-specific component, characterized by particular microorganisms of each copepod or euphausiid and probably influenced by the environment and the life history of the host. Our revised protocol should allow more in-depth knowledge about the gut microbiome of zooplankton in different systems, as well as of the physiological and environmental consequences of the host – microbial symbionts association. Such knowledge could approach to little explored ways to understand the functioning of zooplankton, marine food webs and flux of the elements in the pelagic environment.



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Sistema de Corrientes de Humboldt y Zona de Mínimo Oxígeno

El Sistema de Corrientes de Humboldt (SCH) es uno de los ecosistemas marinos más productivos del mundo, caracterizado por un flujo superficial de aguas de origen subantártico hacia el norte y por una fuerte surgencia de agua subsuperficial fría y rica en nutrientes de origen ecuatorial. La inyección de nutrientes a aguas superficiales mediante los eventos de surgencia, resulta en una producción primaria extremadamente alta, lo cual permite una alta producción zooplanctónica sobre extensas áreas que sustenta a los niveles tróficos superiores, incluyendo así a importantes pesquerías pelágicas (Thiel et al., 2007).

Debido a la surgencia, la alta productividad primaria en aguas superficiales y una alta demanda de oxígeno por la respiración aeróbica microbiana, el SCH presenta una Zona de Mínimo Oxígeno (ZMO) muy extensa y somera (Ulloa et al., 2013), asociada a la masa de Agua Ecuatorial Subsuperficial (AESS) (Escribano & Schneider, 2007). En ella, se encuentran concentraciones de oxígeno disuelto  $<20 \mu\text{M}$  (Ulloa & Pantoja, 2009) e inclusive se pueden desarrollar núcleos anóxicos (Ulloa et al., 2012).

Además de poseer bajas concentraciones de oxígeno disuelto, las ZMOs presentan un déficit de nitrógeno inorgánico disuelto, debido a que este elemento es perdido como nitrógeno molecular ( $\text{N}_2$ ) y óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) a través de procesos microbianos como la desnitrificación heterótrofa y la oxidación anaeróbica del amonio (anammox, del inglés *ANAerobic AMMonium OXidation*) (Ulloa & Pantoja, 2009). Estudios recientes, muestran además, la presencia de otros procesos relevantes asociados a los ciclos del azufre y carbono en las ZMOs (Ulloa et al., 2012), por lo que estas áreas estarían jugando un rol crítico en los ciclos biogeoquímicos globales.

Asimismo, las ZMOs tienen un papel clave en la estructuración de las comunidades marinas (Stewart et al., 2012). En general, estos ambientes se han descrito como áreas de baja biodiversidad de macrofauna e inhóspitos para la mayoría de los recursos marinos comerciales. Sin embargo, las ZMOs albergan comunidades bentónicas y pelágicas que incluyen protistas y metazoos adaptados a las condiciones de bajo oxígeno (Ulloa & Pantoja, 2009), además de una alta abundancia microbiana que es, incluso, mayor que en las aguas circundantes (Stevens & Ulloa, 2008). Tales comunidades microbianas se encuentran

distribuidas diferencialmente en el gradiente vertical de oxígeno disuelto en la columna de agua (Stevens & Ulloa, 2008; Belmar et al., 2011). Desde el punto de vista de las bacterias, las aguas subóxicas y disóxicas contienen un alto número de bacterias afiliadas al cluster SAR11 ( $\alpha$ -proteobacterias), cluster agg47 ( $\gamma$ -proteobacteria) y cluster SAR34 ( $\delta$ -proteobacteria). Mientras que, las aguas anóxicas a menudo están dominadas por organismos sulfuro-oxidantes ( $\gamma$ -proteobacteria y  $\epsilon$ -proteobacteria) y sulfato-reductores ( $\delta$ -proteobacteria) (Ulloa et al., 2013). A pesar de que menos es conocido acerca de la composición comunitaria de arqueas a través del gradiente de oxígeno disuelto en las ZMOs (Ulloa et al., 2013), se han evidenciado marcados cambios en la estructura de los ensambles de arqueas a través de éste. Euryarchaea del Grupo Marino II (MG-II, del inglés *Marine Group II*) son abundantes en la capa superficial óxica de la columna de agua del sistema en estudio, Crenarchaea del grupo G-I.1a tienen mayor representación en la oxiclina superior y el límite inferior de la ZMO, mientras que MG-III ha sido encontrado casi exclusivamente en el núcleo de la ZMO (Belmar et al., 2011).

Estos microorganismos median el ciclaje de nutrientes y tienen un gran potencial de estudio para comprender las interacciones metabólicas que conducen la ecología y biogeoquímica de la ZMO (Ulloa et al., 2012; Wrigth et al., 2012).

## **1.2 Zooplancton y Zona de Mínimo Oxígeno**

El zooplancton comprende un grupo funcional de organismos que modulan la estructura y funcionamiento del ecosistema pelágico a través del control de la producción fitoplanctónica, su rol como recurso alimentario de estadios tempranos de peces (Lenz, 2000) y su participación en la bomba biológica; siendo el principal responsable de la transferencia del carbono fijado por los productores primarios hacia niveles tróficos superiores y hacia aguas profundas, mediante transporte pasivo y/o activo (Hidalgo et al., 2005; Yáñez et al., 2012). Dentro de los distintos grupos taxonómicos que conforman el zooplancton, los copépodos constituyen más del 80% de su abundancia en el ambiente pelágico del SCH (Hidalgo et al., 2010; Hidalgo et al., 2012) seguido de los eufáusidos que forman densas agregaciones en zonas de surgencia costera (Brinton et al., 2000) y contribuyen entre ~5 y el 10 % de la biomasa zooplanctónica en el ecosistema pelágico (Mauchline, 1980).

En este sistema, debido a la presencia de la ZMO, se crea una barrera para la distribución vertical y migración de los copépodos, generando que las distintas especies se distribuyan a lo largo del gradiente de oxígeno disuelto en hábitats bien definidos (Escribano et al., 2000; Escribano et al., 2009). Algunas especies de copépodos dominantes se mantienen en la capa óxica de la columna de agua (<30 m), aparentemente restringidas por el borde superior de la oxiclina, como es el caso de *Paracalanus cf. indicus*, *Centropages brachiatus* y *Acartia tonsa* (Escribano et al., 2009). Otras especies de copépodos dominantes en el SCH tienen comportamiento de migraciones verticales diurnas (DVM, del inglés *Diel Vertical Migration*), como los copépodos *Calanus chilensis* cuyas migraciones le permiten interactuar con aguas hipóxicas, con contenciones de oxígeno disuelto entre 5 y 50  $\mu\text{M}$  (Hirche et al., 2014), *Rhincalanus nasutus* y *Eucalanus inermis*, cuyas DVM les permiten habitar las aguas de bajo oxígeno en fuerte asociación con la ZMO, definida como  $<1 \text{ mL O}_2 \text{ L}^{-1}$  (44  $\mu\text{M}$ ) y el eufáusido endémico de la Corriente de Humboldt, *Euphausia mucronata*, que lleva a cabo extensas DVM, concentrándose sobre los 100 m de profundidad durante la noche y entre los 200 y 300 m durante el día, en el núcleo de la ZMO (Antezana, 2002; Escribano et al., 2009; Riquelme-Bugueño et al., 2013). Si bien el krill penetra en la ZMO debido a sus adaptaciones metabólicas (González & Quiñones, 2002; Tremblay & Abele, 2015), poco se sabe acerca de las adaptaciones o estrategias que deben adoptar los copépodos para enfrentar las condiciones de bajo contenido de oxígeno disuelto en el ambiente (Hidalgo et al., 2005).

### **1.3 Microbiota gastro-intestinal del zooplancton**

En los últimos 30 años, se ha reconocido que la mayoría de los organismos eucariontes están íntimamente relacionados con una compleja comunidad de microorganismos (Margulis, 1993), beneficiosos y esenciales para su desarrollo, salud e interacciones con el ambiente (Ruby et al., 2004). Así, el zooplancton que tradicionalmente se ha relacionado de manera indirecta a los microorganismos, a través de bacterias como fuente de alimento para algunos copépodos (Gowing & Wishner, 1992; Work & Havens, 2003); y de los copépodos y eufáusidos como productores de materia orgánica disuelta que luego es consumida y remineralizada vía trama trófica microbiana (Sherr & Sherr, 1988; Steinberg et al., 2004), también se encuentra asociado a microorganismos endo- y ecto-biontes; describiéndose,

incluso, a los copépodos como un punto de alta biodiversidad (*hotspot*) microbiana en el océano (Tang, 2005).

En primera instancia, la asociación entre microorganismos y zooplancton se ha enfocado al estudio de bacterias asociadas a los copépodos, identificando la presencia de tales microorganismos en su exoesqueleto, intestino y pellets fecales (Carman & Dobbs, 1997; Brandt et al., 2010).

La microbiota intestinal, en particular, corresponde a las células microbianas que se encuentran dentro del tracto gastrointestinal del animal hospedador (Tims et al., 2013). Ésta ha sido ampliamente estudiada en animales superiores como los mamíferos, en los que se ha caracterizado como comunidades de alta diversidad, densidad poblacional y complejas interacciones, las cuales ejercen una profunda influencia sobre los procesos nutricionales, metabólicos, fisiológicos e inmunológicos del hospedador (Zoetendal et al., 2004; Zhang et al., 2010). No obstante, continuamente se están descubriendo nuevos roles y relaciones (Palmer, 2007).

En contraposición, los estudios relativos a la microbiota intestinal de organismos zooplanctónicos son más escasos y enfocados casi exclusivamente al conocimiento del dominio Bacteria, por lo tanto, las funciones anteriormente nombradas no han sido ampliamente investigadas. No obstante, el tracto gastro-intestinal de copépodos y eufáusidos podría representar potenciales nichos para el crecimiento y desarrollo de una microbiota determinada. Así, se ha reportado evidencia fotográfica y microbiológica de bacterias intestinales en copépodos (Sochard et al., 1979; Gowing & Wishner, 1992; Hansen & Bech, 1996; Nagasawa & Nemoto, 1998) y estomacales en eufáusidos (Rakusa-Suszczewski, 1988; Rakusa-Suszczewski & Zdanowski, 1989; Donachie et al., 1995).

Conceptualmente, algunos investigadores han distinguido entre bacterias intestinales “transitorias” y “residentes”. Las primeras corresponden a las bacterias ingeridas por el copépodo, que se encuentran en el intestino antes de ser digeridas o eliminadas a través de la defecación. Mientras que, las segundas son las que residen permanentemente dentro del intestino, dado que poseen la capacidad de adherirse a la pared de éste, evitando su expulsión (Harris, 1993). De este modo, se postula que el intestino de los copépodos inicialmente adquiere bacterias de una fuente externa proviniendo, probablemente, de partículas de alimentos pre-colonizadas y que, luego, ciertos grupos bacterianos pueden ser retenidos

preferentemente por el copépodo mediante una ingestión/digestión selectiva (Hansen & Bech, 1996; Tang et al., 2009); sugiriendo así, que la ingesta de alimentos, la historia de vida y el ambiente serían los principales factores afectando las dinámicas bacterianas dentro del intestino del copépodo con un activo intercambio, colonización y crecimiento bacteriano entre el intestino y el agua circundante (Harris, 1993; Tang, 2005; Tang et al., 2009). Sin embargo, estudios más recientes sugieren que a pesar de la influencia de los factores externos, los copépodos portarían asociaciones estables y potencialmente mutualistas con grupos específicos de bacterias, las cuales podrían incidir en la salud de éstos y en su interacción con el ambiente, a través de la transferencia de componentes biogénicos en las tramas tróficas marinas y los ciclos biogeoquímicos globales (Moisander et al., 2015; Shoemaker & Moisander, 2015).

Por su parte, estudios relativos al microbioma gastro-intestinal de los eupáusidos son antiguos y más escasos, y se han enfocado principalmente, al estudio de bacterias asociadas a su estómago. Tales bacterias estomacales participarían en la digestión de los componentes dietarios del krill a través de la producción de enzimas proteolíticas, lipolíticas y quitinolíticas (Rakusa-Suszczewski, 1988; Rakusa-Suszczewski & Zdanowski, 1989; Donachie et al., 1995). Mientras que las escasas investigaciones enfocadas a la microbiota intestinal del krill develan la presencia de ciliados en el intestino de *Euphausia superba*, los cuales permitirían a este organismo digerir un amplio rango de ítems alimentarios (Kawagushi & Toda, 1997).

#### **1.4 Aproximaciones al estudio de la microbiota en el zooplancton**

Un aspecto importante a destacar, es que el estudio del microbioma de los copépodos no ha hecho distinción entre los microorganismos asociados al exterior e interior de estos organismos, obviando el hecho de que el intestino de los copépodos debería ser la parte del cuerpo que porta la mayoría de las bacterias (Brandt et al., 2010) y cuyo estudio exclusivo ayudaría a responder preguntas como: si tales bacterias son transitorias o residentes, o si la colonización de los pellets fecales por bacterias ocurre al interior del intestino o luego de la defecación (Carman & Dobb, 1997; Brandt et al., 2010) y así entender el origen de los procesos microbianos asociados a los pellets fecales. Adicionalmente, si bien las bacterias asociadas al exoesqueleto de los copépodos podrían estar involucradas en procesos de

descomposición de organismos muertos (Tang et al., 2006), las bacterias internas podrían tener funciones metabólicas y fisiológicas (Moisander et al., 2015) con influencia directa en el funcionamiento de los copépodos.

Desde la década del '70 se han realizado estudios del microbioma de copépodos. Las primeras investigaciones se basaron en técnicas microbiológicas clásicas como el cultivo de microorganismos, ensayos bioquímicos y microscopía (Sochard et al., 1979; Delille & Razouls, 1994; Harris et al., 1993; Hansen & Bech, 1996; Nagasawa & Nemoto, 1998). Con el avance de las técnicas moleculares, los estudios asociados al microbioma de copépodos han involucrado técnicas cultivo-independientes usando análisis moleculares tradicionales como amplificación por reacción en cadena de polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*), biblioteca de clones y técnicas de *fingerprinting* (Tang 2005; Tang et al. 2009; Brandt et al. 2010; Gerdts et al. 2013). Actualmente, se ha iniciado el estudio del microbioma mediante técnicas de secuenciación de última generación (NGS, del inglés *Next Generation Sequencing*) (Moisander et al., 2015; Skovgaard et al., 2015; Shoemaker & Moisander, 2015). Sin embargo, con excepción del estudio de Sochard y colaboradores (1979) quienes realizaron una caracterización del microbioma intestinal de copépodos de manera exclusiva a partir del cultivo de bacterias, las demás investigaciones lo han abordado en su totalidad. Este hecho se debe, probablemente, a dificultades metodológicas que implican, en primer lugar, que el estudio de los microorganismos abarca el campo de la microbiología. Como esta disciplina es ajena a la ecología del zooplancton, requiere de un esfuerzo interdisciplinario de investigación. En segundo lugar, los estudios moleculares utilizados actualmente para el estudio de microbiomas, requieren material genético de alta calidad y cantidad para su implementación, lo cual se ve dificultado por el pequeño tamaño de los copépodos (< 6 mm) y, más aún, de sus intestinos (< 5 mm de largo y ~ 140 µm de ancho).

Por otro lado, para el estudio del microbioma de eufáusidos los investigadores se han enfocado casi exclusivamente al conocimiento de las bacterias asociadas al estómago de estos organismos, sin embargo, se han basado en técnicas microbiológicas tradicionales como el conteo de bacterias en placas de agar (PCA, del inglés *Plate Count Agar*) (Kelly et al., 1978; Fevolden & Eisa, 1981; Donachie & Zdanowski, 1998), conteo directo bajo microscopía de epifluorescencia (AODC, del inglés *Acridine Orange Direct Count*) (Donachie &



Zdanowski, 1998) y la identificación del tamaño y forma de las bacterias mediante microscopía electrónica (Kawagushi & Toda, 1997; Fevolden & Eisa, 1981).

Al igual en que copépodos, se han llevado a cabo técnicas de aislamiento y cultivo de cepas bacterianas (Donachie, 1995; Donachie & Zdanowski, 1998; Denner et al., 2000) y sólo existe un estudio de análisis filogenético basado en el gen 16S rRNA (Denner et al., 2000).

Tanto en copépodos como en eufásuidos, las técnicas basadas en cultivos de bacterias permiten la caracterización de la mayoría de los organismos cultivables y dan la posibilidad de determinar características fisiológicas de relevancia ambiental (Prosser & Embly, 2002).

Sin embargo, estos métodos son laboriosos y requieren conocimiento previo de los requerimientos nutricionales individuales de los microorganismos (Zoetendal et al., 2004).

Por esta razón, es necesario el desarrollo de nuevos protocolos que involucren aproximaciones moleculares modernas y enfocadas a los estómagos y/o intestinos del zooplancton de manera exclusiva, para un mejor conocimiento de las comunidades microbianas asociadas a tales nichos específicos.

En definitiva, a pesar de que se ha probado la existencia de bacterias asociadas al tracto estomacal y/o intestinal de copépodos y eufásuidos en distintos ambientes y en algunos casos, tales comunidades han sido caracterizadas taxonómicamente; existen aún aspectos metodológicos esenciales para el estudio de la microbiota de estos organismos que no han sido abordados. Esto es, la ausencia de una metodología que permita distinguir entre microorganismos endo- y ecto-biontes asociados al zooplancton. Adicionalmente, no hay conocimiento de la presencia de otros microorganismos, además de bacterias, como componentes de la microbiota intestinal de copépodos; como arqueas, por ejemplo. Finalmente, considerando que la microbiota intestinal asociada a los copépodos puede estar influenciada por su historia de vida y, a su vez, los patrones en la historia de vida de los copépodos están influenciados por las condiciones ambientales a las que estos organismos se ven expuestos (Mauchline, 1998), se desconoce la potencial influencia de un ambiente como la ZMO frente a Chile, con sus particularidades en cuanto a las características físico-químicas de la columna de agua, diversidad de microorganismos, metabolismos y potenciales interacciones, en la ocurrencia de una simbiosis entre zooplancton y microorganismos.

Considerando estos antecedentes, surgen las preguntas: ¿Qué aproximaciones metodológicas permitirían un estudio exclusivo de la microbiota gastro-intestinal de copépodos y



eufáusidos? ¿Qué microbiota gastro-intestinal poseen copépodos y eufáusidos en la ZMO frente a Chile?

Para dar respuesta a tales interrogantes se desarrolló esta Tesis de Magister, propuesta como el primer estudio de la diversidad taxonómica de bacterias y arqueas componentes de la microbiota gastro-intestinal de copépodos y eufáusidos asociados a la ZMO en dos áreas de surgencia costera frente a Chile, en el océano Pacífico Sur Oriental.



## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

Caracterizar la diversidad taxonómica de la microbiota gastro-intestinal del zooplancton dominante asociado al gradiente de oxígeno disuelto en el norte y centro-sur de Chile, y el efecto de las variables ambientales sobre ésta.

### 2.2 Hipótesis de Trabajo

La composición comunitaria de la microbiota gastro-intestinal del zooplancton responde a las diferentes concentraciones de oxígeno disuelto en la columna de agua en la Zona de Mínimo Oxígeno frente a Chile.

### 2.3 Objetivos específicos

- 1) Implementar y mejorar metodologías para la caracterización exclusiva de la microbiota gastro-intestinal del zooplancton dominante en las zonas de surgencia costera del norte y centro-sur de Chile.
- 2) Caracterizar taxonómicamente la microbiota intestinal de copépodos dominantes asociados a la Zona de Mínimo Oxígeno en las zonas de surgencia costera del norte y centro-sur de Chile.
- 3) Caracterizar taxonómicamente la microbiota estomacal del eufáusido *Euphausia mucronata* en la zona de surgencia costera del centro-sur de Chile.

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1 Área de estudio

El estudio se llevó a cabo en distintos períodos comprendidos entre 2015 y 2016, en dos zonas de surgencia costera frente a Chile. Los puntos de muestreo fueron la Estación 3 en la bahía de Mejillones, norte de Chile (St-3; 23° 0,2' S - 70° 28,2' W) y la Estación 18 cercana a la bahía de Coliumo, centro-sur de Chile (St-18; 36° 30' 46'' S; 73° 7' 38'' W), en continuidad con las Series de Tiempo llevadas a cabo en Mejillones (Escribano et al., 2012) y en Centro de Investigación Oceanográfica en el Pacífico Sur-Oriental (COPAS) del Departamento de Oceanografía de la Universidad de Concepción, respectivamente.

#### 3.2 Obtención de datos bio-oceanográficos y muestras zooplanctónicas

Para caracterizar la columna de agua, se midieron las variables oceanográficas (oxígeno disuelto, temperatura y salinidad) mediante un perfilador tipo CTD-O SeaBird 19 o un micro CTD EXO2 sonde. Adicionalmente, en la estación 18 durante marzo de 2016, se tomaron muestras de agua de mar a distintas profundidades para cuantificar la abundancia de picoplancton mediante citometría de flujo.

En cada estación se obtuvieron muestras de zooplancton, mediante lances integrados (90-0 m) con una red WP-2 de 200 µm de apertura de malla. Posteriormente, las muestras fueron preservadas en distintos medios: etanol 99%, congeladas en nitrógeno líquido o se mantuvieron vivas, para realizar los análisis moleculares posteriores.

#### 3.3 Preparación de las muestras de copépodos y eufáusidos

En laboratorio, bajo las lupas estereoscópicas SMZ 1000 (Nikon) y Stereo Discovery V8 (Zeiss) se identificaron las especies de copépodos dominantes en ambas zonas de estudio, las cuales fueron *Paracalanus* cf. *indicus*, *Acartia tonsa*, *Centropages brachiatus*, *Calanus chilensis* (dominantes a lo largo del SCH), *Calanoides patagoniensis*, *Rhincalanus nasutus* (dominantes el centro-sur de Chile), *Eucalanus inermis* (dominante en el norte de Chile) y la especie de krill endémico de la corriente de Humboldt, *Euphausia mucronata*.

Con pinzas esterilizadas se separaron individuos adultos de las especies ya nombradas, tanto de copépodos como de eufáusidos. Los organismos seleccionados fueron lavados una o dos

veces con agua mili-Q y puestos en portaobjetos, previamente esterilizados, para realizar la remoción de los intestinos en copépodos y de los estómagos en eufáusidos. Los intestinos de copépodos y un set estómagos de krill fueron preservados en agua mili-Q hasta la extracción de ADN. Otro set de estómagos de krill fue mantenido en agua de mar filtrada por 0.2  $\mu\text{m}$  hasta su análisis mediante citometría de flujo.

### **3.4 Estudio de la microbiota intestinal de copépodos**

Para estudiar la microbiota intestinal de las seis especies de copépodos nombradas, se diseñó un protocolo que aborda desde la remoción de los intestinos y la extracción de ADN de las muestras intestinales, hasta la caracterización taxonómica de las mismas (Fig. 1). Para esto, se probaron distintos protocolos de extracción de ADN y se realizó la amplificación del ADN por PCR con partidores universales de bacterias y arqueas. El protocolo fue validado mediante la secuenciación del ADN amplificado, tanto por técnicas moleculares tradicionales, como por métodos de secuenciación masiva NGS. A continuación, se detallan las indicaciones principales del protocolo diseñado.

A las muestras intestinales de copépodos se les realizó una extracción de ADN mediante el kit de extracción comercial NucleoSpin tissue XS® (Macherey-Nagel) y, posteriormente, se realizó la caracterización taxonómica de las comunidades microbianas asociadas a los copépodos.

Para el estudio por técnicas moleculares tradicionales se amplificó el gen 16S rRNA de los intestinos de copépodos mediante PCR con diferentes partidores universales para bacterias (27F/519R, 358F/907RM y 341F/907R) y arqueas (Ar4F/Ar958R y 344F/915R). Frente a la evidencia de contaminación cruzada con los partidores universales de bacterias, del gen 16S rRNA de los microorganismos con el gen 18S rRNA de los copépodos, se diseñaron y probaron dos nuevos set de partidores para bacterias (448F/925R y 276F/801R). Con los productos PCR del tamaño esperado de banda obtenidos con partidores universales y con los nuevos partidores diseñados para bacterias de las muestras correspondientes a los intestinos de *E. inermis* (norte de Chile) y *R. nasutus* (centro-sur de Chile) se realizaron bibliotecas de clones utilizando el vector pGEM en *E. coli* y el kit de clonación pGEM®-T easy (Promega), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El mismo procedimiento fue realizado con los productos PCR del tamaño esperado de banda obtenidos con partidores universales de

arqueas para la muestra del intestino de *A. tonsa*. Cuatro bibliotecas de clones (equivalentes a 384 clones), con las muestras intestinales de tales copépodos, fueron secuenciadas en MacroGen Inc. (Korea).

Por otro lado, para el estudio mediante técnicas NGS, cuatro muestras intestinales asociadas a los copépodos *C. chilensis* y *C. brachiatus* (norte de Chile), *C. patagoniensis* y *R. nasutus* (centro-sur de Chile) fueron enviadas a secuenciar mediante el método de secuenciación Illumina en un equipo Illumina MiSeq v2 en el Centro de Biotecnología Roy J. Carver (*Roy J. Carver Biotechnology Center*) de la Universidad de Illinois. Dicho análisis consiste en la amplificación y secuenciación de los genes 18S rRNA de eucariontes, 16S rRNA de bacterias y arqueas, y los genes funcionales nitrito reductasa (*NirK*) y óxido nitroso reductasa (*NosZ*). Los análisis de los genes 18S rRNA y 16S rRNA permiten explorar la diversidad genética microbiana (Shyu et al., 2007) componentes de la microbiota intestinal de copépodos, tanto de bacterias, como de arqueas y piceoeucariontes. Mientras que los genes funcionales *NirK* y *NosZ* codifican para enzimas involucradas en las vías de denitrificación, siendo marcadores moleculares de bacterias denitrificantes. El gen *NirK* codifica para una enzima clave que cataliza la reducción de nitrito soluble a la forma gaseosa (óxido nítrico) (Priemé et al., 2002; Henry et al., 2004) y el gen *NosZ* codifica para la enzima óxido nitroso reductasa que cataliza el último paso de la denitrificación, consistente en la reducción del óxido nitroso a nitrógeno molecular (Throbäck et al., 2004), por ser marcadores de denitrificación, entregarán información de este metabolismo asociado al nitrógeno que se podría estar llevando a cabo en el intestino de los copépodos. Este análisis aún se encuentra en proceso, por lo cual los resultados obtenidos se darán a conocer posteriormente en un manuscrito asociado.

### **3.5 Estudio de la microbiota estomacal de eufáusidos**

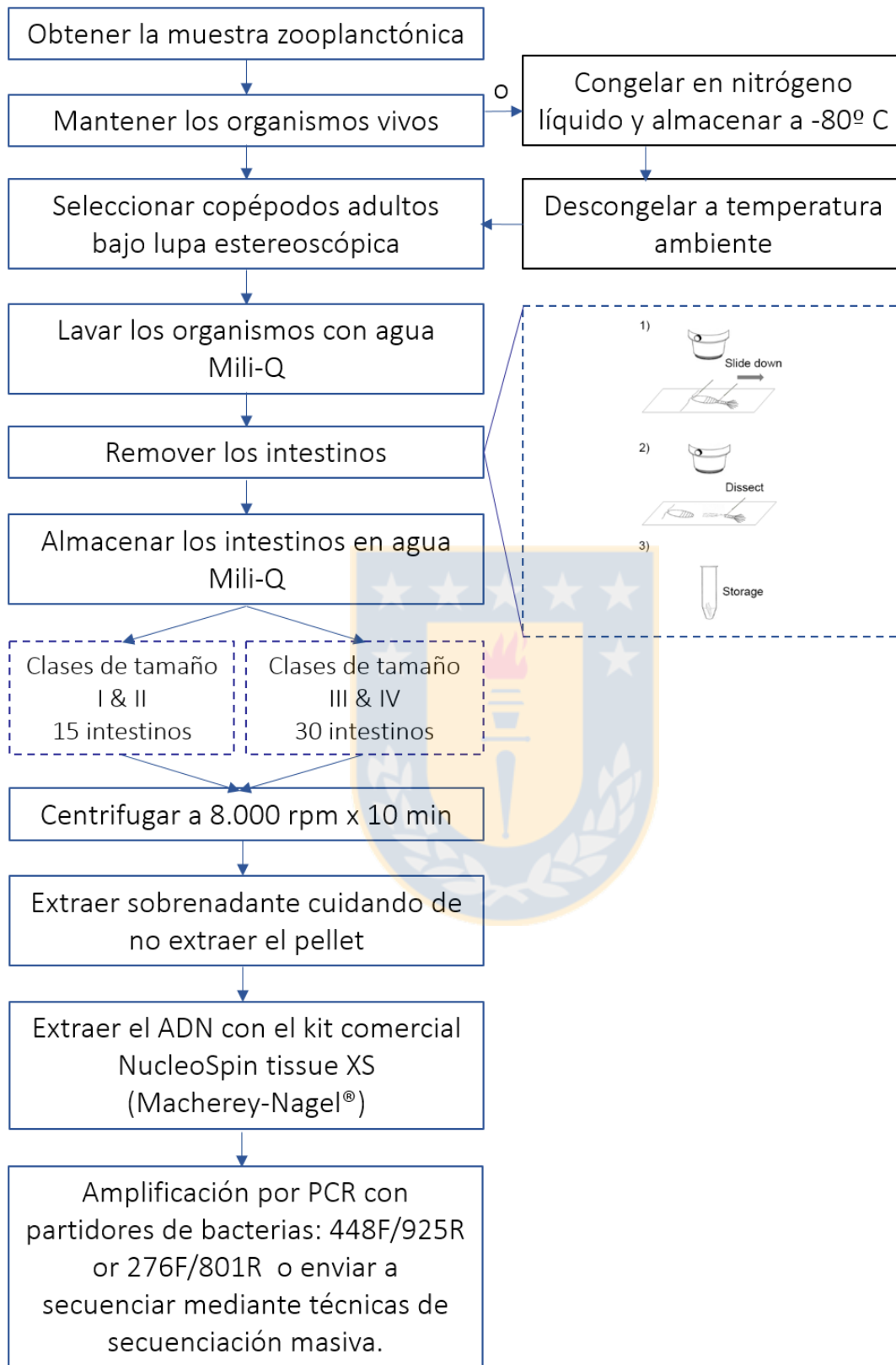
Para la caracterización de la microbiota estomacal de eufáusidos se usó como modelo de estudio la especie *E. mucronata* y se utilizaron dos aproximaciones metodológicas (Fig. 2). La primera consistió en la identificación y obtención de las comunidades microbianas íntegras residentes en el estómago del krill mediante citometría de flujo y *cell-sorting*. Para esto, tres estómagos de krill fueron disectados. Su contenido estomacal fue extraído mecánicamente y resuspendido en 1 mL de agua de mar filtrada (0,2 µm) en tubos de centrifugación (1,5 mL). Posteriormente, las muestras fueron teñidas con SYBR Green I

(tinción que se asocia a la molécula de ADN) y analizadas en un citómetro de flujo BD InFlux™ (Becton Dickinson), el cual fue calibrado con esferas multifluorescentes de 1 µm de diámetro (Spherotech Inc.). Las células se identificaron mediante la dispersión horizontal de la luz (FALS, del inglés *Forward Angle Light Scatter*), las células autofluorescentes fueron excitadas con un láser de 457 nm más un láser de 532 nm y detectada a 692/40 nm, mientras que la fluorescencia de las muestras teñidas con SYBR Green I fue detectada a 530/15 nm usando un láser de 488 nm de excitación. Para cada análisis se utilizaron 100 µL de muestra, en el caso de las células autofluorescentes, y 75 µL de muestra para las células no pigmentadas teñidas con SYBR Green I, utilizando un flujo promedio de 20 µL min<sup>-1</sup> el cual fue monitoreado con un flujómetro de líquidos (Sensirion US). Los eventos fueron registrados con el programa Spigot (Cytopenia).

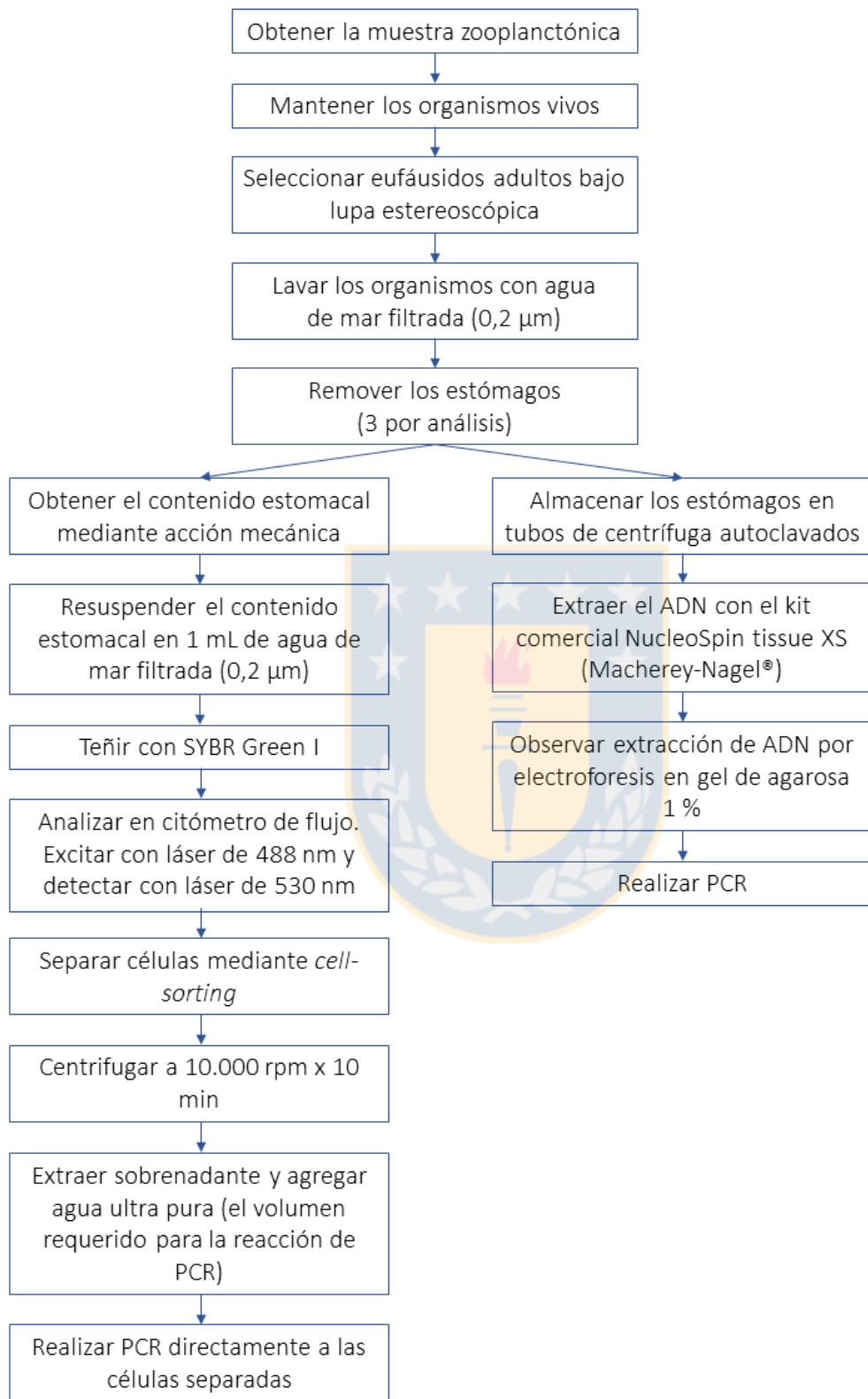
Los eventos positivos para fluorescencia verde (530/20 nm) correspondientes a las células microbianas del estómago del krill, fueron separados. Para esto, el citómetro fue configurado en el modo de separación en dos tubos, la cámara se esterilizó con luz UV y se separaron 2 x 10<sup>4</sup> células por tubo, en tubos estériles (1,5 mL). Las células obtenidas fueron centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min, el sobrenadante fue removido y las células fueron resuspendidas en 16,85 µL de agua ultra pura, libre de nucleasas (IDT technologies) y almacenadas a -20°C hasta los análisis posteriores. El análisis de los datos obtenidos se realizó con el programa FlowJo v7.6.1 (Tree Star Inc.).

La segunda aproximación metodológica consistió en una extracción de ADN directamente a todo el tejido y contenido de tres estómagos de eufáusidos mediante el kit de extracción comercial NucleoSpin Tissue XS® (Macherey-Nagel).

Luego de haber obtenido el ADN comunitario desde los estómagos del krill y a partir de las células íntegras separadas por *cell-sorting*, se amplificó el gen 16S rRNA mediante PCR con los partidores universales para bacterias 358F/907RM. Con los productos de PCR del tamaño esperado de banda se realizaron bibliotecas de clones utilizando el vector pGEM de *E. coli* y el kit de clonación pGEM®-T easy (Promega), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Dos bibliotecas, equivalentes a 192 clones fueron enviadas a secuenciar a Macrogen Inc. (Korea).



**Figura 1.** Principales pasos del protocolo diseñado para el estudio de la microbiota intestinal de copépodos.



**Figura 2.** Principales pasos de las metodologías aplicadas para el estudio de la microbiota estomacal de eupáusidos.



### 3.6 Análisis filogenético

Las secuencias de microorganismos obtenidas de las librerías de clones, tanto de copéodos como de eufáusidos, fueron analizadas y alineadas con el programa SSU-ALIGN, junto a una base de datos de secuencias de bacterias y arqueas de distintos ambientes del Centro Nacional para Información de Biotecnología (NCBI, del inglés *National Center for Biotechnology Information*). Posteriormente, se construyeron árboles filogenéticos con el programa MEGA 7.0, con el método de *Maximum Likelihood*. Para cada set de secuencias se evaluó el modelo de sustitución, que en la mayoría de los casos fue Kimura 2 – *parameter model*. Todos los árboles filogenéticos fueron construidos con un *bootstrap* mayor o igual a 100.



#### 4. RESULTADOS

**Objetivo específico 1:** Implementar y mejorar metodologías para la caracterización exclusiva de la microbiota gastro-intestinal del zooplancton dominante en las zonas de surgencia costera del norte y centro-sur de Chile.

**Objetivo específico 2:** Caracterizar taxonómicamente la microbiota intestinal de copépodos dominantes asociados a la Zona de Mínimo Oxígeno en las zonas de surgencia costera del norte y centro-sur de Chile.

#### Capítulo 1: Revisión de aproximaciones metodológicas para el estudio del microbioma intestinal de copépodos.

Manuscrito enviado a la revista *Marine Biology*

Belén Franco-Cisterna<sup>1,2</sup>, Pamela Hidalgo<sup>2</sup>, Alejandro Murillo<sup>2</sup>, Osvaldo Ulloa<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Estudiante de Magister en Ciencias, con mención Oceanografía, Departamento de Oceanografía, Universidad de Concepción.

<sup>2</sup> Instituto Milenio de Oceanografía, Departamento de Oceanografía, Universidad de Concepción.

Corresponde al autor: pahidalg@udec.cl

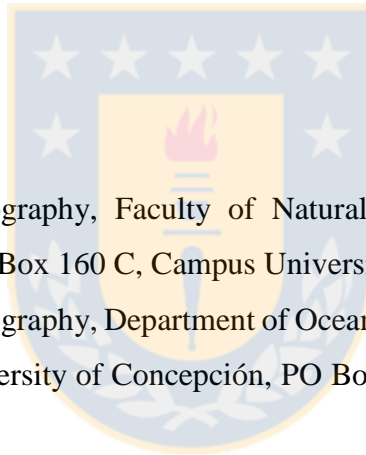
## Resumen

Los copépodos son los animales más abundantes en el océano, representando un componente clave en las tramas tróficas marinas y un nicho específico para los microorganismos. En los últimos años, se han incrementado los estudios del microbioma intestinal, debido a la influencia de los microorganismos en aspectos fisiológicos, metabólicos e inmunológicos del hospedador, y en los ciclos biogeoquímicos globales. Sin embargo, la mayoría de los microbiomas descritos para copépodos no han hecho distinción entre endo- y ecto-biontes. En este trabajo se diseñó un protocolo para el estudio específico del microbioma intestinal de copépodos, que fue testeado en especies dominantes en dos áreas de surgencia costera en el Sistema de Corrientes de Humboldt: Bahía de Mejillones (St-3; 23° 00.2' S, 70°28.2' W) y Bahía de Coliumo (St-18; 36° 30' 46'' S; 73° 7' 38'' W) frente a Chile. Nuestro protocolo incluye una aproximación para la remoción del intestino de los copépodos, el número de intestinos necesario para análisis moleculares, un protocolo de extracción de ADN eficiente para baja cantidad de tejido, y dos nuevas parejas de partidores para la amplificación del gen 16S rRNA de bacterias con mínima contaminación cruzada con otros dominios. Se estudió el microbioma intestinal de los copépodos *Eucalanus inermis*, *Rhincalanus nasutus* y *Acartia tonsa*. Las inferencias filogenéticas mostraron que el intestino de *E. inermis* estuvo habitado principalmente por Gamma-proteobacterias, con dominancia de OTUs afiliados a *Vibrio* sp. El intestino de *R. nasutus* presentó OTUs de Alpha- y Gamma-proteobacterias, principalmente asociados a *Candidatus Pelagibacter* ubique, *Pseudomonas* sp., *Pseudoalteromonas* sp. y *Vibrio* sp. Se detectaron arqueas afiliadas al Grupo Marino II de Euryarchaeas en *A. tonsa*, siendo el primer registro de arqueas como componente del microbioma intestinal de copépodos. Nuestro protocolo permitiría obtener conocimiento en mayor profundidad acerca del microbioma intestinal del zooplancton en diferentes sistemas, al igual que las consecuencias fisiológicas y ambientales de la asociación hospedador - microorganismos simbiotes.

Palabras clave: copépodos, microbioma intestinal, bacterias, arqueas, Zona de Mínimo Oxígeno.

“Revised approaches to the study of copepods gut-microbiome”

Belén Franco-Cisterna<sup>1,2</sup>, Pamela Hidalgo<sup>2</sup>, Alejandro A. Murillo<sup>2</sup>, Osvaldo Ulloa<sup>2</sup>



<sup>1</sup> Master Program in Oceanography, Faculty of Natural and Oceanographic Sciences, University of Concepción, PO Box 160 C, Campus Universitario, Concepción, Chile

<sup>2</sup> Millenium Institute of Oceanography, Department of Oceanography, Faculty of Natural and Oceanographic Sciences, University of Concepción, PO Box 160 C, Campus Universitario, Concepción, Chile

Corresponding author e-mail address: pahidalg@udec.cl

## Abstract

Copepods are the most abundant animals in the ocean, representing a key component in food webs and a specific niche for microbes. In recent years, studies of gut microbiome have increased due to the implications of microorganisms in physiologic and metabolic aspects of the host. However, most of the microbiomes described for copepods have made no distinction between endo- and ectobionts. We designed a protocol for the specific study of the gut microbiome of copepods, which was tested in species from two upwelling areas in the Humboldt Current System: Mejillones Bay (St-3; 23° 00.2' S, 70°28.2' W) and Coliumo Bay (St-18; 36° 30' 46'' S; 73° 7' 38'' W) off Chile. Our protocol includes an approach for the removal of the copepod gut, the number of intestines necessary for molecular analysis, a DNA extraction protocol, and two new primers pair for bacterial 16S rRNA gene amplification with minimum cross-domain contamination. The gut microbiome of *Eucalanus inermis*, *Rhincalanus nasutus* and *Acartia tonsa*, was assessed. Phylogenetic inference showed that *E. inermis* was inhabited by Gamma-proteobacteria, with the dominance of *Vibrio* sp. *R. nasutus*, presented Alpha- and Gamma-proteobacteria, mainly associated with *Candidatus Pelagibacter ubique*, *Pseudomonas* sp., *Pseudoalteromonas* sp. and *Vibrio* sp. Archaea affiliated with Marine Group II of Eryarchaea was detected in *A. tonsa*, being the first report of archaea inside of the copepods gut. Our protocol should allow more in-depth knowledge about the gut microbiome of zooplankton in different systems, as well as of the consequences of the host – microbial symbionts association.

## Introduction

The study of the relationship between zooplankton and microorganisms in the pelagic environment of the ocean has focused, historically, on the indirect link via the microbial food web (Tang et al. 2009). However, the understanding of the direct association between both groups could give information about the functioning of the pelagic environment from an ecologic and biogeochemical point of view. It has been reported that copepods, the principal component of zooplankton community in the Humboldt Current System (HCS) corresponding to an 80% of the zooplankton abundance (Hidalgo et al. 2010; Hidalgo et al.

2012), would play a key role as a niche for the microorganisms associated, facilitating their grow, metabolic activity and increasing the microbial population diversity (Grossart et al. 2010; Dziallas et al. 2013). This, due to the stable and potentially mutualism associations with specific groups of bacteria, which could influence the health state of the copepods, the transfer of biogenic compounds in the marine food web and the biogeochemical cycles (Moisander et al. 2015).

Traditionally, with the exception of Sochard et al. (1979), the researches on copepods microbiome have analyzed the total microbial community, without distinction between the microorganisms associated to the gut, appendices, legs, anal region (Carman and Dobs 1997), and the exoskeleton. It has been shown that the external bacteria of copepods body could be involved in decomposition processes of the exoskeleton in death organisms (Tang et al. 2006). However, the internal bacteria would exert metabolic and physiological functions, influencing over digestion, nutrients assimilation, reproduction, immune response and other defense systems of these organisms (Moisander et al. 2015). Additionally, has been shown that bacterial decomposition of fecal organic matter influences the fluxes of carbon and nitrogen to deeper waters (Delille and Razouls 1994). Nevertheless, despite the importance of the microbial processes associated to the fecal pellets of copepods, and the necessity to investigate this pathway of carbon transfer, the question about the internal or external origin of the bacteria in the pellets it is still open and understudied (Delille and Razouls 1994; Gerdts et al. 2013), limiting our understanding of the alternative pathways in the carbon flux, directly related to the copepod-bacteria interaction.

Given the above, and considering that the gut is the structure with the major abundance of bacteria (Brandt et al. 2010), it is evident the necessity to study the microbiome of specific body parts separately. However, the traditional approaches for assessing the microbiome in copepods has not allowed the discrimination between external an internal communities. The first difficulty for zooplankton ecologists interested in the gut microbiome is that the diversity of microorganisms located in the exterior, gut, fecal pellets, and exoskeleton must be studied with molecular methodologies associated with the field of microbiology, representing an interdisciplinary effort, with problems to standardize protocols suitable for both: sampling and preservation of copepods and their different structures, and the proper quality of the starting material for molecular approaches such as DNA extraction, PCR amplification and

DNA sequencing protocols. The first studies about copepod microbiomes were based on the use of classical microbiological techniques, such as culturing and biochemical assays of bacteria associated to copepods and/or to their fecal pellets (Sochard et al. 1979; Delille and Razouls 1994; Harris et al. 1993; Hansen and Bech 1996) and microscopy (Nagasawa and Nemoto 1988; Peter and Sommaruga 2008). However, the increasing interest to describe and understand the interaction between copepods and their microbiota has resulted in the use of (culture independent) molecular techniques, such as fingerprinting analysis and clone libraries (Tang 2005; Tang et al. 2009; Brandt et al. 2010; Gerdts et al. 2013), and most recently Next Generation Sequencing (NGS) approaches, among them pyrosequencing 454 and Illumina technology (Moisander et al. 2015; Skovgaard et al. 2015; Shoemaker and Moisander et al. 2015).

In this context, a second difficulty emerges when modern molecular techniques are used to obtain a high throughput screening of the taxonomic diversity in a given microbial community (Moller et al. 2007; Peter and Sommaruga 2008): the need to count with high quality, and sometimes high quantity (no less than 20 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ), of genetic material for the desired analysis. The above generates limitations in the study of gut microbiome in copepods, due to their small size (< 6 mm), the dissection of each organism to obtain the gastrointestinal tract is a quite laborious and time consuming task, and this tissue is even smaller and difficult to properly preserve for genetic material extraction.

Given the limitations to study the gut microbiome of marine planktonic copepods, we designed an integrated protocol for obtaining and preparing gastrointestinal samples for molecular analysis purposes. In this protocol we: 1) Present a technique of dissection to obtain a whole gut, establishing a minimal quantity of gastrointestinal tissue needed for a proper DNA extraction per copepod size class; 2) Identify an adequate DNA extraction protocol, and 3) Design two sets of new primers for the amplification by PCR of the gut bacterial community, in order to minimize unspecific amplification of the 18S rRNA gene from copepod DNA. This work is proposed as a methodological guide for researchers in zooplankton ecology.

## **Material and Methods**

## Study area and sampling strategy

The study was carried out at two coastal upwelling areas off Chile, both in the Humboldt Current System (HCS): Mejillones Bay at the north (23°S) and Coliumo Bay at south-central Chile (36°S). Mejillones Bay is located in a very active upwelling system off northern Chile (Marín et al. 2001), with intermittent upwelling throughout the year and high primary productivity at all seasons (Rodríguez et al. 1991). Whereas, the Coliumo Bay is located at Concepción area, that also is considered a very active upwelling system of the HCS, but characterized by a strong seasonal upwelling process, mainly during the spring–summer period (Sobarzo et al. 2007).

The sampling station at Mejillones bay (St-3; 23° 00.2' S, 70°28.2' W) is part of The Antofagasta Time Series (Escribano et al. 2012), while the sampling station at Coliumo bay (St-18; 36° 30' 46'' S; 73° 7' 38'' W) is part of the Concepción Time Series (Oceanography Department of University of Concepción) (Fig. 1).

At each station, zooplankton was obtained from integrated (90 m to surface) samples taken using standard plankton nets WP-2, with a mesh size of 200- $\mu$ m and non-filtering cod ends. Three different preservation methods were tested to storage the zooplankton samples: 1) preservation in ethanol 99% and storage at -20° C; 2) freezing of samples with seawater in liquid nitrogen and storage at -80° C; and 3) a set of samples was kept alive.

## Preparation of copepod samples

In the laboratory, under a SMZ 1000 zoom stereomicroscope (Nikon), adults from the six dominant copepod species in the HCS, were identified and sorted with a plastic pipette (1 or 3 mL) from live samples and with a zooplankton tweezers to preserved samples. The species were *Paracalanus* cf. *indicus*, *Acartia tonsa*, *Centropages brachiatus*, *Calanus chilensis*, *Eucalanus inermis* and *Rhincalanus nasutus* (Fig. 2). The first four species were collected from both study areas (northern and southern-central Chile), whereas *E. inermis* and *R. nasutus*, were collected from Mejillones Bay and Coliumo Bay, respectively (Fig. 3). The species were measured under stereomicroscope and categorized in four size classes based on total body length (Table 1).



## Removal of gut

The adults sorted were cleaned twice with Milli-Q water and placed on glass microscope slides, previously washed with 10% hydrochloric acid and autoclaved. The gut removal of copepods was made under a stereomicroscope (4x-8x), following the next methodology: using a tungsten needle (0.001 mm diameter) the anterior cephalothorax of copepod was held and, simultaneously, another needle with the same characteristics was inserted on first abdominal segment, from where was slid down to extract the abdomen, being careful of removing the whole intestine of the organism (Fig. 4, inset). The guts were dissected from the abdomen and stored in autoclaved cryogenic vials (2 mL) or centrifuge tubes (1.5 mL). A total of 90 guts of *P. cf indicus*; 90 guts of *A. tonsa*; 130 guts of *C. brachiatus*; 162 guts of *C. chilensis*; 75 guts of *R. nasutus* and 60 guts of *E. inermis*, were extracted applying this technique and then stored in different amount, from 1 to 35 guts per tube (Table 1). Twenty-guts samples were preserved in Milli-Q water, whereas 24 samples were preserved in ethanol 99% with the objective to define the minimum amount of intestines required per sample, for each size classes of copepod, and the best preservation medium for subsequent molecular analyses.

## DNA extraction

To probe the effectiveness of copepods gut removal for molecular analysis, we performed five different protocols for DNA extraction. Six samples were extracted with the protocol described by Lopera-Barrero et al. (2008) (Table 1). The protocol consist, briefly, in disrupting the cells with a lysis buffer (50 mM Tris EDTA pH 8.0, 1% SDS and 50 mM NaCl) with proteinase K (10 mg mL<sup>-1</sup>) in an incubation at 55° C overnight, a centrifugation to remove the supernatant, a posterior addition of NaCl (5 M) and isopropanol (100%) for precipitation of the DNA and, finally, a washing of the DNA pellet with ethanol 70% twice and the resuspension of the pellet in 100 µL of TE 1X buffer.

Another set of 23 samples was processed with a modified version of the protocol of Lopera-Barrero et al. (2008) (Table 1), in order to improve the efficiency of extraction. The modifications were as follow: the samples of guts, preserved in 99% ethanol or milli-Q water,

were filtered through a 0.22- $\mu\text{m}$  ester cellulose membrane (Merck Millipore, GSWP02500) with a syringe of 5 mL, which was rinsed three times with milli-Q water to avoid retention of sample in the walls of the syringe. Later, the filters were storage in cryovials of 2 mL and each tube was loaded with 100  $\mu\text{L}$  of zirconium beads (200  $\mu\text{m}$  diameter, OPS Diagnostic LLC), the tubes were then loaded with 500  $\mu\text{L}$  of lysis buffer and 10  $\mu\text{L}$  of proteinase K (10  $\text{mg mL}^{-1}$ ). The reaction mix for each tube was disrupted in a Mini beadbeater homogenizer (Biospec) at medium velocity twice for 30 seconds. Each sample was let to react at 55° C overnight (~16 h) and the next day, after centrifugation at 16,000 rpm during 15 min at 4° C, the supernatant was extracted and trespassed to a clean tube of 1.5 mL, avoiding rests of filter or beads. From this point forward, we follow the same precipitation protocol with NaCl and isopropanol. Finally, the DNA pellet was washed twice with ethanol 80% and resuspended in 25  $\mu\text{L}$  of milli-Q water.

Additionally, other three standardized DNA extraction kits were evaluated; 4 samples were processed with the Wizard SV Genomic Purification System (Promega<sup>®</sup>), 4 samples with the NucleoSpin Tissue Kit (Macherey-Nagel<sup>®</sup>) and 6 samples with the NucleoSpin Tissue XS kit (Macherey-Nagel<sup>®</sup>), following the manufacturer's indications.

### **Visualization and quantification of DNA**

All the extractions were run in 1% agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide and visualized in a UV transilluminator. Also, the samples were measured in a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific) and in a Qubit fluorometer V 1.27 (Invitrogen<sup>®</sup>).

### **DNA amplification**

We tested the quality of the DNA extracted by the Polymerase Chain Reaction (PCR), utilizing five universal primers couples for the Small Subunit (SSU) 16S ribosomal RNA gene (16S rRNA), three sets of primers are directed against the bacterial 16S rRNA and two against the archaeal 16S rRNA (Table 2). The bacterial primers utilized were: 27F/519R, 358F/907RM and 341F/907R, in a PCR reaction mix constituted by; Reaction buffer 5X,  $\text{MgCl}_2$  25 mM, dNTPs 10  $\mu\text{M}$  each and 1-2  $\mu\text{L}$  of DNA sample, completing with Nuclease-

Free water until 25  $\mu$ L of total reaction. The PCR reaction was set up as follow for primers 27F/519R and 358F/907RM: starting denaturation at 95 °C during 5 min, followed by 30 cycles of 94 °C during 30 s, 52 °C during 30 s, 72 °C during 1 min and a final extension of 72 °C during 10 min. For the primers 341F/907R, the same PCR program was used with a different annealing temperature of 55°C.

In the case of archaeal primers Ar4F/Ar958R and 344F/915R, the PCR conditions were as follow: starting denaturation at 95 °C during 5 min, followed by 35 cycles of 95 °C during 1 min, 54 °C during 1 min, 72 °C during 1.5 min and a final extension of 72 °C during 10 min. The PCR products were run in 1% agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide and visualized in a UV transilluminator.

### **Clones Library**

In order to assess the microbial community composition associated to copepod guts, we built a clone library for each set of samples. For this, PCR products from *E. inermis* and *R. nasutus* obtained with primers 358F/907RM were selected for the bacterial clone library, and PCR products from *E. inermis*, *R. nasutus*, *C. chilensis* and *A. tonsa* obtained with primers Ar4F/Ar958R were selected for the archaeal clone library. The cloning of PCR fragments was made in the pGEM<sup>®</sup>-T Easy vector (Promega), following the manufacturer's indications, the transformation process was carried out in the *E. coli* JM109 strain. 96 bacterial and archaeal clones each were obtained and sequenced at Macrogen Inc. (Korea).

### **Design of new primer sets**

Due to the presence of unspecific amplification products for bacterial and archaeal PCRs, and the evidence of co-amplification of the 18S rRNA gene of copepods, we designed two new primers couples targeting the bacterial community associated to copepods gut, based in 175 bacterial sequences previously describe as part of copepods microbiome by Tang et al. (2009), Brandt et al. (2010) and Gerdts et al. (2013). Unfortunately, to our knowledge, there are not sequences described for the archaeal microbiome in copepods to do the same kind of analysis. The new primer sets were designated 448F/925R and 276F/801R (Table 2),

following the coordinates of *E. coli* K12 strain 16S rRNA gene. The PCR reaction and thermal cycles are as presented above for bacteria, with specific changes in the annealing temperature for each primers couple; 448F/925R anneal at 58 °C, whereas 267F/801R anneal at 50 °C. Two new clone libraries were made in the pGEM<sup>®</sup>-T Easy vector (Promega), following the manufacturer's indications, the transformation process was carried out in the *E. coli* JM109 strain. 192 bacterial clones were obtained and sequenced at Macrogen Inc. (Korea). The sequences were deposited in GenBank under the accession numbers KY079099-KY079136.

### **Phylogenetic analysis**

All sequences, obtained for each clone library, were first analyzed with the SSU-ALIGN software package (Nawrocki et al., 2009a). This package contains and uses the Infernal ("INFERENCE of RNA ALignment") software package for generating alignments based on the conserved secondary structure and sequence of SSU rRNA. SSU-ALIGN extend Infernal software to facilitate the analysis of sequences in a large-scale alignments, to search against a nucleic acid sequence databases for homologous RNAs. The output of this analysis is a FASTA file with your query sequences curated and ready for a phylogenetic analysis against a custom (or meaningful) database. Then, the sequences were submitted to a phylogenetic inference, against a custom database of 422 Bacterial sequences and 135 Archaeal sequences from different environments, but mainly selected from the global ocean. The phylogenetic trees were constructed in the MEGA 7.0 software, with the Maximum Likelihood method; the substitution model was evaluated for each set of sequences and is indicated in the legend of each tree. All trees were constructed with a bootstrap  $\geq 100$ .

### **Results**

A total of 44 samples, equivalent to 607 guts from 6 species of copepods, of 4 size classes, were extracted using the dissection method described above. The best method of guts preservation it was the Milli-Q water, from fresh samples, due to the preservation in ethanol

dehydrated and disrupts the guts making the recovery of material, in the form of a viewable pellet, almost impossible. After the DNA extraction, the visualization of it was negative in most of the samples; from the 44 samples only 3 were positive for a DNA band in agarose gel. The extraction protocol with best performance was the NucleoSpin Tissue XS (Macherey-Nagel); since it allowed us to visualize the genetic material in the agarose gel. Although the majority of the samples were not detected in agarose gel, a high percentage (Table 3) of them was amplifiable by PCR, both for Bacteria and Archaea in the six species under study.

Considering the percentage of positive amplifications obtained for each sample (Table 3), we defined the minimal quantity of guts to obtain enough DNA for PCR amplification. For copepods of size classes I (< 1 mm) and II (1-2 mm) were necessary 15 guts per sample, while for copepods of size classes III (2-4 mm) and IV (> 4 mm) were needed 30 guts per sample (Tables 1 and 3). A relation between the size of the copepods and minimal quantity of guts, for PCR amplification, was not observed and probably the structure and composition of gut tissue is more relevant than the size of it to obtain an optimal DNA extraction and positive PCR amplification, therefore, it will depend of the specie of copepod under analysis.

The clone libraries analyzed make evident a cross contamination for the universal primers of Bacterial (358F-907RM) and Archaeal (Ar4F-Ar958R) 16S rRNA gene, with the copepods 18S rRNA gene. One set of 96 samples amplified with the bacterial primers were sequenced, of which only 9 were classified as bacteria and 87 were classified associated to the copepods *E. inermis* and *R. nasutus*. A second set of 96 sequences, amplified with Archaeal primers, resulted in 3 sequences classified as Archaea associated with the gut of *A. tonsa* and 90 sequences associated to the DNA of the copepods. Based on these results, we decided to design a new set of primers (Table 2, see methodology), in order to improve the recovery of bacterial sequences in this mixed sample of DNA. The first positive result with the new primer designed was the obtaining of a single DNA band with the expected size (~500 bp for each primer pair) from this PCR product: 104 clones were obtained with the couple 448F/925R, 68 for *R. nasutus* and 36 for *E. inermis*, of which 101 sequences passed the quality control test and were all classified as bacteria. Whereas, 81 clones were amplified with the couple 276F/801R, 37 for *R. nasutus* and 44 for *E. inermis*, of which 80 sequences

passed the quality control test and were all classified as bacteria. Both primer sets showed to be highly specific targeting and amplifying the bacterial 16S rRNA gene in these DNA samples. Only the unique sequences were selected from both sets and 67 sequences amplified with primers 448F/925R and 59 sequences amplified with primers 276F/801R were merge in one dataset for the definition of Operational Taxonomic Units (OTUs). From the 126 sequences were defined 32 OTUs at 98% of similitude, 19 OTUs for *R. nasutus* and 15 OTUs for *E. inermis*, one sequence representing each OUT was selected and used for phylogenetic analysis.

The phylogenetic trees inferred from the sequence libraries obtained and compared against the custom bacteria and archaea databases showed that: the first bacterial sequences obtained with the universal primers were classified as Alpha- and Gamma-proteobacteria, located in three different branches of the tree (Fig. 5). The first branch is composed be sequences associated to Alphaproteobacteria of the family Rhodobacteraceae, closely related to *Sulfitobacter* sp., from *R. nasutus* gut. In the group of Gamma-proteobacteria, one set of sequences was closely related to the genus *Shewanella* spp., and to genus *Pseudoalteromonas* spp. All the branches for this first analysis were well supported with a bootstrap > 88. Furthermore, we identified, to our knowledge, for the first time a few Archaeal sequences as component of the copepod microbiome, corresponding to two archaeal OTUs. The phylogenetic tree showed the archaeal sequences, inside *A. tonsa*, closely related to marine uncultivated representatives from Marine Group II of Euryarchaea (Fig. 6).

The phylogenetic analysis of the sequences obtained with the new-generated primer sets performed against the same custom bacterial database, accordingly, the 30 OTUs obtained with both set of primers and for the two species of copepods were analyzed against 422 bacterial sequences, recovered from different environments, but mainly representing the oceanic habitat, after a first analysis a more compact tree were constructed excluding the non-informative reference sequences and a final set of 102 reference sequences were used to classified the 30 OTUs (Fig. 7). The phylogenetic inference showed that *R. nasutus* present three OTUs from the Alpha-proteobacteria, two associated to *Candidatus pelagibacter* ubique and one associated to *Candidatus scalindua* sp. The rest of the OTUs from the *R. nasutus* gut correspond to the Gamma-proteobacteria; one OTU associated to *Stenotrophomonas* sp., three OTUs from *Psychrobacter* sp., one OTU from *Colwellia* sp.,



three OTUs from *Pseudomonas* sp., three OTUs from *Pseudoalteromonas* sp. and four OTUs from *Vibrio* sp. On the other hand, *E. inermis* gut presents OTUs only from the Gammaproteobacteria class; two OTUs associated to *Cobetia* sp., one OTU from *Moraxellaceae* sp., one OTU for *Alteromonas macleodii*, three OTUs from *Pseudoalteromonas* sp. and six OTUs associated to *Vibrio* sp.

## Discussion

We designed a protocol for the molecular study of the gut microbiota of copepods, responding to the increasing interest in this topic of the study in zooplankton ecology. Moreover, considering that the current methodologies study the copepods microbiome as a whole, in the absence of specific techniques for differentiating between endo and ectobionts. We used six dominant copepod species of the Eastern Boundary Upwelling System (EBUS) of the Humboldt Current. These copepods are associated with upwelling centers, but have different latitudinal and vertical distribution (Fig. 3). *Paracalanus* cf. *indicus*, *Acartia tonsa*, *Centropages brachiatus* and *Calanus chilensis* dominate the entire zone off Chile and central Peru in terms of abundance and occurrence (Ayón et al. 2008; Hidalgo et al. 2010, 2014; Pino-Pinuer et al. 2014). Whereas *Eucalanus inermis* is very abundant in the coastal area off northern Chile (Hidalgo et al. 2005) and *Rhincalanus nasutus* in the central/southern region of Chile (Hidalgo et al. 2010). In the Humboldt Current System (HCS), the presence of an Oxygen Minimum Zone (OMZ) acts as a physical–chemical barrier to vertical distribution of most aerobic planktonic organisms (Morales et al. 1999; Escribano and Hidalgo 2001) and is considered as an Oxygen Deficient Ecological Barrier (BEDOX) that concentrates the abundance, biomass and diversity of plankton into the oxygenated and food-rich surface water (Donoso et al. 2014). Thus, the vertical distribution pattern of the copepod community is subjected to the presence of a strong oxygen gradient near surface waters, grouping copepods in different strata of the water column (Escribano et al. 2009; Hidalgo et al. 2010). Some abundant species remained in the well-oxygenated upper layer, such as, *P. cf. indicus*, *A. tonsa* and *C. brachiatus* (Escribano et al. 2009; Yañez et al. 2012). Another species display Diel Vertical Migration (DVM) behavior where interact with hypoxic waters, as the copepod *C. chilensis* (Hirche et al. 2014). A third group of copepods has the capacity to enter and

inhabit the OMZ (Fig. 3), where are the copepods *E. inermis* and *R. nasutus* (Castro et al. 1993; Hidalgo et al. 2005; Escribano et al. 2009; Hidalgo et al. 2012).

These species have similar size and belong to the same genus that those dominant copepods in other major EBUS. For example, the California Current System, during upwelling conditions is characterized by low species diversity with only a few dominant species, such as: *Calanus marshallae*, *Pseudocalanus mimus*, *Acartia longiremis* and *Centropages abdominalis*, followed by *Acartia hudsonica*, *Paracalanus parvus* and *Eucalanus californicus* (Peterson et al. 2002; Peterson and Keister 2003; Morgan et al. 2003; Hoff and Peterson 2006). On the other hand, in the Benguela Current System, *Calanus agulhensis* dominates the zooplankton community of the Agulhas Bank and *Centropages brachiatus*, *Calanoides carinatus*, *Paracalanus parvus* and *P. scottii* are dominant on the West Agulhas (Verheye et al. 1992; Hugget et al. 2009). Due to species of the same genera dominate in each upwelling system; the proposed protocol for this specific study on gut microbiome could be applied to these dominant copepods from different EBUS.

The proposed methodology allowed us to identify the microorganisms from the gut microbiota of *E. inermis*, *R. nasutus* and *A. tonsa* in the HCS. However, the use of the universal primers for bacteria (358F-907RM) and archaea (Ar4F-Ar958R) to amplify the 16S rRNA gene, evidenced a cross contamination with the copepods 18S rRNA gene. This issue has been described for other organisms in which bacterial community samples were contaminated with eukaryotic DNA, such as coral animal and its associated microbial communities (Galkiewicz and Kellogg 2008), or human and fish intestinal samples (Huys et al. 2008). Despite this, with the universal bacterial primers we obtained a few sequences associated with Alpha-proteobacteria and Gamma-proteobacteria.

Alpha-proteobacteria were close related to *Sulfitobacter* spp. Bacteria from this genus has been previously reported as part of copepods microbiota in *Calanus finmarchicus* and *Metridia longa* from Arctic (Dziallas et al. 2013), and *Acartia tonsa* from estuarine samples (Tang et al. 2009). Additionally, *Sulfitobacter* spp. also has been found associated with fecal pellets of the copepods *Acartia* spp. and *Paracalanus parvus* in the subtropical coast of Hong Kong (Jing et al. 2012). On the other hand, in Gamma-proteobacteria group, one set of sequences was closely related to *Pseudoalteromonas* spp., which has been previously reported as part of the microbiota of *Acartia* spp., *Centropages* sp. and *Calanus finmarchicus*



in Gulf of Maine (Moisander et al. 2015). As well, we reported sequences associated with *Shewanella* spp.

Furthermore, for the first time we identified archaea as component of the copepod gut microbiome, specifically in the gut of *A. tonsa* that inhabit the oxic layer in the water column. Our sequences are closely related to marine uncultivated representatives from different marine environment and depths, affiliated with Marine Group II of Euryarchaea, but have not been identified as symbionts in other organisms. Archaea has been searched previously by Dziallas et al. (2013), but without positive results, probably due to the bias of universal primers and interferences with the copepod DNA.

Due to cross-kingdom amplification problems, we designed two new primer pairs for bacterial 16S rRNA gene amplification. The new primers (448F/925R and 276F/801R) allowed us to obtain a better knowledge of the bacterial community of the gut microbiota from *E. inermis* and *R. nasutus*.

Most of OTUs from *R. nasutus* and *E. inermis*, were classified as *Vibrio* sp. These bacteria have been widely reported as symbionts of copepod; as component of its gut microbiota (Sochard et al. 1979), but mainly like epibionts attached to the surfaces of lives copepods. Probably, because *Vibrio* species elaborate extracellular chitinase (Huq et al. 1983, Carman and Dobbs 1997; Tang et al. 2009). Some anaerobic species of *Vibrio* are well known as component of gut microbiota in other organisms, like the bovine rumen symbionts *V. succinogenes* (Kafkewitz and Goodman 1974; Reddy and Peck 1978).

*R. nasutus* and *E. inermis* presented three OTUs associated with *Pseudoalteromonas* sp. These results were similar to that described by Moisander et al. (2015) who found that the most prominent stable component of the microbiome of *Acartia longiremis*, *Centropages hamatus*, and *Calanus finmarchicus* included several taxa within Gamma-proteobacteria, with *Pseudoalteromonas* spp. especially abundant across copepod species. Probably, because *Pseudoalteromonas* spp. display anti-bacterial, bacteriolytic, agarolytic and algicidal activities, which favors its association with marine eukaryotes (Holmström and Kjelleberg 1999). Additionally, facultative anaerobes like *P. tunicata* are symbionts in other marine eukaryotic organisms, e.g. tunicates and macroalgae (Holmstrom et al. 1998; Rao et al. 2005). Other bacteria identified exclusively in *R. nasutus* are three OTUs from *Psychrobacter* sp., these bacteria are strictly aerobic and chemoheterotrophic, with organic acids and amino

acids as carbon sources (Bowman 2006), and has been described as marine sponge-associated bacterium (Li et al. 2008). Other bacteria with different potential metabolic capabilities identified in gut microbiota from *R. nasutus*, were one OTU associated to *Stenotrophomonas* sp., a nitrate reductive bacterium (Palleroni and Bradbury 1993); one OTU from *Colwellia* sp., a facultative anaerobe (Bowman et al. 1998); and three OTUs from *Pseudomonas* sp., coinciding with Sochard et al. (1979) who reported *Pseudomonas* sp. in the gut of pelagic copepods, but like the most abundant component of their microbiome. Additionally, *R. nasutus* presented three OTUs from Alpha-proteobacteria. Two associated to *Candidatus pelagibacter ubique*, which are chemoheterotrophic marine bacteria of the SAR11 clade with a large impact on the cycling of carbon and other important nutrients in the oceans, due to are adjusted quickly to fluctuations in the availability of nutrients (Sowell et al. 2008). The other alpha-proteobacteria was the OTU associated to *Candidatus Scalindua* sp. an enriched marine anammox bacterium, characteristics from marine OMZ (Schmid et al. 2003; Woebken et al. 2008).

On the other hand, the exclusive bacteria identified in *E. inermis* were two OTUs associated to *Cobetia marina*, characterized as colonizer of surfaces in the marine environment (Maréchal et al. 2004) and one OTU from Uncultured *Moraxellaceae* bacterium. Bacteria within *Moraxellaceae* family are widely distributed in diverse environments (Song et al. 2008) and some members of this family are components from Adélie penguin guano microbiota (Zdanowski et al. 2004).

The last OTU identified in *E. inermis* was *Alteromonas macleodii*, a deep-sea, aerobic, mesophilic and heterotrophic bacterium isolated from hydrothermal vent (Ragueneas et al. 1996; Ivars-Martinez et al. 2008). *Alteromonas* sp. also has been reported as symbionts of marine crustacean embryos and ascidian (Gil-Turnes et al. 1989; Diarey et al. 2014).

The presence of aerobic and anaerobic bacteria in copepods gut could be explained by their localization in different regions of the intestine, with different oxygen conditions. Tang et al. (2011) defined three regions in copepods gut according to their chemical conditions: i) the cephalosome region, from the oral opening to the end of the cephalosome segments, ii) the metasome region, across the metasoma segments, and iii) the urosome region, within urosome segments ending in the anal opening. These regions have different oxygen concentrations in which central metasome present anoxic conditions and urosome is suboxic.

Although oxygen conditions of the cephalosome and upper metasome regions remained unknown (Tang et al. 2011), Glud et al. (2015) documented anoxia in pellets passing through the copepod guts (unpublished data), suggesting that both, cephalosome and upper metasoma, are anoxic. Thus, anaerobic bacteria could be located in the anoxic regions and aerobic bacteria could be located in urosome, with more oxygenated or suboxic conditions, or be transient bacteria.

From an environmental point of view, *R. nasutus* and *E. inermis*, both inhabit the pelagic environment in association with OMZ. In this zone, the major group of bacteria in order of abundance is the phylum Proteobacteria. Specifically, anoxic waters are often dominated for Gamma-proteobacteria, and dysoxic waters contain high numbers of bacteria affiliated with this class (Ulloa et al. 2013). Particularly, in the OMZ off Chile, unclassified Gamma-proteobacteria are the most abundant microorganisms (Stevens and Ulloa 2008) and, according to our results, *Candidatus pelagibacter ubique*, *Candidatus scalindua* sp. (gamma-proteobacteria) and *Sulfitobacter* spp. (alpha-proteobacteria) are components shared between copepods gut microbiota and water column with low oxygen.

On the other hand, has been reported that an ambient with low oxygen may increase the anoxia inside the gut of dead copepods (carcasses) (Glud et al. 2015). Therefore, an environment like OMZ could influence the oxygen conditions inside the gut of live copepods and, to a lesser extent, the presence of certain bacterial groups as component of its microbiome (Tang et al. 2009).

However, gut communities would be different from the environment, given that the temperature, pH and other physicochemical parameters are more constrained inside the gut (Ley et al. 2008). In that sense, according to our results and to other recent studies, copepods could harbor a unique microbiome with associations potentially mutualistic between copepods and microorganisms and not habitat specific (Dziallas et al. 2013; Moisander et al. 2015; Shoemaker and Moisander 2015). Nevertheless, as most of the microbiomes described for copepods have made no distinction whether the detected bacteria are endo- or ectobionts on the copepods, is fundamental the development of specific methodologies, able to answer different questions about copepods gut microbiome, exclusively. In this sense, our protocol for the study of the copepods gut microbiome is presented as a tool that will allow researchers to: 1) select the number of copepod intestines necessary for molecular analysis according to

copepod size; 2) have an efficient DNA extraction protocol for little tissue; and 3) apply optimal primers for bacterial 16S rRNA gene amplification without cross-kingdom contamination; in order to studying the specific microbiome of the intestines of the copepods.

## **Conclusion**

This study contributed a detailed insights of the whole bacterial and archaeal community of the gut of different marine copepods. Our results suggest that the gut microbiome of copepods has a common component between organisms of different environments and a specie-specific component, probably influenced by the environment and the life history of the host. Our revised protocol should allow more in-depth knowledge about the gut microbiome of copepods in different systems, as well as of the physiological and environmental consequences of the host – microbial symbionts association. Finally, this protocol is a tool guide for researchers in zooplankton ecology.

## **Compliance with ethical standards**

Conflict of interest: Authors declare that has no conflict of interest.

Human and animal rights: all animals have been sampled and/or treated according to the international, national, and/or institutional guidelines.

## **Acknowledgments**

This study was funded by Fondecyt 1161483, CONICYT Chile-USA 2012-0006 projects and the Scholarships of University of Concepcion Academic Excellence, CONICYT-PCHA/Magister Nacional/2014-22141263 (B. Franco) and Instituto Milenio de Oceanografía/Postgrado).The authors thank to Guillermo Feliú for his collaboration in the treatment of the copepod's gut and to the crew of Kay-Kay II (Marine Biology Station, Dichato, Universidad de Concepción) and Marlyn (Juan Menares, Mejillones). This study is a contribution of the Instituto Milenio de Oceanografía (IC 120019 grant).

## References

- Ayón P, Criales-Hernandez MI, Schwamborn R, Hirche HJ (2008) Zooplankton research off Peru: a review. *Progr Oceanogr* 79(2): 238-255.
- Bowman JP, Gosink JJ, McCammon SA, Lewis TE, Nichols DS, Nichols PD, Skerratt JH, Staley JT, McMeekin TA (1998) *Colwellia demingiae* sp. nov., *Colwellia hornerae* sp. nov., *Colwellia rossensis* sp. nov. and *Colwellia psychrotropica* sp. nov.: psychrophilic Antarctic species with the ability to synthesize docosahexaenoic acid (22:  $\omega$ 63). *Int J Syst Evol Microbiol* 48(4): 1171-1180.
- Bowman, JP (2006). The genus *Psychrobacter*. In *The prokaryotes* (pp. 920-930). Springer New York.
- Brandt P, Gerdt G, Boersma M (2010) Comparison of different DNA-extraction techniques to investigate the bacterial community of marine copepods. *Helgol Mar Res* 64: 331-342.
- Carman K, Dobbs F (1997) Epibiotic Microorganism on Copepods and Other Marine Crustaceans. *Microscopy Res Technique* 37: 116-135.
- Castro LR, Bernal PA, Troncoso VA (1993) Coastal intrusion of copepods: mechanisms and consequences on the population biology of *Rhincalanus nasutus*. *J Plankton Res* 15(5): 501-515.
- Delille D, Razouls S (1994). Community structures of heterotrophic bacteria of copepod fecal pellets. *J Plankton Res* 16(6): 603-615.
- DeLong EF (1992) Archaea in coastal marine environments. *Proc Natl Acad Sci* 89(12): 5685-5689.
- Donoso K, Escribano R (2014). Mass-specific respiration of mesozooplankton and its role in the maintenance of an oxygen-deficient ecological barrier (BEDOX) in the upwelling zone off Chile upon presence of a shallow oxygen minimum zone. *J Mar Syst* 129: 166-177.
- Dziallas C, Grossart H, Tang KW, Nielsen TG (2013) Distinct Communities of Free-Living and Copepod-Associated Microorganism along a Salinity Gradient in Godthabsjord, West Greenland. *Artic, Antarctic, and Alpine Res* 45(4): 1 – 10.
- Escribano R, Hidalgo P (2001) Circulación inducida por el viento en Bahía de Antofagasta, norte de Chile (23 S). *Rev biol mar oceanogr* 36(1): 43-60.

- Escribano R, Marin VH, Hidalgo P (2001) The influence of coastal upwelling on the distribution of *Calanus chilensis* in the Mejillones Peninsula (northern Chile): implications for its population dynamics. *Hydrobiologia*, 453(1), 143-151.
- Escribano R, Hidalgo P, Krautz C (2009) Zooplankton associated with the oxygen minimum zone system in the northern upwelling region of Chile during March 2000. *Deep-Sea Res. II*, 56: 1083-1094
- Escribano R, Hidalgo P, Fuentes M, Donoso K (2012) Zooplankton time series in the coastal zone off Chile: Variation in upwelling and responses of the copepod community. *Progr Oceanogr*. doi: 10.1016/j.pocean.2011.11.006
- Galkiewicz JP, Kellogg CA (2008) Cross-kingdom amplification using bacteria-specific primers: complications for studies of coral microbial ecology. *Appl environ microbiol* 74(24): 7828-7831.
- Gerdts G, Brandt P, Kreisel K, Boersma M, Schoo KL, Wichels A (2013) The microbiome of North Sea copepods. *Helgol Mar Res* 67(4): 757.
- Gil-Turnes MS, Hay ME, Fenical W (1989) Symbiotic marine bacteria chemically defend crustacean embryos from a pathogenic fungus. *Science (Washington)* 246(4926): 116-118.
- Glud RN, Grossart HP, Larsen M, Tang KW, Arendt KE, Rysgaard, S, Thandrup B, Gissel Nielsen, T. (2015) Copepod carcasses as microbial hot spots for pelagic denitrification. *Limnol Oceanogr* 60(6): 2026-2036.
- Grossart HP, Dziallas C, Leunert F, Tang KW (2010) Bacteria dispersal by hitchhiking on zooplankton. *Proc Natl Acad Sci* 107(26): 11959-11964.
- Hansen B, Bech G (1996) Bacteria associated with a marine planktonic copepod in culture. I. Bacterial genera in seawater, body surface, intestines and fecal pellets and succession during fecal pellet degradation. *J Plankton Res* 18(2): 257-273.
- Harris JM (1993) The presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: a synthesis. *Microb. Ecol.*, 25: 195-231.
- Hershberger KL, Barns SM, Reysenbach AL, Dawson SC, Pace NR (1996) Wide diversity of Crenarchaeota. *Nature* 384(6608): 420.
- Hidalgo P, Escribano R, Morales M (2005) Ontogenetic vertical distribution and diel migration of the copepod *Eucalanus inermis* in the oxygen minimum zone off northern Chile (20-21° S). *J Plankton Res* 27(6): 519-529.



- Hidalgo P, Escribano R, Vergara O, Jorquera E, Donoso K, Mendoza M (2010) Patterns of copepod diversity in the Chilean coastal upwelling system. *Deep-Sea Res II*, 57: 2089 – 2097.
- Hidalgo P, Ferrari F, Yáñez S, Pino P, Escribano R (2012) Development of *Rhincalanus nasutus* (Giesbrecht, 1888) (Copepoda, Rhincalanidae) from the Humboldt Current System. *Crustaceana* 85(9): 1025 - 1053.
- Hirche HJ, Barz K, Ayon P, Schulz J (2014) High resolution vertical distribution of the copepod *Calanus chilensis* in relation to the shallow oxygen minimum zone off northern Peru using LOKI, a new plankton imaging system. *Deep Sea Res I* 88, 63-73.
- Hoff RC, Peterson WT (2006) Copepod biodiversity as an indicator of changes in ocean and climate conditions of the northern California current system. *Limnol Oceanogr* 51: 2607-2620.
- Holmström C, James S, Neilan BA, White DC, Kjelleberg S (1998) *Pseudoalteromonas tunicata* sp. nov., a bacterium that produces antifouling agents. *Int J Syst Evol Microbiol* 48(4): 1205-1212.
- Holmström C, Kjelleberg S (1999) Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. *FEMS microbiol ecol* 30(4): 285-293.
- Huggett J, Verheye H, Escribano R, Fairweather T (2009) Copepod biomass, size composition and production in the Southern Benguela: Spatio-temporal patterns of variation, and comparison with other eastern boundary upwelling systems. *Progr Oceanogr* 83(1): 197-207.
- Huq A, Small EB, West PA, Huq MI, Rahman R, Colwell R. (1983) Ecological relationships between *Vibrio cholerae* and planktonic crustacean copepods. *Appl Environ Microbiol* 45(1): 275-283.
- Huys G, Vanhoutte T, Joossens M, Mahious AS, De Brandt E, Vermeire S, Swings J (2008) Coamplification of eukaryotic DNA with 16S rRNA gene-based PCR primers: possible consequences for population fingerprinting of complex microbial communities. *Curr microbiol* 56(6): 553-557.
- Ivars-Martinez E, Martin-Cuadrado AB, D'Auria G, Mira A, Ferriera S, Johnson J, Friedman R, Rodriguez-Valera F. (2008) Comparative genomics of two ecotypes of the marine

planktonic copiotroph *Alteromonas macleodii* suggests alternative lifestyles associated with different kinds of particulate organic matter. *ISME J* 2(12): 1194-1212.

Jing H, Shek L, Yung W, Jin X, Liu H (2012) Dynamics of bacterial community composition during degradation of copepod fecal pellets. *J Plankton Res*, fbs043.

Kafkewitz D, Goodman D (1974) L-Asparaginase production by the rumen anaerobe *Vibrio succinogenes*. *Appl microbiol* 27(1): 206-209.

Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:111-120.

Lane DJ. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* (Stackebrandt E & Goodfellow M, eds), pp. 115–147. Wiley, New York.

Li H, Lee BC, Kim TS, Bae KS, Hong JK, Choi SH, Bao B, Jung JH (2008) Bioactive cyclic dipeptides from a marine sponge-associated bacterium, *Psychrobacter* sp. *Biomol Ther* 16(4): 356-363.

Lopera-Barrero NM, Povh JA, Ribeiro RP, Gomes PC, Jacometo CB, Silva Lopes TD (2008) Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con cloruro de sodio. *Ciencia e investigación agraria* 35(1): 77-86.

Maréchal JP, Culioli G, Hellio C, Thomas-Guyon H, Callow ME, Clare AS, Ortalo-Magné A (2004) Seasonal variation in antifouling activity of crude extracts of the brown alga *Bifurcaria bifurcata* (Cystoseiraceae) against cyprids of *Balanus amphitrite* and the marine bacteria *Cobetia marina* and *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *J Exp Mar Biol Ecol* 313(1): 47-62.

Moisander PH, Sexton AD, Daley MC (2015) Stable Associations Masked by Temporal Variability in the Marine Copepod Microbiome. *PloS one*, 10(9), e0138967.

Møller EF, Riemann L, Søndergaard M (2007) Bacteria associated with copepods: abundance, activity and community composition. *Aquatic Microbial Ecol* 47(1): 99-106.

Morales CE (1999) Carbon and nitrogen fluxes in the oceans: the contribution by zooplankton migrants to active transport in the North Atlantic during the Joint Global Ocean Flux Study. *J Plankton Res* 21: 1799-1808.

Morgan CA, Peterson WT, Emmett RL (2003) Onshore-offshore variations in copepod community structure off the Oregon coast during the summer upwelling season. *Mar Ecol Prog Ser* 249: 223-236.



- Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden, AG (1993) Profiling of complex microbial populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified genes encoding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59: 695–700.
- Muyzer G, Brinkhoff T, Nuber U, Santegoeds C, Schafer H, Wawer C (1998) Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) in Microbial Ecology. In Kowalchuk GA, Bruijn FJ, De Head IM, Akkermans ADL, Elsas JD, Eds. *Molecular Microbial Ecology Manual*. Berlin: Springer, 743–770.
- Nagasawa S, Nemoto T (1988) Presence of bacteria in guts of marine crustaceans and on their fecal pellets. *J Plankton Res* 10: 559-569
- Palleroni NJ, Bradbury JF (1993) *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980). *Int J Syst Evol Microbiol* 43(3): 606-609.
- Peter H, Sommaruga R (2008) An evaluation of methods to study the gut bacterial community composition of freshwater zooplankton. *J Plankton Res* 30(9): 997-1006.
- Peterson W, Gomez-Gutierrez J, Morgan CA (2002) Cross-shelf variation in calanoid copepod production during summer 1996 off the Oregon coast, USA. *Marine Biology* 141(2): 353-365.
- Peterson WT, Keister JE (2003) Interannual variability in copepod community composition at a coastal station in the northern California Current: a multivariate approach. *Deep Sea Res II* 50(14): 2499-2517.
- Pino-Pinuer P, Escribano R, Hidalgo P, Riquelme-Bugueño R, Schneider W (2014) Copepod community response to variable upwelling conditions off central-southern Chile during 2002-2004 and 2010-2012. *Mar Ecol Progr Ser* 515: 83-95.
- Raguene G, Pignet P, Gauthier G, Peres A, Christen R, Rougeaux H, Barbier G, Guezennec J (1996) Description of a new polymer-secreting bacterium from a deep-sea hydrothermal vent, *Alteromonas macleodii* subsp. *fijiensis*, and preliminary characterization of the polymer. *Appl Environ Microbiol* 62(1): 67-73.
- Rao D, Webb JS, Kjelleberg S (2005) Competitive interactions in mixed-species biofilms containing the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Appl Environ Microbiol* 71(4): 1729-1736.

Raskin L, Stromley JM, Rittmann BE, Stahl DA (1994) Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Appl Environ Microbiol* 60(4): 1232-1240.

Reddy CA, Peck HD (1978) Electron transport phosphorylation coupled to fumarate reduction by H<sub>2</sub>-and Mg<sup>2+</sup>-dependent adenosine triphosphatase activity in extracts of the rumen anaerobe *Vibrio succinogenes*. *J bacteriol* 134(3): 982-991.

Rodriguez L, Marín V, Farías M, Oyarce E (1991) Identification of an upwelling zone by remote sensing and in situ measurements, Mejillones del Sur Bay (Antofagasta-Chile). *Sci Mar*

Shoemaker KM, Moisander PH (2015) Microbial diversity associated with copepods in the North Atlantic subtropical gyre. *FEMS microbiol ecol* 91(7): fiv064.

Skovgaard A, Castro-Mejia JL, Hansen LH, Nielsen DS (2015) Host-Specific and pH-Dependent Microbiomes of Copepods in an Extensive Rearing System. *PloS one*, 10(7): e0132516.

Sobarzo M, Bravo L, Donoso D, Garcés-Vargas J, Schneider W (2007) Coastal upwelling and seasonal cycles that influence the water column over the continental shelf off central Chile. *Progr Oceanogr* 75(3): 363-382.

Sochard MR, Wilson DF, Austin B, Colwell RR (1979) Bacteria Associated with the surface and gut of marine copepods. *Appl environ microbiol* 37(4): 750-759.

Song J, Choo YJ, Cho JC (2008) *Perlucidibaca piscinae* gen. nov., sp. nov., a freshwater bacterium belonging to the family Moraxellaceae. *Int J Syst Evol Microbiol* 58(1): 97-102.

Sowell SM, Norbeck AD, Lipton MS, Nicora CD, Callister SJ, Smith RD, Barofsky DF, Giovannoni SJ (2008). Proteomic analysis of stationary phase in the marine bacterium “*Candidatus Pelagibacter ubique*”. *Appl environ microbiol* 74(13): 4091-4100.

Stevens H, Ulloa O (2008) Bacterial diversity in the oxygen minimum zone of the eastern tropical South Pacific. *Environ Microbiol* 10 (5): 1244-1259.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30: 2725-2729.

Tang K (2005) Copepods as microbial hotspots in the ocean: effects of host feeding activities on attached bacteria. *Aquat Microb Ecol* 38: 31-40

- Tang KW, Freund CS, Schweitzer CL (2006) Occurrence of copepod carcasses in the lower Chesapeake Bay and their decomposition by ambient microbes. *Estuar, Coast Shelf Sci* 68: 499–508.
- Tang K, Dziallas C, Hutalle-Schmelzer K, Grossart H (2009) Effects of food on bacterial community composition associated with the copepod *Acartia tonsa* Dana. *Biology letters*, doi: 10.1098/rsbl.2009.0076
- Tang KW, Glud RN, Glud A, Rysgaard S, Nielsen TG (2011). Copepod guts as biogeochemical hotspots in the sea: Evidence from microelectrode profiling of *Calanus* spp. *Limnol Oceanogr* 56(2): 666-672.
- Turner S, Pryer KM, Miao VP, Palmer JD (1999) Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J Eukaryot Microbiol* 46(4): 327-338.
- Ulloa O, Wright JJ, Belmar L, Hallam SJ (2013) Pelagic Oxygen Minimum Zone Microbial Communities. In: Rosenberg E, Delong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F. (Eds.). *The Prokaryotes*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 528.
- Verheye HM, Hutchings L, Huggett JA, Painting SJ (1992) Mesozooplankton dynamics in the Benguela ecosystem, with emphasis on the herbivorous copepods. *South African J Mar Sci* 12(1): 561-584.
- Woebken D, Lam P, Kuypers MM, Naqvi S, Kartal B, Strous M, Jetten MSM, Fuchs BM, Amann R (2008) A microdiversity study of anammox bacteria reveals a novel *Candidatus Scalindua* phylotype in marine oxygen minimum zones. *Environ Microb* 10(11): 3106-3119.
- Yañez S, Hidalgo P, Escribano R (2012) Mortalidad natural de *Paracalanus indicus* (Copepoda, Calanoida) en áreas de surgencia asociada a la Zona de Mínimo Oxígeno en el Sistema de Corrientes de Humboldt: implicancias en el transporte pasivo del flujo de carbono. *Rev Biol Mar Oceanogr* 47(2): 295 – 310.
- Zdanowski MK, Weglenski P, Golik P, Sasin JM, Borsuk P, Zmuda MJ, Stankovic A (2004) Bacterial diversity in Adélie penguin, *Pygoscelis adeliae*, guano: molecular and morpho-physiological approaches. *FEMS microbial ecol* 50(3): 163-173.

## Tables and Figures legends

Table 1: Size classes defined for the copepods *Paracalanus cf indicus*, *Acartia tonsa*, *Centropages brachiatus*, *Calanus chilensis*, *Rhincalanus nasutus* and *Eucalanus inermis*, and metadata of sampling areas, dates, season, number of guts utilized for each extraction, method of DNA extraction and results. In DNA extraction protocol each abbreviation means: LB: Lopera-Barrero, 2008; LBM: Lopera-Barrero Modified; NST: NucleoSpin Tissue®; NSTX: NucleoSpin Tissue XS®; WSV: Wizard SV Genomic DNA®.

Table 2: Summary of the primer sets utilized during this study.

Table 3: PCR results for each sample with different primer couples. Symbols means: \* Expected band; \*\* Expected and unspecific bands; - Negative; / No PCR.

Figure 1: Areas of sampling in the Humboldt Current System, off coast of Chile. A) Indicates the South American continent and location of Chile, facing the Pacific Ocean. B) Shows the localization of Mejillones bay, in the north part of the country, and the sampling station 3. C) Shows the localization of Coliumo bay, in the center-south of Chile, and the sampling station 18.

Figure 2: Morphology and body size of the copepods that dominates the Humboldt Current System and were utilized in this study. A) *Paracalanus cf. indicus*, B) *Acartia tonsa*, C) *Centropages brachiatus*, D) *Calanus chilensis*, E) *Rhincalanus nasutus* and F) *Eucalanus inermis*. For each copepod the morphology and size of the gut is shown as inset, the scale bar for A, B, C and D = 0.2 mm and for E and F = 1 mm. The guts were extracted with the technique described in this work.

Figure 3: Latitudinal and vertical distribution of the dominant copepods: *Paracalanus cf. indicus*, *Centropages brachiatus*, *Acartia tonsa*, *Calanus chilensis*, *Eucalanus inermis* and *Rhincalanus nasutus* in the Humboldt Current System and were utilized in this study. Arrows

indicate Diel Vertical Migration behavior and blue dotted lines indicate dissolved oxygen vertical profiles.

Figure 4: Short protocol derived from the results of this work. Summary of the steps that led us to a successful result. For specific development of each step, please see Materials and Methods.

Figure 5: Phylogenetic analysis for Bacterial 16S rRNA sequences obtained with universal primers. The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Kimura 2-parameter model (Kimura 1980). The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches (bootstrap). A discrete Gamma distribution was used to model evolutionary rate differences among sites (5 categories (+G, parameter = 0.5922)). The rate variation model allowed for some sites to be evolutionarily invariable ([+I], 12.3290% sites). The analysis involved 432 nucleotide sequences. In A) and B) are shown subtrees of the complete tree, where the sequences of interest are located. The black dots denoted collapsed branches that are formed by several sequences, where the taxonomic level is indicated (Class, Family or Genus), in order to reduce the tree size. Evolutionary analyses were conducted in MEGA 6 (Tamura et al. 2013).

Figure 6: Phylogenetic analysis for Archaeal 16S rRNA sequences obtained with universal primers. The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Kimura 2-parameter model (Kimura 1980). A discrete Gamma distribution was used to model evolutionary rate differences among sites (5 categories (+G, parameter = 0.6482)). The rate variation model allowed for some sites to be evolutionarily invariable ([+I], 17.2932% sites). In the figure is shown a subtree of the complete tree, where the sequences of interest are located. The analysis involved a total of 138 nucleotide sequences. Evolutionary analyses were conducted in MEGA 6 (Tamura et al. 2013).

Figure 7: Phylogenetic analysis for Bacterial 16S rRNA sequences, obtained with the new primer sets 448F/925R and 276F/801R. The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Kimura 2-parameter model (Kimura 1980). A

discrete Gamma distribution was used to model evolutionary rate differences among sites (5 categories (+G, parameter = 0.7535)). The analysis involved a total of 124 nucleotide sequences. The sequences derived from *Rhincalanus nasutus* are depicted in red and those derived from *Eucalanus inermis* are depicted in blue. Evolutionary analyses were conducted in MEGA 6 (Tamura et al. 2013).



Table 1. Size classes defined for the copepod species under study and metadata of sampling areas, dates, season, number of guts utilized for each extraction, method of extraction and results. In DNA extraction protocol each abbreviation means: LB: Lopera-Barrero, 2008; LBM: Lopera-Barrero Modified; NST: NucleoSpin Tissue®; NSTX: NucleoSpin Tissue XS®; WSV: Wizard SV Genomic DNA®.

Size classes	Samples ID #	Species	Study area	Data	Season	Number of gut	Replicates	DNA extraction protocol	Genomic DNA presence
I (< 1 mm)	1	<i>P. cf indicus</i>	Coliumo	2015-05-05	Fall	15	R1	LBM	Negative
	2	<i>P. cf indicus</i>	Coliumo	2015-05-05	Fall	15	R2	LBM	Negative
	3	<i>P. cf indicus</i>	Mejillones	2015-05-12	Fall	30	R1	LBM	Negative
	4	<i>P. cf indicus</i>	Mejillones	2015-05-12	Fall	30	R2	LBM	Negative
II (1 - 2 mm)	5	<i>A. tonsa</i>	Coliumo	2015-04-28	Fall	10	R1	LBM	Negative
	6	<i>A. tonsa</i>	Coliumo	2015-04-28	Fall	10	R2	LBM	Negative
	7	<i>A. tonsa</i>	Mejillones	2015-05-12	Fall	20	R1	LBM	Negative
	8	<i>A. tonsa</i>	Mejillones	2015-05-12	Fall	20	R2	LBM	Negative
	9	<i>A. tonsa</i>	Coliumo	2015-09-01	Late winter	5	R1	LBM	Negative
	10	<i>A. tonsa</i>	Coliumo	2015-09-01	Late winter	5	R2	LBM	Negative
	11	<i>A. tonsa</i>	Coliumo	2015-09-01	Late winter	10	R1	LBM	Negative
	13	<i>A. tonsa</i>	Coliumo	2015-09-01	Late winter	10	R2	LBM	Negative
	III (2 - 4 mm)	14	<i>C. brachiatus</i>	Mejillones	2015-01-15	Summer	1	R1	LB
15		<i>C. brachiatus</i>	Mejillones	2015-01-17	Summer	20	R1	LB	Negative
16		<i>C. brachiatus</i>	Mejillones	2015-05-12	Fall	15	R1	LB	Negative
17		<i>C. brachiatus</i>	Mejillones	2015-05-12	Fall	15	R2	LB	Negative
18		<i>C. brachiatus</i>	Mejillones	2015-05-12	Fall	10	R1	LB	Negative
19		<i>C. brachiatus</i>	Mejillones	2015-05-12	Fall	10	R2	LB	Negative
20		<i>C. brachiatus</i>	Coliumo	2015-09-01	Late winter	5	R1	NST	Negative
21		<i>C. brachiatus</i>	Coliumo	2015-09-01	Late winter	5	R2	NST	Negative
22		<i>C. brachiatus</i>	Coliumo	2015-09-01	Late winter	10	R1	WSV	Negative
23		<i>C. brachiatus</i>	Coliumo	2015-09-01	Late winter	10	R2	WSV	Negative
24		<i>C. brachiatus</i>	Coliumo	2015-09-01	Late winter	15	R1	LBM	Negative
25		<i>C. chilensis</i>	Coliumo	2015-09-01	Late winter	5	R1	LBM	Negative

	26	<i>C. chilensis</i>	Coliumo	2015-09-01	Late winter	5	R1	LBM	Negative
	27	<i>C. chilensis</i>	Mejillones	2015-03-15	Late fall	20	R1	LBM	Negative
	28	<i>C. chilensis</i>	Mejillones	2015-03-15	Late fall	18	R1	LBM	Negative
	29	<i>C. chilensis</i>	Mejillones	2015-03-15	Late fall	13	R1	LBM	Negative
	30	<i>C. chilensis</i>	Coliumo	2015-09-01	Late winter	16	R1	NST XS	Positive
	31	<i>C. chilensis</i>	Mejillones	2015-11-09	Spring	35	R1	NST XS	Negative
	32	<i>C. chilensis</i>	Mejillones	2015-11-09	Spring	30	R1	NST XS	Negative
	33	<i>C. chilensis</i>	Mejillones	2015-11-09	Spring	20	R1	NST XS	Negative
IV (> 4 mm)	34	<i>R. nasutus</i>	Coliumo	2014-11-27	Spring	5	R1	LBM	Degraded
	35	<i>R. nasutus</i>	Coliumo	2014-11-27	Spring	5	R2	LBM	Degraded
	36	<i>R. nasutus</i>	Coliumo	2014-11-27	Spring	5	R3	LBM	Degraded
	37	<i>R. nasutus</i>	Coliumo	2014-11-27	Spring	10	R1	LBM	Degraded
	38	<i>R. nasutus</i>	Coliumo	2014-11-27	Spring	10	R2	LBM	Degraded
	39	<i>R. nasutus</i>	Coliumo	2014-11-27	Spring	10	R3	LBM	Degraded
	40	<i>R. nasutus</i>	Coliumo	2015-09-01	Late winter	10	R1	NST XS	Positive
	41	<i>R. nasutus</i>	Coliumo	2015-09-01	Late winter	20	R1	NST XS	Positive
	42	<i>E. inermis</i>	Mejillones	2015-03-15	Late summer	20	R1	LBM	Negative
	43	<i>E. inermis</i>	Mejillones	2015-03-15	Late summer	10	R1	LBM	Negative
	44	<i>E. inermis</i>	Mejillones	2015-03-17	Late summer	30	R1	LBM	Negative



Table 2. Summary of the primer sets utilized during this study.

Primer pair	Primer sequence	Target	Region	Fragment size (bp)	Reference
27F	5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3'	Bacterial	V1-V3	492	Lane et al., 1991
519R	5'GWATTACCGCGGCKGCTG3'	16S rRNA			Turner et al., 1999
358F	5'AGACTCCTACGGGAGGCAGC3'	Bacterial	V3-V5	549	Muyzer et al., 1993
907RM	5'AGTCCGTCAATTCMTTTGAGTTT3'	16S rRNA			Muyzer et al., 1998
341F	5'CCTACGGGAGGCAGCAG3'	Bacterial	V3-V5	566	Muyzer et al., 1993
907R	5'CCGTCAATTCMTTTRAGTTT3'	16S rRNA			Lane et al., 1991
Ar4F	5'TCYGGTTGATCCTGCCRG3'	Archaeal	V1-V5	954	Hershberger et al., 1996
Ar958R	5'YCCGGCGTTGAVTCCAATT3'	16S rRNA			DeLong, 1992.
344F	5'ACGGGGYGCAGCAGGCGCGA3'	Archaeal	V3-V5	571	Raskin et al., 1996
915R	5'GTCCTCCCCCGCCAATTCCT3'	16S rRNA			
276F	5'GGGAGGCAGCAGTRGGGAAT3'	Bacterial	V3-V4	525	This study
801R	5'TAATCCTGTTYGCTMCCCAY3'	16S rRNA			
448F	5'MTAACTMCGTGCCAGCAGCC3'	Bacterial	V4-V5	477	This study
925R	5'ARYCTYGCGRHCGTACTCCCCA3'	16S rRNA			



Table 3: PCR results for each sample with different primer couples. Symbols means: \* Expected band; \*\* Expected and unspecific bands; - Negative; / No PCR.

Samples ID #	PCR results Ar 4F / Ar 958 R	PCR results 344F / 915R	PCR results 27F / 519R	PCR results 358F / 907RM	PCR results 341F / 907R
1	**	**	*	/	/
2	**	*	*	/	/
3	?	?	?	/	/
4	*	?	?	/	/
5	**	*	*	/	/
6	?	*	?	*	/
7	?	?	?	/	/
8	?	?	?	/	/
9	?	?	?	?	/
10	?	?	?	?	/
11	?	?	?	*	/
13	?	?	?	?	/
14	?	/	?	/	/
15	?	/	?	/	/
16	**	*	?	/	/
17	**	?	*	/	/
18	**	?	*	/	/
19	**	?	?	/	/
20	?	*	?	*	/
21	?	?	?	?	/
22	?	*	?	?	/
23	?	?	?	?	/
24	?	*	?	?	/
25	*	*	?	*	/
26	*	*	?	*	/
27	?	?	?	**	/
28	?	?	?	?	/
29	*	?	?	**	/
30	**	**	/	/	*
31	**	?	/	/	**
32	**	**	/	/	**
33	**	?	/	/	**
34	**	*	*	/	/
35	*	?	*	*	/
36	*	*	*	*	/
37	**	*	*	/	/
38	?	*	*	*	/
39	*	*	*	*	/
40	?	**	/	/	**
41	**	**	/	/	**
42	?	?	?	?	/

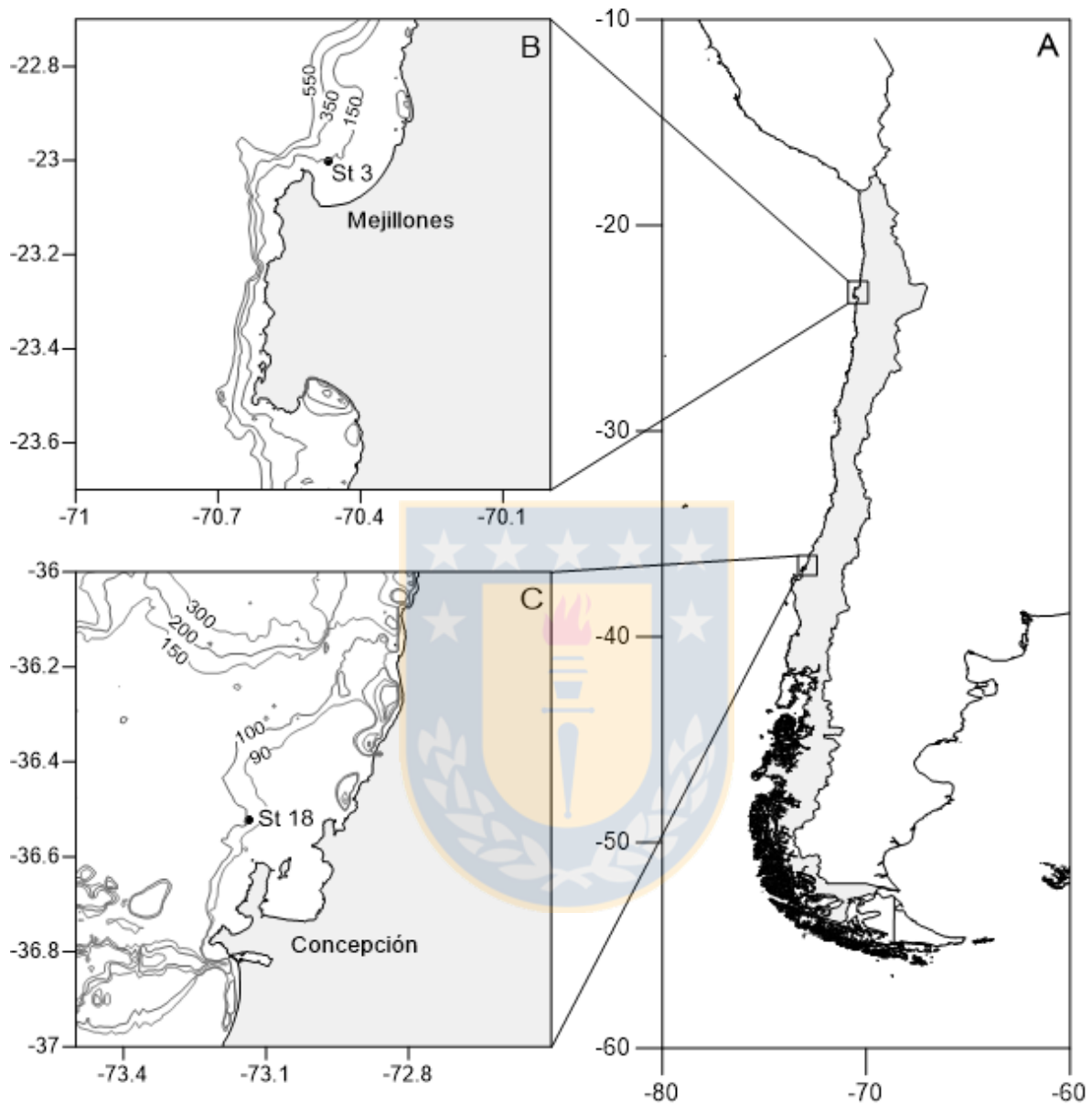


Figure 1. Areas of sampling in the Humboldt Current System, off cost of Chile. A) Indicates the South American continent and location of Chile, facing the Pacific Ocean. B) Shows the localization of Mejillones bay, in the north part of the country, and the sampling station 3. C) Shows the localization of Coliumo bay, in the center-south of Chile, and the sampling station 18.

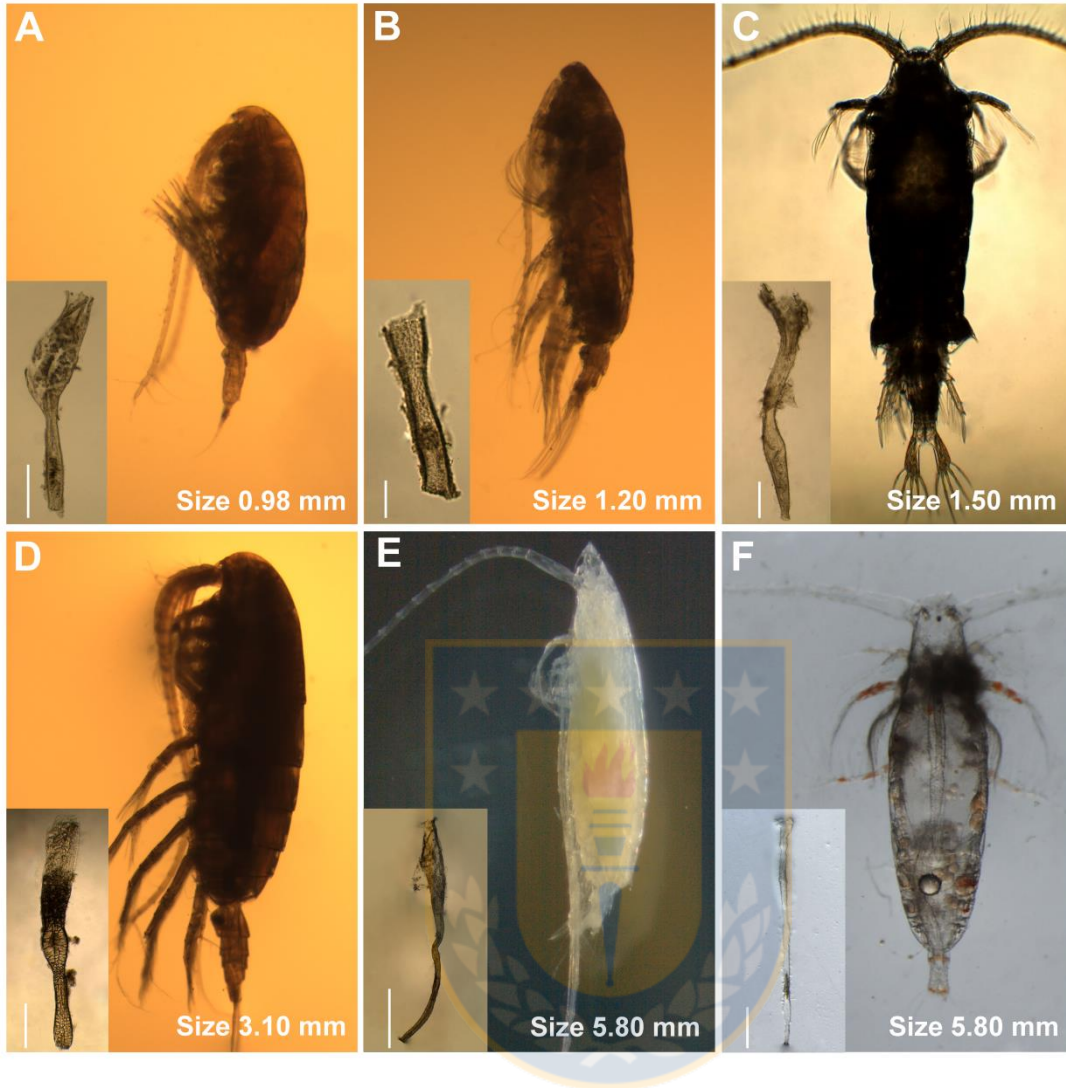


Figure 2. Morphology and body size of the copepods that dominates the Humboldt Current System and were utilized in this study. A) *Paracalanus cf. indicus*, B) *Acartia tonsa*, C) *Centropages brachiatus*, D) *Calanus chilensis*, E) *Rhincalanus nasutus* and F) *Eucalanus inermis*. For each copepod the morphology and size of the gut is shown as inset, the scale bar for A, B, C and D = 0.2 mm and for E and F = 1 mm. The guts were extracted with the technique described in this work.

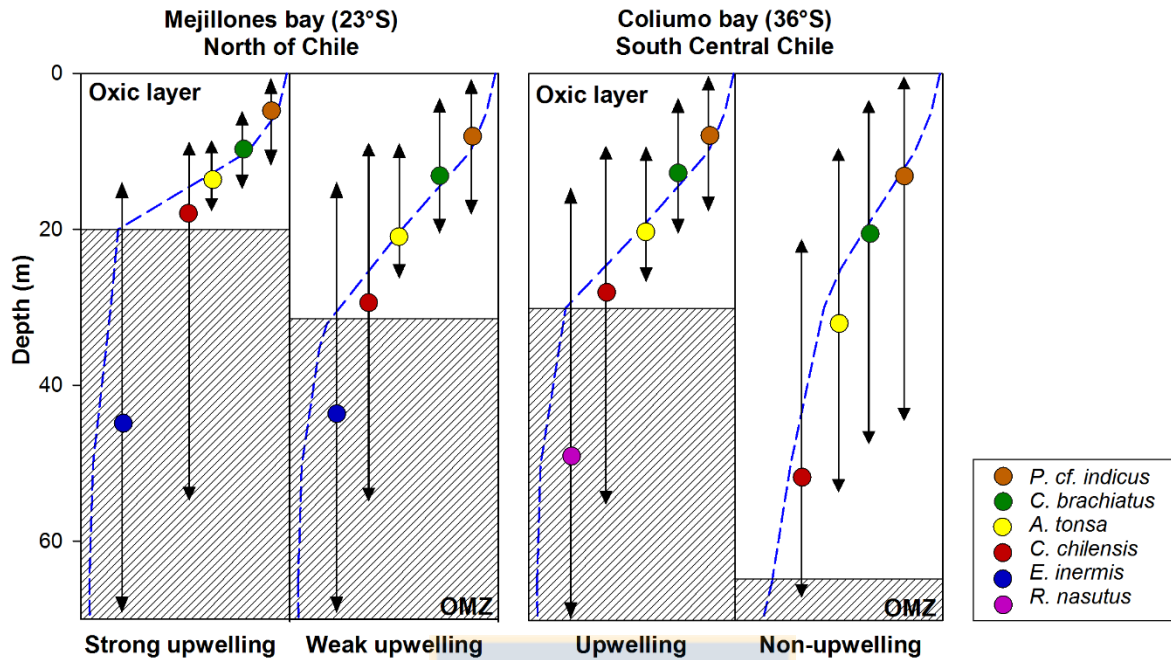


Figure 3. Latitudinal and vertical distribution of the dominant copepods: *Paracalanus cf. indicus*, *Centropages brachiatus*, *Acartia tonsa*, *Calanus chilensis*, *Eucalanus inermis* and *Rhincalanus nasutus* in the Humboldt Current System and were utilized in this study. Arrows indicate Diel Vertical Migration behavior and blue dotted lines indicate dissolved oxygen vertical profiles.

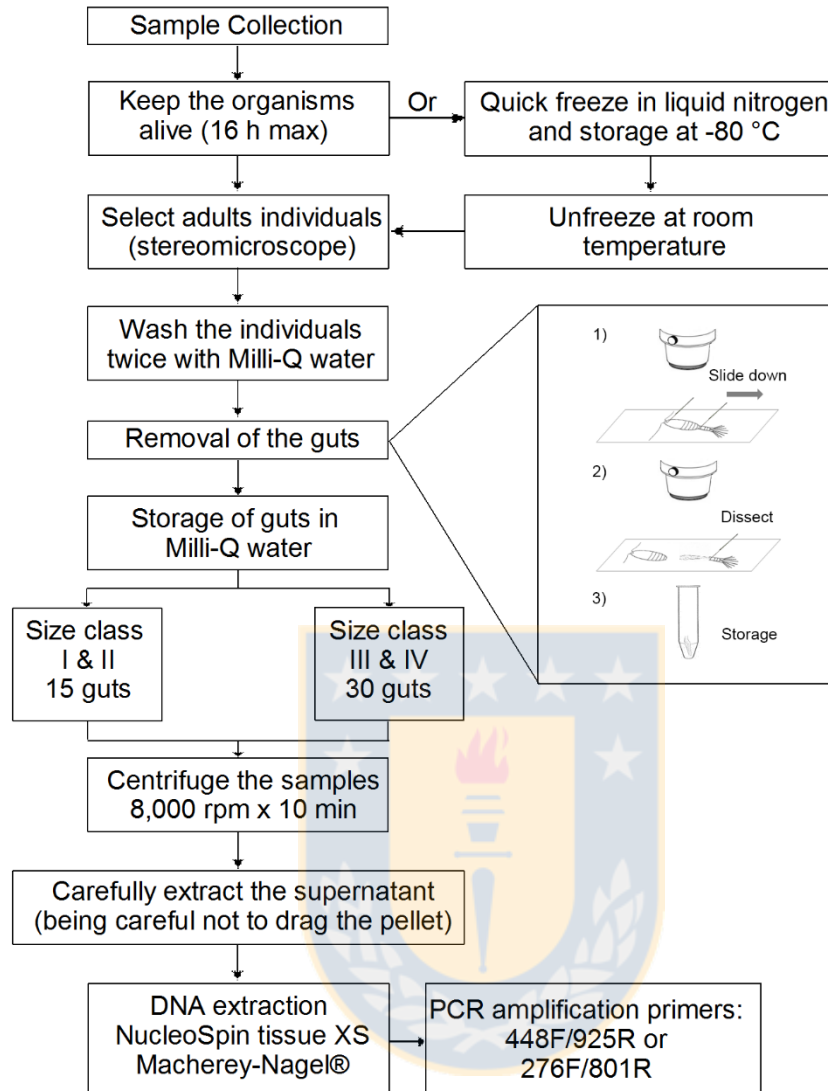
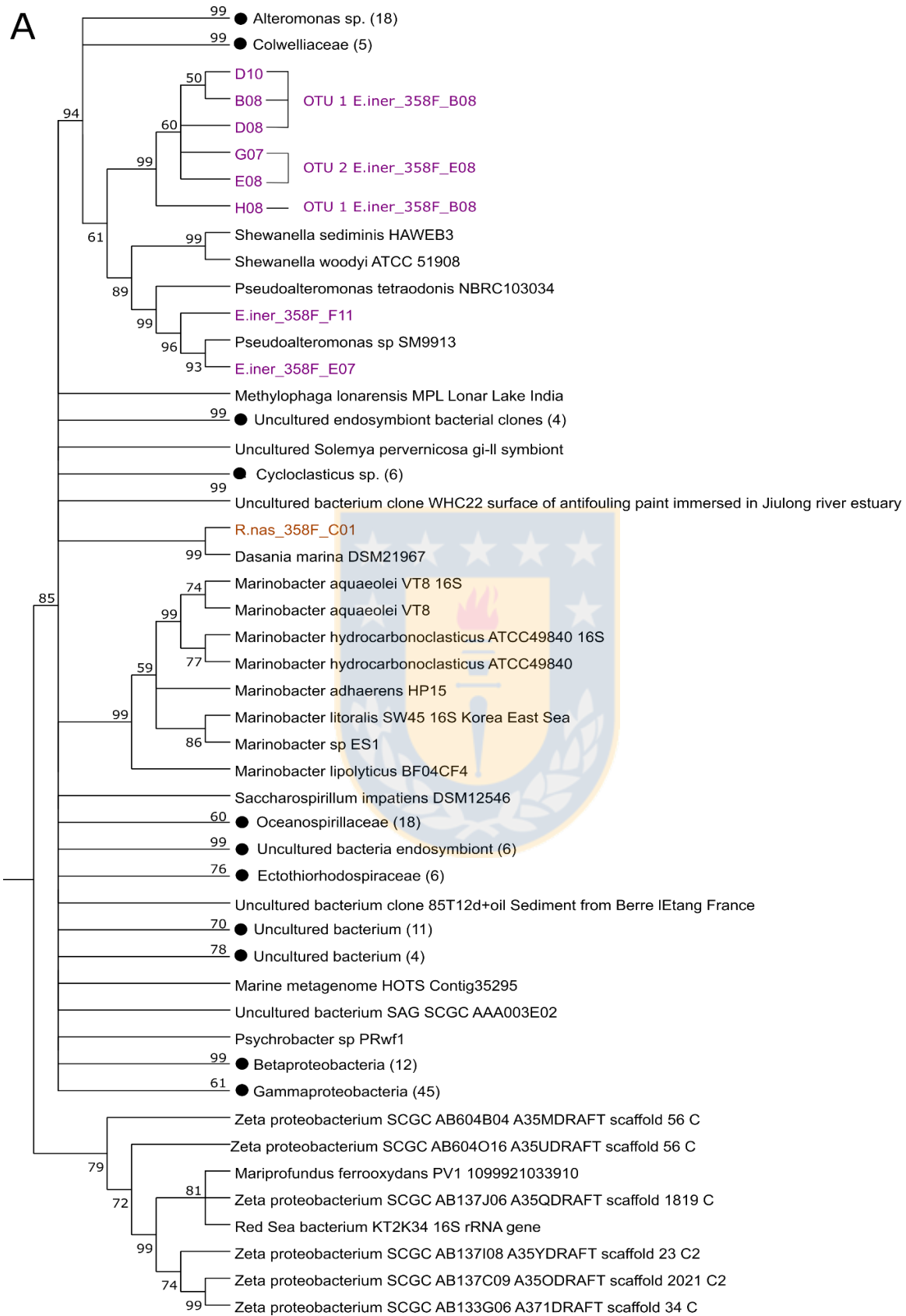


Figure 4. Short protocol derived from the results of this work. Summary of the steps that led us to a successful result. For specific development of each step, please see Materials and Methods.

A





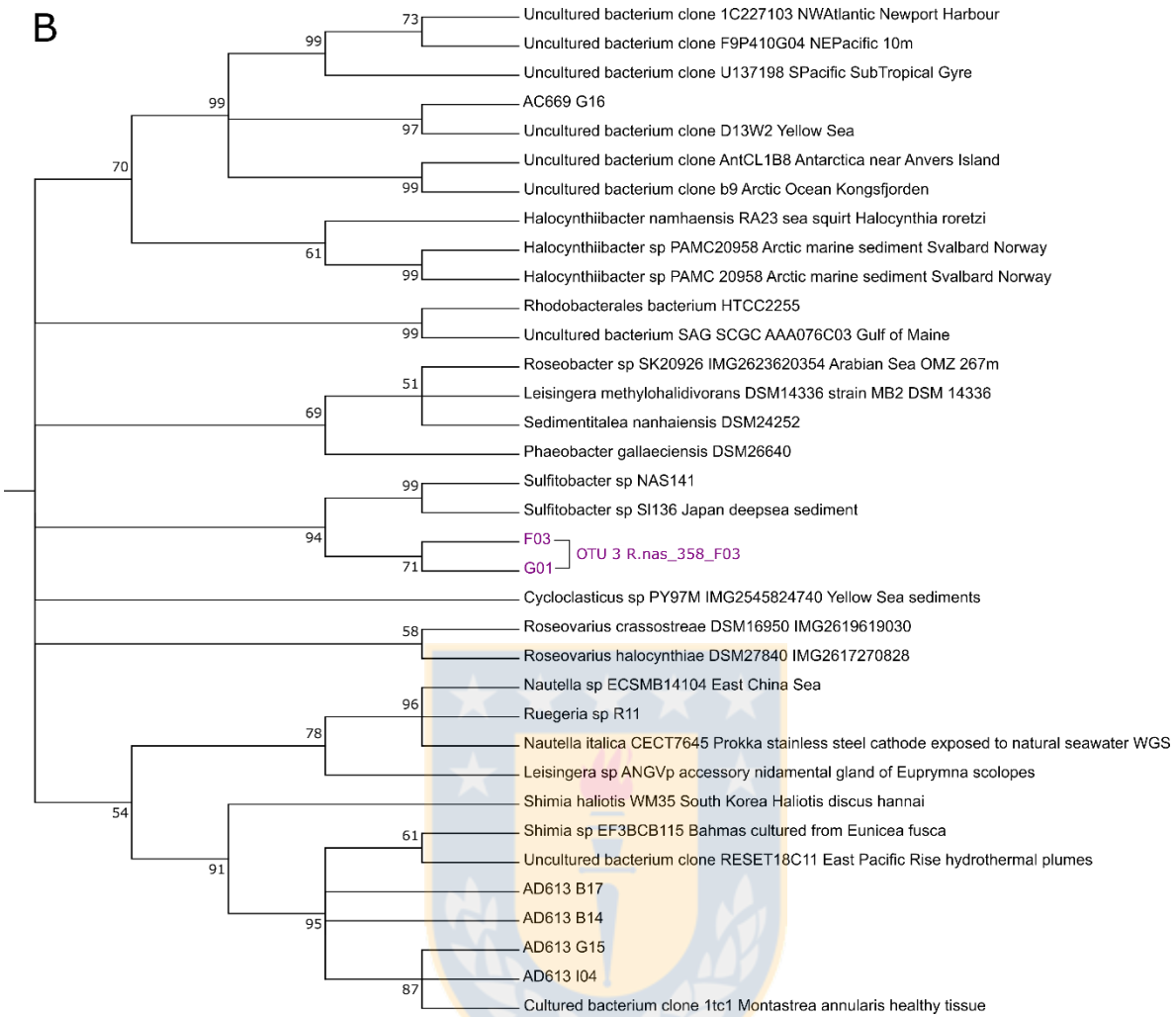


Figure 5. Phylogenetic analysis for Bacterial 16S rRNA sequences obtained with universal primers. The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Kimura 2-parameter model (Kimura 1980). The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches (bootstrap). A discrete Gamma distribution was used to model evolutionary rate differences among sites (5 categories (+G, parameter = 0.5922)). The rate variation model allowed for some sites to be evolutionarily invariable ([+I], 12.3290% sites). The analysis involved 432 nucleotide sequences. In A) and B) are shown subtrees of the complete tree, where the sequences of interest are located. The black dots denoted collapsed branches that are formed by several sequences, where the taxonomic level is indicated (Class, Family or Genus), in order to reduce the tree size. Evolutionary analyses were conducted in MEGA 6 (Tamura et al. 2013).



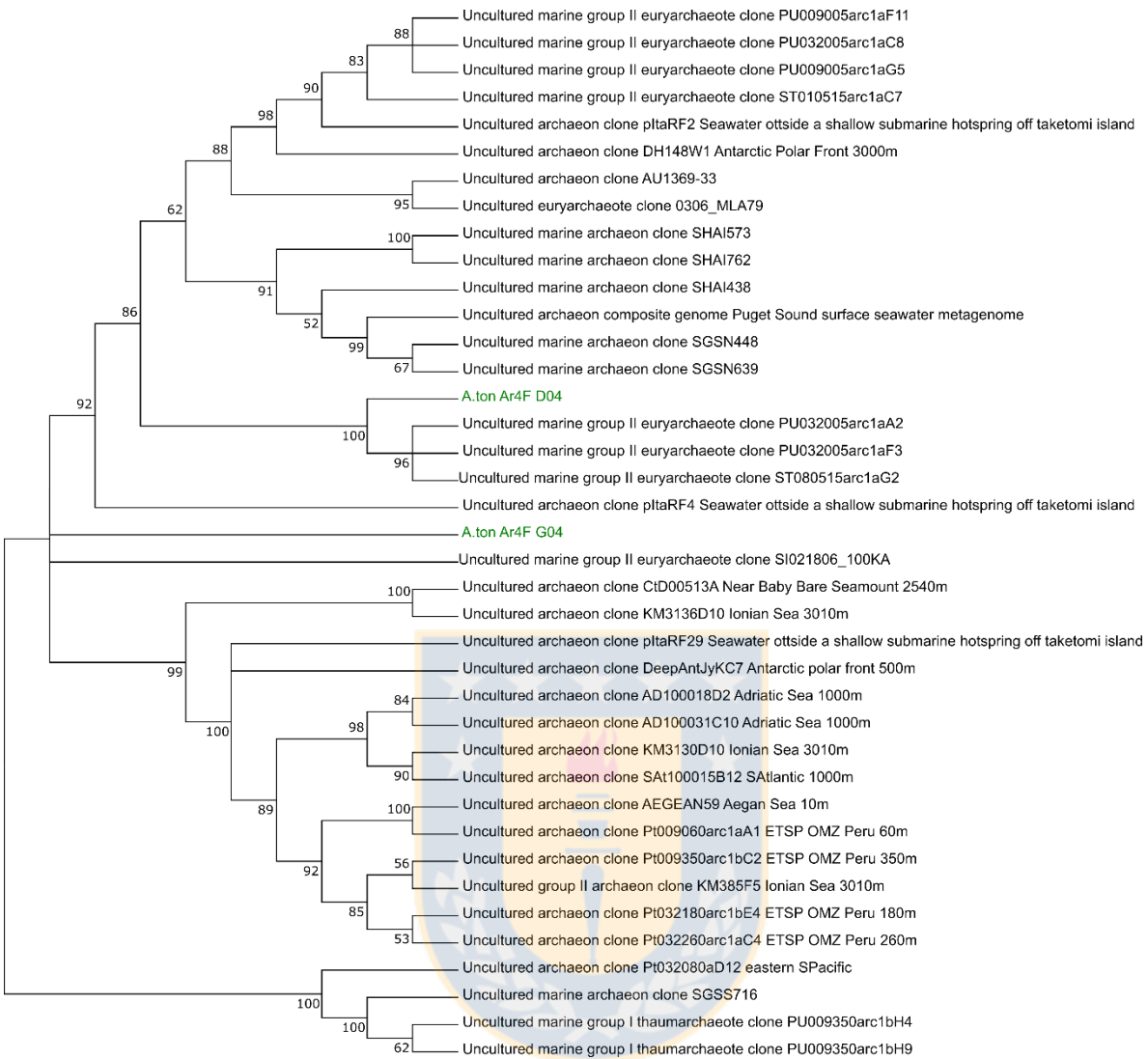


Figure 6. Phylogenetic analysis for Archaeal 16S rRNA sequences obtained with universal primers. The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Kimura 2-parameter model (Kimura 1980). A discrete Gamma distribution was used to model evolutionary rate differences among sites (5 categories (+G, parameter = 0.6482)). The rate variation model allowed for some sites to be evolutionarily invariable ([+I], 17.2932% sites). In the figure is shown a subtree of the complete tree, where the sequences of interest are located. The analysis involved a total of 138 nucleotide sequences. Evolutionary analyses were conducted in MEGA 6 (Tamura et al. 2013).

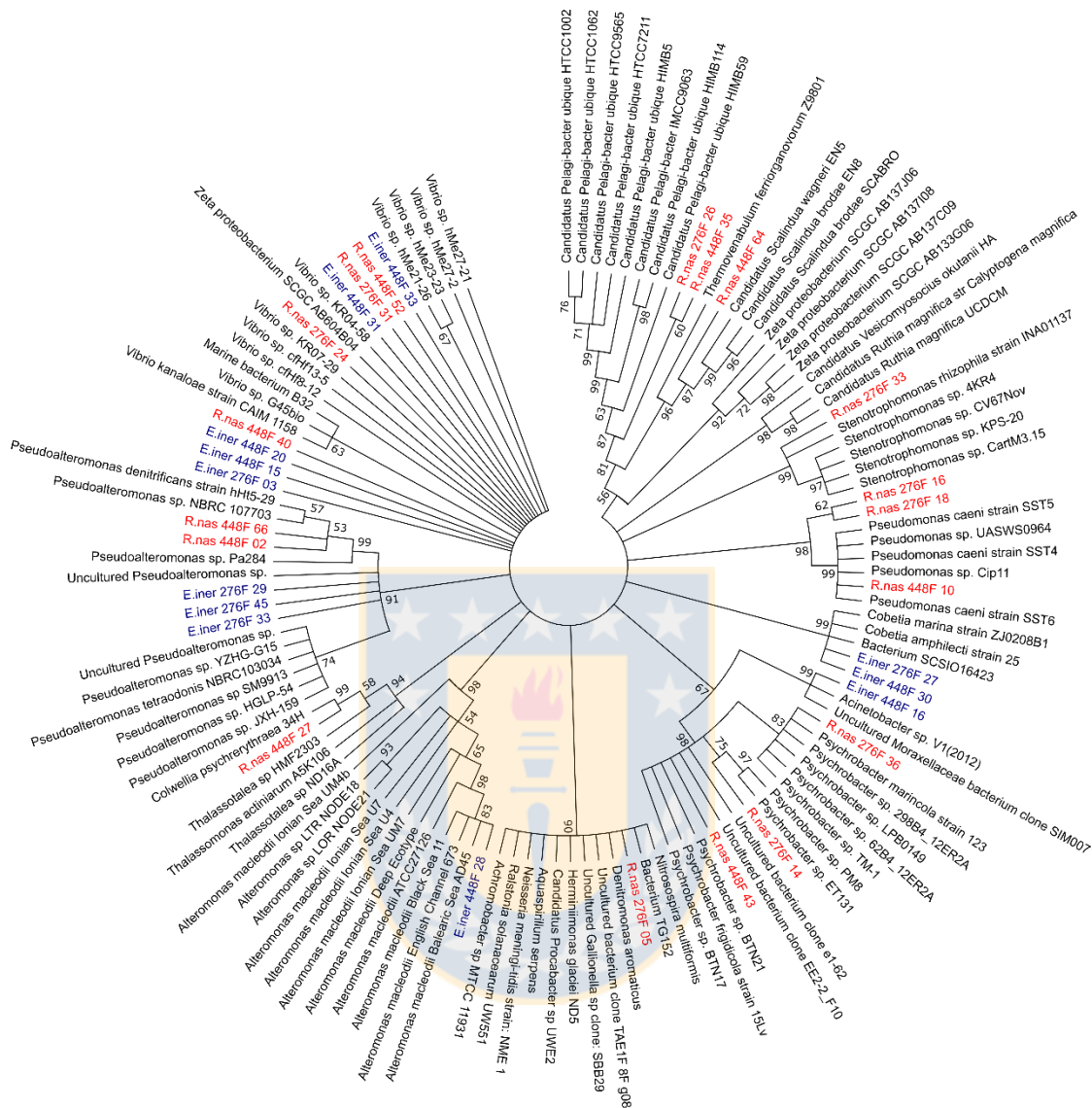


Figure 7. Phylogenetic analysis for Bacterial 16S rRNA sequences, obtained with the new primer sets 448F/925R and 276F/801R. The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Kimura 2-parameter model (Kimura 1980). A discrete Gamma distribution was used to model evolutionary rate differences among sites (5 categories (+G, parameter = 0.7535)). The analysis involved a total of 124 nucleotide sequences. The sequences derived from *Rhinocalanus nasutus* are depicted in red and those derived from *Eucalanus inermis* are depicted in blue. Evolutionary analyses were conducted in MEGA 6 (Tamura et al. 2013).

**Objetivo específico 2:** Caracterizar taxonómicamente la microbiota intestinal de copépodos dominantes asociados a la Zona de Mínimo Oxígeno en las zonas de surgencia costera del norte y centro-sur de Chile.

**Capítulo 2: Caracterización taxonómica de la microbiota intestinal de copépodos mediante técnicas moleculares de secuenciación masiva.**

Los resultados asociados a este capítulo se encuentran aún en desarrollo, dado que las muestras intestinales correspondientes a cuatro especies de copépodos con distinta asociación a la ZMO en el SCH frente al norte y centro-sur de Chile, se encuentran en proceso de secuenciación mediante técnicas de NGS. Se espera caracterizar la diversidad microbiana intestinal de *R. nasutus*, *C. brachiatus*, *C. chilensis* y *C. patagoniensis*, desde el punto de vista taxonómico (bacterias, arqueas y picoeucariontes) y funcional, donde se identificará la presencia o ausencia de genes funcionales asociados al metabolismo del nitrógeno. Los datos moleculares serán analizados estadísticamente con las variables oceanográficas de ambas zonas de estudio, para establecer si existe alguna relación entre el microbioma intestinal de copépodos y las variables ambientales, principalmente el oxígeno disuelto, o si efectivamente el intestino de los copépodos es un nicho particular en donde la ocurrencia de determinados microorganismos es exclusiva del ambiente interno y no está influenciada por el ambiente o la historia de vida del copépodo.

**Objetivo específico 3:** Caracterizar taxonómicamente la microbiota estomacal del eufáusido *Euphausia mucronata* en la zona de surgencia costera del centro-sur de Chile.

### **Capítulo 3: Identificación de la microbiota estomacal del krill de la corriente de Humboldt mediante citometría de flujo, *cell-sorting*, y secuenciación.**

#### **Variables oceanográficas**

Los perfiles verticales en la estación 18 (Fig. 1) mostraron una condición de surgencia típica del verano austral para la columna de agua en el período de muestreo. La temperatura fluctuó entre 13,4 °C en superficie y 11,4 °C a los 80 m de profundidad, con una termoclina observada desde los 5 a los 20 m (Fig. 1A). La concentración de oxígeno disuelto fluctuó entre 5,5 ml L<sup>-1</sup> (245,3 μM) en superficie y 0,2 ml L<sup>-1</sup> (8,92 μM) a partir de los 65 m de profundidad, presentando la oxiclina entre los 5 a 20 m de profundidad (Fig. 1A). El límite superior de la ZMO (1 ml L<sup>-1</sup>) se encontró a los 20 m (Fig. 1A). La salinidad presentó un valor mínimo de 34,3 en superficie y un máximo de 34,6 a los 65 m de profundidad (Fig. 1A). Los valores de fluorescencia fueron relativamente constantes en la columna de agua, variando de 0,2 a 0,4 volts. Sin embargo, un *peak* de fluorescencia fue detectado a los 5 m de profundidad con 9,8 volts (Fig. 1B). La radiación fotosintéticamente activa en superficie fue de 1,7 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, decayendo a < 1 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> a partir de los 5 m (Fig. 1B).

#### **Análisis mediante citometría de flujo**

Los análisis de citometría de flujo a muestras ambientales evidenciaron que, para el día de muestreo, los microorganismos fotosintéticos se concentraron sobre los 10 m de profundidad en la columna de agua con un *peak* de abundancia a los 5 m (6 x 10<sup>5</sup> células fotosintéticas mL<sup>-1</sup>), sin detección de células pigmentadas bajo los 20 m. La comunidad estuvo dominada por las cianobacterias *Prochlorococcus* y picoeucariontes fotosintéticos (5,4 x 10<sup>4</sup> células mL<sup>-1</sup>) (Fig. 2A). Mientras que las cianobacterias del género *Synechococcus* presentaron bajas abundancias (6,5 x 10<sup>3</sup> células mL<sup>-1</sup>). Por otro parte, los organismos no pigmentados fueron altamente abundantes (Fig. 2B) a lo largo de la columna de agua, cuyas abundancias fluctuaron entre 1,08 x 10<sup>6</sup> células mL<sup>-1</sup> y 0,77 x 10<sup>6</sup> células mL<sup>-1</sup> a los 80 m. La abundancia más baja fue encontrada en el límite superior de la ZMO a los 20 m de profundidad (3,2 x 10<sup>5</sup> células mL<sup>-1</sup>).

El análisis por citometría de flujo del contenido estomacal del krill no detectó células pigmentadas en los estómagos disectados (Fig. 2C). Sin embargo, se detectó una señal homogénea y particular en

las muestras teñidas con SYBR Green I (Fig. 2D). Tales eventos positivos de células no pigmentadas difirieron en las propiedades ópticas de las muestras ambientales, sugiriendo una potencial composición microbiana particular. Estos eventos positivos fueron separados mediante *cell-sorting* para el análisis molecular posterior.

### **Amplificación por PCR del ADN del tejido estomacal y de las células separadas**

Se evidenció productos de amplificación positivos, con partidores universales de bacterias, con el tamaño de banda esperado (~549 bp) tanto para las muestras de ADN extraídas directamente del estómago del krill, como para las células seleccionadas mediante citometría de flujo y *cell-sorting*. Sin embargo, los productos PCR del ADN extraído directamente desde el estómago del krill, presentaron productos de amplificación inespecíficos (Fig. 3A) relacionados, probablemente, al gen 18S rRNA de eufáusidos. Estos amplicones inespecíficos estuvieron completamente ausentes en los productos PCR de las células sorteadas (Fig. 3B), reflejando una alta especificidad y pureza del procedimiento de *cell-sorting*.

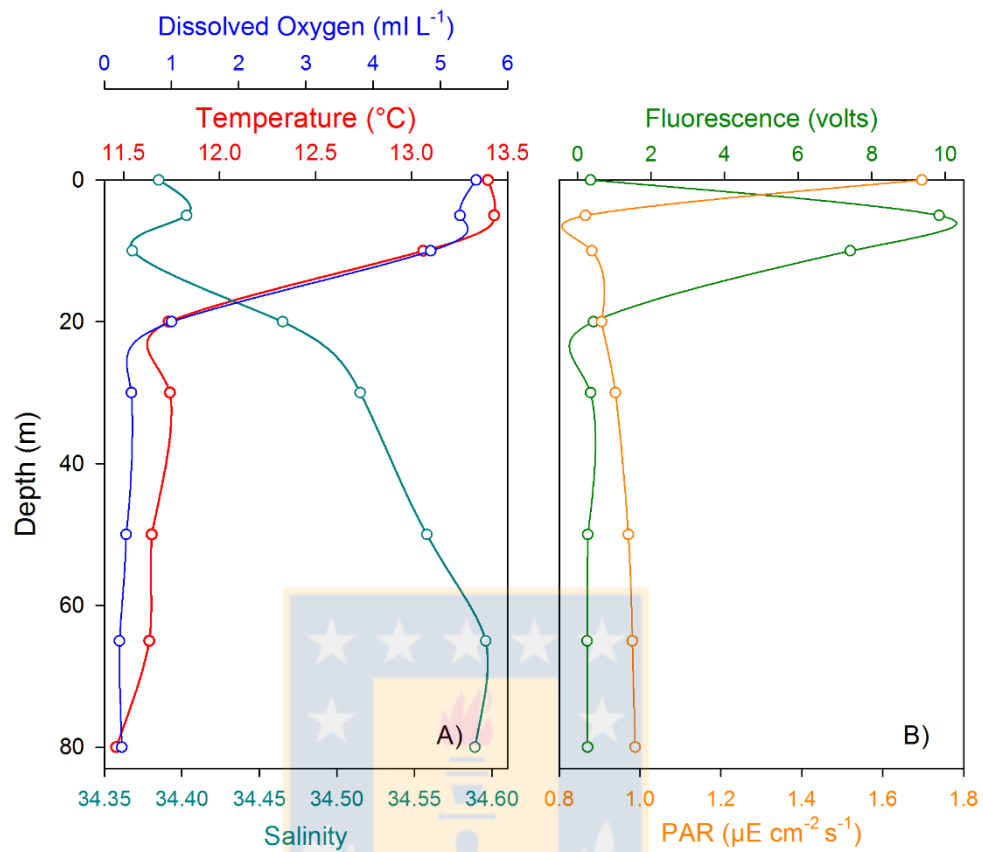
### **Análisis filogenético**

Los resultados de dos bibliotecas de clones realizadas, una con los productos PCR de la extracción de ADN directa del estómago y otra con los productos PCR del ADN proveniente de las células separadas por *cell-sorting*, evidenciaron bacterias pertenecientes a distintos grupos en el estómago del krill: Alpha-, Beta-, Gamma-, y Zeta-proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes y Cyanobacteria. Dentro de las proteobacterias, destacaron representantes de la familia Rhodobacteraceae, donde se encuentran *Sulfitobacter* sp. y *Jannaschia* sp., y representantes no cultivados de Gamma-proteobacteria (Fig. 4). Sin embargo, la mayoría de las secuencias obtenidas mediante *cell-sorting* (47,2% del total de clones) estuvieron afiliadas a *Balneola* sp. (Tabla 1), con un 99% de identidad. Mientras que, mediante la extracción directa de ADN desde el estómago del krill se obtuvieron secuencias asociadas, en su mayoría, a *Synechococcus* sp. (23,9% del total de clones) y *Prochlorococcus* sp. (8,1% del total de clones) (Tabla 1). Estos resultados, demuestran especificidad en cuanto a los microorganismos detectados por citometría de flujo, los cuales deben ser complementados con análisis de extracción directa del ADN estomacal, tal como se desarrolló en este trabajo, para tener una visión íntegra de las comunidades microbianas asociadas al estómago de los eufáusidos.

**Tabla 1.** Afiliación filogenética, número y metodología de obtención de secuencias de clones del estómago de *Euphausia mucronata* del centro-sur de Chile. Fuente: elaboración propia.

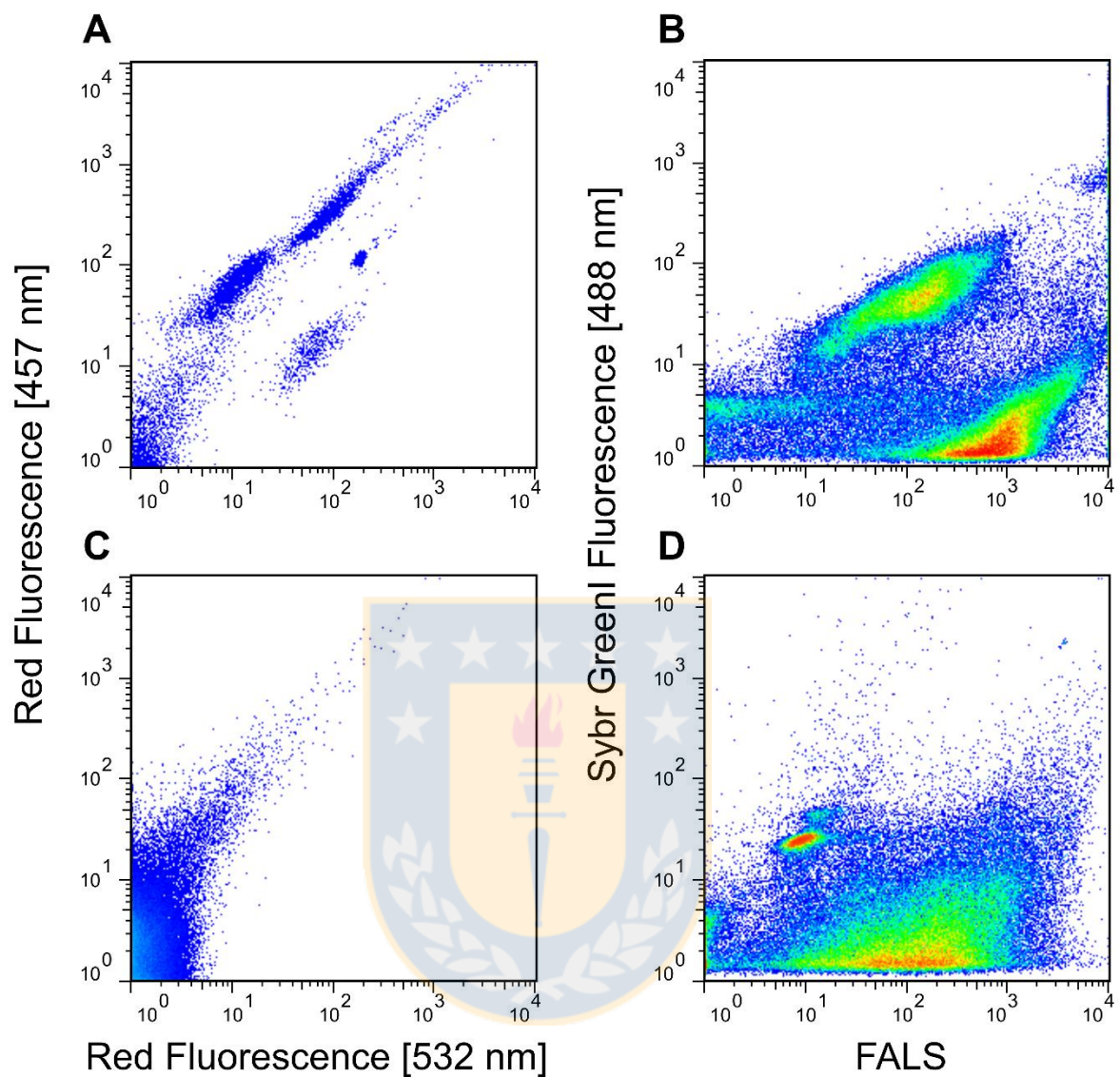
Affiliation (phylum/class/family/genus)	N (%) <sup>a</sup>	Sorting	N of sequences from Total DNA from stomach
Proteobacteria			
Beta-proteobacteria			
Nitrosomonadales			
Nitrosomonadaceae			
<i>Nitrospira</i> sp.	0.54	1	
Alpha-proteobacteria			
Rhodobacterales			
Rhodobacteraceae	5.9		11
<i>Sulfitobacter</i> sp.	1.6		3
<i>Jannaschia</i> sp.	1.0		2
Gamma-proteobacteria			
Uncultured Gammaproteobacteria	1.0	1	1
Uncultured OM60 bacterium clone	2.7	3	2
Alteromonadales			
Uncultured Alteromonadales	0.5	1	
Colwelliaceae			
<i>Colwellia</i> sp.	0.5		1
Zeta-proteobacteria	2.7		5
Actinobacteria	1.6		3
Actinomycetales			
Streptomycetaceae			
<i>Streptomyces</i> sp.	0.5		1
Firmicutes			
Bacillales			
Staphylococcaceae			
<i>Staphylococcus</i> sp.	1.0		2
Bacteroidetes			
Sphingobacteriales			
Balneolaceae			
<i>Balneola</i> sp.	47.2	87	
Flavobacteriales			
Flavobacteriaceae			
<i>Polaribacter</i> sp.	0.5	1	
Cyanobacteria			
Synechococcales			
Synechococcaceae			
<i>Synechococcus</i>	23.9		44
<i>Prochlorococcus</i>	8.1		15

a. % del total de secuencias de dos bibliotecas de clones (n=184)



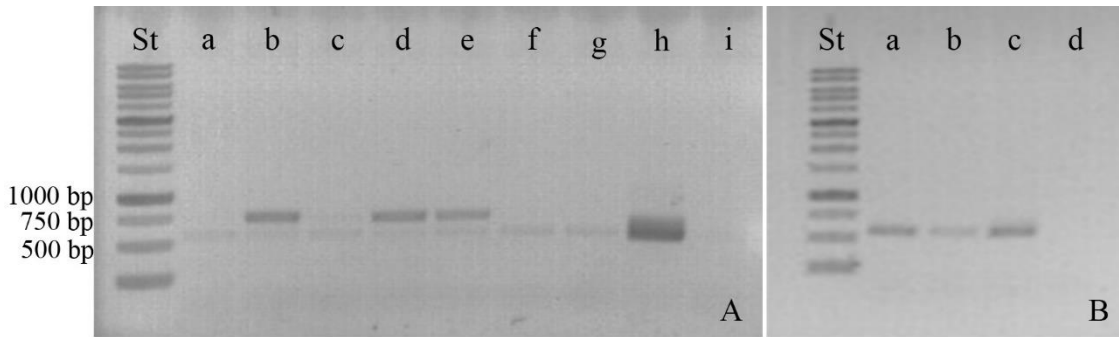
**Figura 1.** Características físico-químicas de la columna de agua en la Estación 18, 2 de marzo de 2016. A) Oxígeno disuelto, Temperatura y Salinidad. B) Fluorescencia y Radiación Fotosintéticamente Activa. Fuente: elaboración propia.





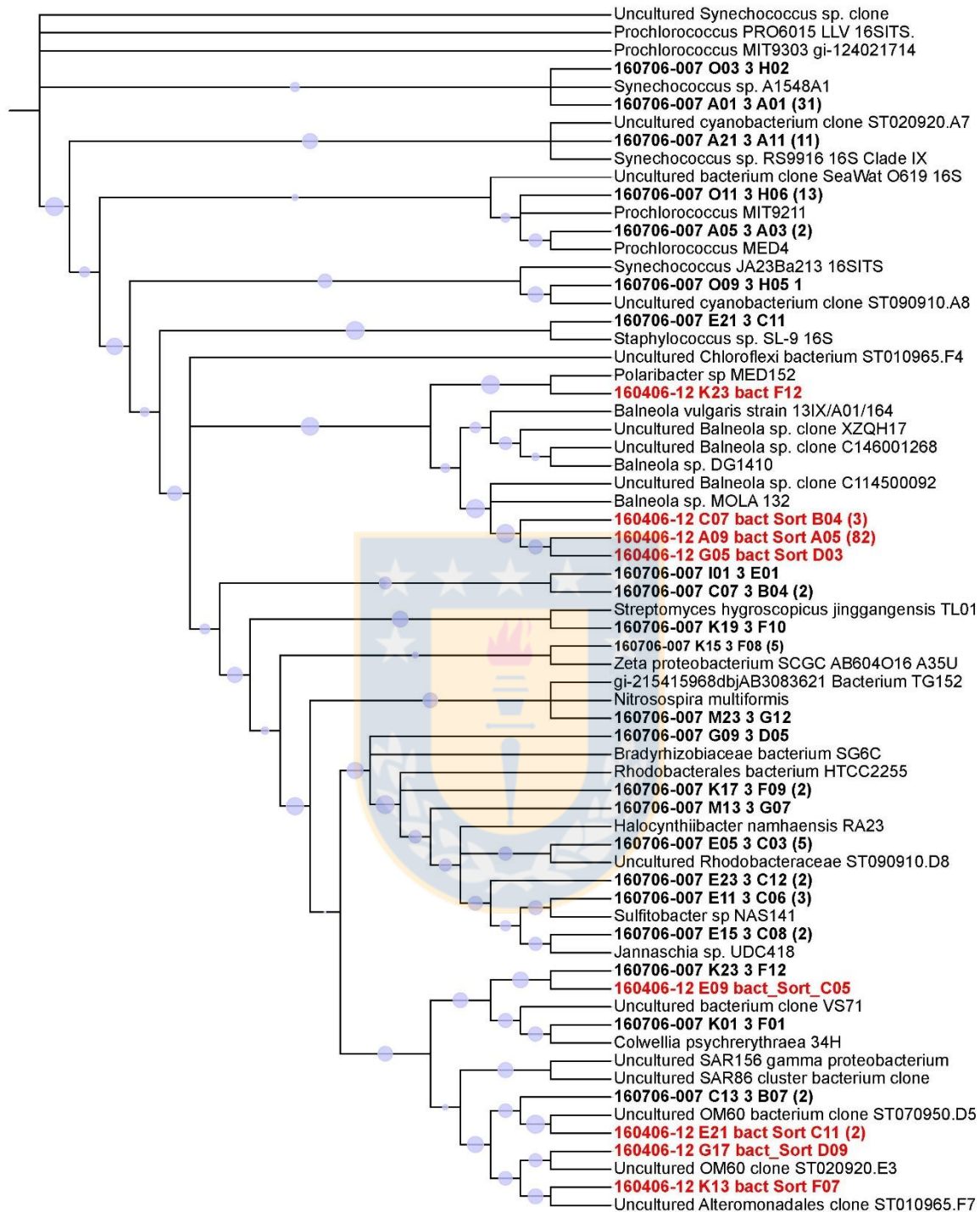
**Figura 2.** Citogramas del contenido estomacal de *Euphausia mucronata* y muestras ambientales de la ST-18, 2 de marzo de 2016. A) Muestra de agua de mar a 10 m, autofluorescente. B) Muestra de agua de mar a 10 m, teñida con SYBR Green I. C) Contenido estomacal del krill autofluorescente. D) Contenido estomacal del krill teñido con SYBR Green I. Fuente: elaboración propia.





**Figura 3.** Amplificación por PCR del contenido gastro-intestinal de *Euphausia mucronata* con partidores universales de bacterias 358F-907Rm. A) Comunidad total extraída desde el tejido gastro-intestinal. Cada carril corresponde a muestras de a) 4 estómagos, b) 7 intestinos, c) 2 estómagos, d) 5 intestinos, e) 10 intestinos, f) 1 estómago, g) 2 intestinos, h) positivo, i) negativo. B) Muestras de células bacterianas separadas por *cell-sorting*. Cada carril corresponde a muestras de a)  $2 \times 10^4$  células, b)  $1,5 \times 10^4$  células, c) positivo, d) negativo. Fuente: elaboración propia.





**Figura 4.** Análisis filogenético de secuencias bacterianas del estómago del krill obtenidas con los partidores universales 358F-907Rm. La historia evolutiva fue inferida mediante *Fasttree*. En color rojo se observan las secuencias obtenidas por citometría de flujo y *cell-sorting* y en negro las secuencias obtenidas desde extracción de ADN directa del estómago del krill. En paréntesis se indica el número de clones. Los círculos indican un valor de soporte de 0.5 a 1. Fuente: elaboración propia.

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1 Aproximaciones metodológicas

En este trabajo se desarrolló una aproximación metodológica enfocada al estudio exclusivo de la microbiota intestinal de copépodos y se probó el uso de citometría de flujo para el estudio de la microbiota estomacal de eufáusidos, respondiendo a la necesidad de investigar el tracto digestivo del zooplancton separadamente del resto del cuerpo.

Para el estudio de la microbiota intestinal de copépodos, se diseñó un protocolo que consta de una técnica para la remoción de los intestinos de copépodos, el número necesario de intestinos (por clase de tamaño de copépodos) para los análisis moleculares, un protocolo de extracción de ADN óptimo para una baja cantidad de tejido y el diseño de partidores que amplifican el gen 16S rRNA de las bacterias con un mínimo de contaminación cruzada con el gen 18S rRNA de los copépodos. Este protocolo fue probado en seis especies de copépodos dominantes en el Sistema de Corrientes de Humboldt (SCH): *Paracalanus* cf. *indicus*, *Acartia tonsa*, *Centropages brachiatus* y *Calanus chilensis* dominantes a lo largo de la costa de Chile y el centro de Perú (Ayón et al. 2008; Hidalgo et al. 2010; Pino-Pinuer et al. 2014); *Eucalanus inermis*, abundante en las costas del norte de Chile (Hidalgo et al. 2005) y *Rhincalanus nasutus*, abundante en el centro y sur de Chile (Hidalgo et al. 2010; Hidalgo et al. 2014). Estos copépodos son análogos en tamaño y pertenecen a los mismos géneros que los copépodos dominantes en otros sistemas de surgencia costera del mundo, como el Sistema de la Corriente de California (Peterson et al. 2002; Peterson and Keister 2003; Morgan et al. 2003; Hoff and Peterson 2006) y el Sistema de la Corriente de Benguela (Verheye et al. 1992; Hugget et al. 2009). Por lo cual, puede ser ampliamente utilizado para el estudio del microbioma intestinal de copépodos en distintos sistemas de surgencia costera de importancia mundial.

Por otro lado, el estudio de la microbiota estomacal del krill mediante citometría de flujo y *cell-sorting*, entrega un nuevo uso a este tipo de análisis y representa una herramienta de alta precisión para la identificación de comunidades microbianas (Koch et al., 2013) que, además, provee células íntegras disponibles para análisis molecular de una manera rápida y cuantitativa.

Debido a que el tamaño de *E. mucronata* (20 mm; Antezana, 1978) es mayor que el de los copépodos dominantes en el SCH, se permite una fácil y rápida extracción de su estómago e intestino, haciendo factible el análisis de su contenido mediante citometría de flujo. Esta técnica también puede ser replicada en estudios del microbioma estomacal y/o intestinal de eufáusidos en otros ambientes donde las especies características de tales sistemas pueden ser incluso de mayor tamaño que el krill

de la corriente de Humboldt, como es el caso del krill antártico *E. superba*, especie clave en el ecosistema marino antártico, cuyo tamaño puede alcanzar entre 25 y 30 mm de longitud total (Quetin & Ross, 1985).

## 5.2 Microbioma intestinal de copépodos

La metodología desarrollada permitió caracterizar taxonómicamente la composición comunitaria de tres especies de copépodos dominantes en el SCH, con distinta distribución vertical y latitudinal. Las comunidades bacterianas fueron identificadas en las especies asociadas a la ZMO: *E. inermis*, del norte de Chile y *R. nasutus*, del centro sur de Chile. Mientras que la presencia de arqueas fue identificada en *A. tonsa*, cuya distribución vertical se encuentra restringida a la capa superficial oxigenada de la columna de agua, limitada por la oxiclina (Escribano et al., 2009) y con una amplia distribución latitudinal a lo largo de todo el SCH (Criales-Hernández et al. 2008; Ayón et al. 2008; Hidalgo et al. 2010, 2014; Pino-Pinuer et al. 2014).

Desde el punto de vista bacteriano, se identificaron sólo representantes de las Gamma-proteobacterias en el tracto gastrointestinal de *E. inermis* y Alpha- y Gamma-proteobacterias en *R. nasutus*. Nuestros resultados son coherentes con los microbiomas descritos previamente para copépodos en distintos ambientes, en los cuales *Sulfitobacter* sp., *Vibrio* sp., *Pseudoalteromonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Psychrobacter* sp. y *Alteromonas* sp., habían sido identificados como componentes del microbioma de los copépodos pelágicos: *Calanus finmarchicus*, *C. helgolandicus*, *Metridia longa*, *Acartia tonsa*, *Centropages* sp., *C. hamatus*, *Temora longicornis*, *Undinula vulgaris*, *Pleuromamma* sp., *Pseudocalanus* sp., *Tigriopus* sp. y *Oithona* sp., (Sochard et al., 1979; Heidelberg et al. 2002; Tang et al. 2009; Brandt et al., 2010; Dziallas et al. 2013; Gerts et al., 2013; Skovgaard et al., 2015; Shoemaker & Moisaner, 2015; Moisaner et al. 2015), así como también en los pellets fecales de *Acartia* spp. y *Paracalanus parvus* (Jing et al. 2012).

La existencia de bacterias compartidas por los microbiomas de distintas especies de copépodos, en distintos ambientes, sugieren una microbiota intestinal común y particular asociada permanentemente a estos organismos, independiente del ambiente en el que se encuentren. En este sentido, estudios recientes sugieren que las bacterias de vida libre en el ambiente pelágico y la composición de las comunidades bacterianas asociadas al zooplancton difieren significativamente una de otra (Grossart et al., 2009) y que, por lo tanto, existiría un microbioma único en los copépodos (Moisaner, 2015; Shoemaker & Moisaner, 2015). Similitudes en el microbioma intestinal de distintos animales han sido identificadas en mamíferos relacionados filogenéticamente y entre

mamíferos con dietas similares (Ley et al., 2008; Muegge et al., 2011), por lo tanto sería posible encontrar un microbioma similar entre copépodos pelágicos calanoideos que explotan similares recursos alimenticios.

No obstante, también se identificaron bacterias que no estaban reportadas previamente como parte del microbioma de copépodos. Por ejemplo, en el intestino de *R. nasutus* se identificaron bacterias asociadas a *Stenotrophomonas* sp., *Colwellia* sp., *Candidatus pelagibacter* ubique y *Candidatus scalindua* sp. Mientras que, en *E. inermis*, se detectó a *Cobetia marina* como componente de su microbioma intestinal. Por lo que, aún se puede reconocer la influencia del ambiente, la fuente de alimento y la historia de vida de cada copépodo en la ocurrencia de determinados grupos microbianos simbioses (Tang et al., 2009; Moisaner, 2015). Particularmente, las bacterias asociadas a *R. nasutus*, *Candidatus pelagibacter* ubique y *Candidatus scalindua* sp. son características de las ZMOs (Sowell et al. 2008; Schmid et al. 2003; Lam et al. 2008; Woebken et al. 2008). Por lo tanto, este copépodo que ha sido descrito como indicador de ZMOs en la zona centro sur de Chile (Castro et al., 1993; Escribano et al., 2007; Hidalgo et al., 2010, 2012) podría verse influenciado por las masas de agua donde habita en la ocurrencia de ciertos grupos bacterianos asociados a su intestino.

Sin embargo, aunque el copépodo *E. inermis* también es habitante característico de la ZMO frente a Chile, donde lleva a cabo extensas migraciones verticales (Hidalgo et al., 2005; Escribano et al., 2009), no se identificaron las bacterias típicamente descritas para las ZMOs en su tracto intestinal. Esto podría deberse a diferencias especie-específicas, en donde cada organismo se ha adaptado a completar su ciclo de vida con un microbioma característico asociado, en el cual las bacterias podrían haber sido ingeridas desde el ambiente durante la alimentación y luego haber sido retenidas en el intestino del copépodo, manteniéndose como residentes, o bien, tales bacterias en *R. nasutus* sean transitorias y en condiciones de ausencia de alimento o pellets fecales en su interior, no sean detectadas.

Desde el punto de vista de la riqueza de bacterias asociadas a cada copépodo, se evidenció un mayor número de OTUs distintos asociados a *R. nasutus* que a *E. inermis*. Si se considera que existe un componente microbiano característico de los copépodos, pero además un componente particular para cada especie el cual podría estar influenciado por el hábitat y la historia de vida de cada copépodo, se podría hipotetizar que la diferencia en el número de OTUs asociados a *R. nasutus* se debe a que este copépodo habita un ambiente dinámico en cuanto a las condiciones físico-químicas de la columna de agua y de los microorganismos ambientales, debido a la surgencia de carácter estacional de Chile centro-sur (Sobarzo et al., 2007). A diferencia de lo que ocurre con *E. inermis*, cuyo hábitat

es más estable, caracterizado por un régimen de surgencia semipermanente (Rodríguez et al., 1991; Marín et al., 2001).

Por otro lado, por primera vez se detectaron arqueas como componentes del microbioma intestinal de copépodos, en este caso, de *A. tonsa*. Desde el punto de vista de asociaciones simbióticas, ciertas arqueas han sido descritas como simbiosomas de invertebrados marinos, como *Cenarchaeum symbiosum* que es simbiote de esponjas marinas (Hallam et al., 2006). Desde el punto de vista ambiental, se han descrito ensamblajes de arqueas en aguas óxicas, subóxicas y anóxicas (Belmar et al., 2011). Específicamente, las arqueas asociadas a *A. tonsa* se afiliaron dentro del Grupo Marino II (MG-II, del inglés *Marine Group II*) de Euryarchaea. Este grupo de arqueas es el más abundante en la capa superficial oxigenada de la columna de agua en el Pacífico Sur (Belmar et al., 2011), lo cual es consistente con el hábitat donde se distribuye *A. tonsa*.

A pesar de que las arqueas identificadas fueron sólo tres secuencias y corresponden a arqueas ambientales no cultivadas, de distintas partes del mundo y que tampoco han sido descritas como simbiosomas de otros organismos marinos, este sería el primer reporte de arqueas en un nuevo nicho ecológico como el intestino de los copépodos. Arqueas en copépodos habían sido previamente estudiadas por Dziallas et al. (2013), pero no habían sido detectadas, aparentemente, por sesgos de los partidores utilizados e interferencias con el ADN del copépodo. Si bien, nuestra investigación también arrojó contaminación cruzada con los partidores universales de arqueas, lo cual impidió su detección en los copépodos *E. inermis* y *R. nasutus*, sí permitió identificar su presencia en *A. tonsa*. Por lo tanto, a pesar de que este copépodo es de pequeño tamaño (~1.3 mm) y la extracción de sus intestinos y posterior extracción de ADN se complejizan, su amplia distribución global y la detección de bacterias en estudios previos, y ahora de arqueas, pueden reafirmarlo como un modelo de estudio para posteriores investigaciones del microbioma intestinal de copépodos.

Un aspecto relevante a considerar es que la presencia de bacterias y arqueas afiliadas a distintos grupos revela una diversidad de fuentes nutricionales y metabolismos que, potencialmente, se pueden estar llevando a cabo en el intestino de los copépodos. Así, bacterias nitrato reductoras como *Stenotrophomonas* sp. (Palleroni & Bradbury, 1993), bacterias anammox como *Candidatus scalindua* sp. (Schmid et al. 2003; Lam et al. 2008; Woeckel et al. 2008) o bacterias con metabolismos relacionados al azufre como *Sulfitobacter* sp. (Ivanova et al., 2004), podrían jugar papeles importantes en la utilización y ciclaje de nutrientes al interior de estos organismos, lo cual podría verse influenciado por las características físico-químicas de sus intestinos. Se ha descrito que el intestino de los copépodos es un ambiente con distintas concentraciones de oxígeno disuelto, en



donde la parte posterior o urosoma es subóxica, la parte central o metasoma es anóxica y la parte anterior o cefalosoma es aparentemente anóxica (Tang et al., 2011; Glud et al., 2015). Por lo tanto, la presencia de bacterias aeróbicas y anaeróbicas en su microbiota intestinal podría deberse a la ubicación en distintas zonas del intestino. Particularmente, las bacterias características de la ZMO, podrían encontrar dentro del intestino de copépodos un hábitat acorde a sus requerimientos nutricionales y metabólicos.

Se ha reportado, también, que los ambientes con bajo oxígeno incrementan la anoxia en el intestino de copépodos muertos (Glud et al., 2015), por lo que podría esperarse que los ambientes con bajo oxígeno disuelto incrementaran la anoxia en copépodos vivos, influenciando la ocurrencia de bacterias adaptadas a las condiciones de bajo oxígeno, como las que habitan en la ZMO, que podrían llevar a cabo importantes procesos anaeróbicos, tales como la fijación de nitrógeno (Proctor, 1997) y metanogénesis (De Angelis & Lee, 1994) en el intestino. En este estudio, las bacterias nitrato reductoras o bacterias anammox, podrían tener influencia en la utilización y ciclaje del nitrógeno al interior de los copépodos, con la consecuente formación de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), producto de la nitrato reducción, y la liberación de nitrógeno molecular ( $\text{N}_2$ ) como producto de la oxidación anaeróbica del amonio. Este último proceso podría contribuir a la pérdida de nitrógeno del ecosistema oceánico. Así también, se hipotetiza que el intestino de *A. tonsa* cuya distribución vertical está restringida a un ambiente óxico, podría presentar concentraciones de oxígeno disuelto a nivel subóxico y, por lo tanto, favorecer la presencia de arqueas en su interior.

### 5.3 Microbioma estomacal de eufáusidos

El estudio integrado de la microbiota estomacal de eufáusidos mediante análisis molecular a partir de extracción de ADN del tejido estomacal, en conjunto con la identificación y obtención de células microbianas mediante citometría de flujo y *cell-sorting*, permitieron realizar una caracterización taxonómica de los microorganismos que habitan el estómago de *E. mucronata*. Se identificaron bacterias estomacales dentro de los grupos Alpha-, Beta-, Gamma-, y Zeta-proteobacteria, además de Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes y Cianobacteria, destacando representantes como *Sulfitobacter* sp., Uncultured gamma-proteobacterium, *Balneola* sp., *Polaribacter* sp., *Synechococcus* sp. y *Prochlorococcus* sp. De las bacterias identificadas, sólo Alteromonadales habían sido descritas previamente como componentes de la microbiota estomacal del krill antártico *E. superba*, en el cual también dominan otras bacterias como *Psychrobacter* sp., *Pseudomonas* sp. y *Flavobacterium* sp. (Kelly, 1978; Felvolden & Eidsa, 1981). Las diferencias encontradas en los

microbiomas descritos para las distintas especies de krill, podrían deberse a que tales especies habitan ambientes distintos, donde explotan distintos ítems alimentarios y, esto en su conjunto, tendría influencia en la ocurrencia de comunidades bacterianas específicas, tal como ha sido descrito para copépodos (Tang et al., 2009). Las bacterias identificadas podrían estar ejerciendo distintas funciones metabólicas o nutricionales dentro del krill, así, *Sulfitobacter* sp. podría llevar a cabo metabolismos asociados al azufre (Ivanova et al., 2004) y *Polaribacter* sp., podría estar cumpliendo un rol en la degradación de polímeros (González et al., 1998). Asimismo, *Streptomyces* sp, que ya ha sido reportado como simbiote de peces, moluscos y esponjas, es un género reconocido por producir una amplia variedad de metabolitos secundarios y compuestos bioactivos como antibióticos, péptidos, enzimas lipasas, proteasas, quitinasas, alcaloides y flavonoides, entre otros productos (Dharmaraj, 2010). Otras bacterias pertenecientes al filo Actinobacteria, también poseen enzimas para la biosíntesis de distintos ácidos grasos (saturados e insaturados), carotenoides y vitaminas (Fujinami et al., 2013), por lo tanto, debido a que los eufáusidos biosintetizan lípidos y ácidos grasos y tienen una acumulación ontogenética de esta reserva de energía (Kattner & Hagen, 1998), las actinobacterias podrían estar ejerciendo influencia en el metabolismo asociado a los lípidos y las proteínas en su estómago.

Un aspecto importante a considerar es la presencia de *Balneola* sp. en el estómago del krill. Esta bacteria ha sido descrita de vida libre (Urios, 2006) y aunque ha sido recientemente descrita en asociación con cocolitofóridos (Green et al., 2015) no existen registros de estos microorganismos como simbioses de invertebrados marinos, por lo cual este sería el primer reporte de *Balneola* sp. en asociación con organismos zooplanctónicos. En Chile centro-sur, desde donde fueron colectadas las muestras de eufáusidos, *Balneola* sp. no ha sido registrada como habitante de la columna de agua. Sin bien el orden Sphingobacteriales es un componente abundante en el área de estudio, éste se encuentra principalmente representado por la familia Flavobacteriaceae y no por representantes de la familia Balneolaceae a la cual se afilia *Balneola* sp. (Aldunate et al., 2014). Bacterias afiliadas a Bacteroidetes son exitosas en la degradación de materia orgánica particulada en el océano (Pinhassi et al., 2004), por lo que *Balneola* sp. podría estar cumpliendo un rol en la digestión de los compuestos orgánicos ingeridos por el krill.

Desde el punto de vista metodológico, la presencia de *Balneola* sp. en un 47.2 % del total de clones, sólo fue identificable mediante el estudio con citometría de flujo. Mientras que, a partir de la extracción de ADN directamente desde el tejido y contenido estomacal del krill, hubo una dominancia de secuencias afiliadas a los géneros de cianobacterias *Synechococcus* sp. y



*Prochlorococcus* sp. Las diferencias en los microorganismos identificados por cada metodología, podría deberse al tipo de asociación que presenta cada bacteria con el estómago del krill. Hipotetizamos que *Balneola* sp. podría encontrarse adherida a la mucosa gástrica del estómago, como es el caso de bacterias estomacales en otros organismos, e. g. *Helicobacter pylori* en mamíferos (Tomb et al., 1997), por lo cual, al ser extraídas del tejido estomacal mediante acción mecánica, son visualizadas por citometría de flujo y luego pueden ser separadas. En contraposición, se hipotetiza que, debido a su pequeño tamaño ( $< 1,5 \mu\text{m}$ ), *Synechococcus* sp. y *Prochlorococcus* sp. podrían ser ingeridas durante la alimentación de los eufáusidos, por medio de la filtración del agua, sin ser la presa objetivo, lo que explicaría su ADN en el estómago del krill. Así, el material genético de tales cianobacterias puede ser amplificado por PCR con partidores universales de bacterias, mientras que *Balneola* sp., al estar asociada a la mucosa del estómago, es eliminada en el proceso de extracción de ADN junto con el debris celular, quedando ausente de la amplificación por PCR a partir de ADN extraído directamente desde el estómago.

Estos resultados demuestran que la citometría de flujo es una técnica altamente específica en el estudio de comunidades microbianas, permite cuantificar las células microbianas con las cuáles se trabaja, permite una rápida obtención de resultados y entrega información de microorganismos que el análisis molecular no reveló. Mientras que el estudio mediante extracción de ADN y amplificación por PCR directamente al tejido estomacal del krill es más laborioso en cuanto al tiempo que requiere realizar las extracciones de ADN y no detectó microorganismos que son altamente abundantes en el estómago del krill, como *Balneola* sp., sin embargo entregó información más diversa de microorganismos presentes en el estómago del krill, la cual podría representar simbioses habitantes en el estómago del krill, o bien, células microbianas transitorias que ingresaron producto de la alimentación de estos organismos. Debido a estos antecedentes, se propone que el estudio integrado mediante citometría de flujo, *cell-sorting* y extracción de ADN directa desde el estómago del krill, permite una caracterización completa de los microorganismos asociados a esta cavidad en eufáusidos.

#### **5.4 Perspectivas futuras**

Las simbiosis son complejas asociaciones que pueden conducir nuevas capacidades metabólicas y el establecimiento de nuevos organismos. La diversidad de estas asociaciones es muy amplia y mantiene muchos misterios acerca del origen y la relación exacta entre los organismos que están involucrados en una simbiosis (Raggi, 2010). Sin embargo, un primer acercamiento esencial a la

respuesta de tales interrogantes, es la identificación de las comunidades microbianas asociadas a sus hospedadores, en este caso, el zooplancton. A partir de ese conocimiento y con el desarrollo de metodologías adecuadas para el estudio en profundidad de las asociaciones entre microorganismos y zooplancton, se pueden dilucidar potenciales implicancias de esta interacción, las cuales pueden tener influencia, aparentemente beneficiosa, tanto para el simbiote como para el hospedador, y como resultado de la interacción en su conjunto, potenciales consecuencias para el ecosistema pelágico.

Desde el punto de vista de los beneficios para los microorganismos simbioses, las comunidades microbianas asociadas al tracto gastro-intestinal de copépodos y eufáusidos pueden explotar una alta concentración de carbono orgánico que pasa a través del zooplancton (Tang et al., 2010; Dziallas et al., 2013). Además, el zooplancton migrante puede transportar microorganismos asociados grandes distancias a través de la columna de agua (Grossart et al., 2010), como es el caso de los copépodos en estudio *E. inermis* y *R. nasutus*, y, particularmente, el eufáusido *E. mucronata*, quienes llevan a cabo extensas migraciones verticales. Así, el zooplancton podría representar “islas microbianas” que ayudan a mantener la diversidad, crecimiento y actividad de los microorganismos, representando importantes reservorios microbianos en el ambiente pelágico (Tang, 2005; Grossart & Tang, 2010). Desde el punto de vista del hospedador, el zooplancton podría obtener fuentes suplementarias de nutrientes, vitaminas y lípidos o bien, beneficiarse de la presencia de enzimas que contribuyan a digerir distintos ítems dietarios, según sus requerimientos particulares. Ciertas simbiosis descritas para organismos invertebrados en otros ambientes revelan que los microorganismos asociados a sus intestinos promueven la provisión y reciclaje de nitrógeno en sus hospedadores a partir de urea y amonio, proveyendo amino ácidos esenciales, además de influir en la regulación del almacenamiento de grasas (Douglas 1998; Sabre et al. 2009). Los organismos en estudio, tanto copépodos como eufáusidos, habitan en el ecosistema pelágico asociados a la ZMO, caracterizada por ser una zona de des-fertilización del océano con pérdida de nitrógeno molecular asociado a los procesos microbianos, por lo que la presencia de ciertas bacterias podrían estar jugando papeles importantes en la utilización y ciclaje de nutrientes, particularmente del nitrógeno, al interior del zooplancton. Sugiriendo que el microbioma gastro-intestinal de estos organismos podría involucrar capacidades metabólicas beneficiosas aún inexploradas.

En este sentido, a partir de este estudio nos aproximamos al conocimiento de potenciales metabolismos que están ocurriendo en el tracto digestivo del zooplancton, asociados a los microorganismos descritos. Sin embargo, se proyecta que los resultados futuros de los análisis que

aún están en desarrollo, donde se amplificarán genes asociados al metabolismo del nitrógeno en cuatro copépodos dominantes del SCH, más investigaciones basadas en el protocolo propuesto en este estudio asociadas a análisis moleculares de transcriptómica podrían dilucidar tales interrogantes y conducir al conocimiento de potenciales nuevas rutas metabólicas y nuevas vías de transferencia de elementos en el ecosistema pelágico, incorporando vías de intercambio de materia y energía en las tramas tróficas marinas anteriormente inexploradas.



## 6. CONCLUSIONES

- 1) Es factible estudiar de manera específica el microbioma intestinal y/o estomacal del zooplancton, utilizando técnicas de disección y protocolos de extracción de ADN acordes a las características de tamaño de copépodos y eufáusidos.
- 2) El microbioma intestinal de copépodos tiene un componente común entre copépodos de distintos ambientes, como *Vibrio* sp. y *Sulfitobacter* sp. y un componente especie-específico caracterizado por microorganismos particulares de cada copépodo, probablemente influenciado por el ambiente y la historia de vida del hospedador.
- 3) El microbioma intestinal de *Rhincalanus nasutus* es aparentemente más rico (mayor número de OTUs) y con mayor influencia del ambiente que el microbioma intestinal de *Eucalanus inermis*, probablemente por habitar un ambiente más dinámico en cuanto a las características oceanográficas de la columna de agua y diversidad microbiana, debido a la surgencia estacional.
- 4) Hay evidencia de arqueas en el intestino del copépodo habitante de la capa óxica de la columna de agua, *Acartia tonsa*, siendo este el primer registro de arqueas directamente asociadas al zooplancton.
- 5) El microbioma estomacal del eufáusido *Euphausia mucronata* presenta bacterias exclusivas (*Balneola* sp.) no descritas previamente como simbiositos de invertebrados marinos, ni tampoco como habitantes de vida libre en la columna de agua en el área de estudio.
- 6) La citometría de flujo representa un análisis altamente específico que entrega nueva información de los microorganismos asociados al estómago del krill, la cual complementa los resultados del análisis del microbioma estomacal mediante técnicas moleculares tradicionales, corrigiendo los sesgos metodológicos asociados a tal aproximación.
- 7) El estudio del microbioma gastro-intestinal del zooplancton abre una nueva línea de estudio en ecología pelágica en la que esta interacción puede ser abordada desde sus componentes

metabólicos, fisiológicos, biogeoquímicos y evolutivos. Tales conocimientos podrían acercarnos a formas poco exploradas de entender el funcionamiento de estos grupos clave, las tramas tróficas marinas y el flujo de los elementos en el ambiente pelágico.



## 7. REFERENCIAS

- Aldunate M (2014)** Influencia del oxígeno sobre la estructura comunitaria de las bacterias planctónicas en un ecosistema de surgencia costera subtropical. Universidad de Concepción, Concepción, Tesis de Magister, 94 pp.
- Antezana T (1978)** Distribution of Euphausiids in the Chile-Perú Current with particular reference to the endemic *Euphausia mucronata* and the oxygen minima layer. University of California, San Diego, Ph. D. Thesis, 466 pp.
- Antezana T (2002)**. Adaptive behavior of *Euphausia mucronata* in relation to the oxygen minimum layer of the Humboldt Current. *Oceanography of the eastern Pacific*, 2, 29-40.
- Ayón P, Criales-Hernandez MI, Schwamborn R, Hirche HJ (2008)**. Zooplankton research off Peru: a review. *Progress in Oceanography*, 79(2), 238-255.
- Brandt P, Gerdt G, Boersma M (2010)** Comparison of different DNA-extraction techniques to investigate the bacterial community of marine copepods. *Helgol Mar Res*, 64: 331-342.
- Brinton, E., Ohman, M. D., Townsend, A. W., Knight, M. D., & Bridgeman, A. L. (2000)**. Euphausiids of the world ocean (world biodiversity database cd-rom series). *Expert Center for Taxonomic Identification, Amsterdam*.
- Carman K, Dobbs F (1997)** Epibiotic Microorganism on Copepods and Other Marine Crustaceans. *Microscopy Research Technique*, 37: 116 – 135.
- Castro LR, Bernal PA, Troncoso VA (1993)** Coastal intrusion of copepods: mechanisms and consequences on the population biology of *Rhincalanus nasutus*. *Journal of Plankton Research*, 15(5), 501-515.
- De Angelis MA, Lee C (1994)** Methane production during zooplankton grazing on marine phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 39(6), 1298-1308.
- Delille D, Razouls S (1994)** Community structures of heterotrophic bacteria of copepod fecal pellets. *Journal of Plankton Research*, 16(6), 603-615.
- Denner EBM, Mark B, Mark B, Busse H-J, Turkiewicz M, Lubitz W (2001)** Psychrobacter proteolyticus sp. nov., a psychrotrophic, halotolerant bacterium isolated from the Antarctic krill *Euphausia superba* Dana, excreting a cold-adapted metalloprotease. *Syst Appl Microbiol* 24(1): 44–53.
- Dharmaraj S (2010)** Marine Streptomyces as a novel source of bioactive substances. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(12), 2123-2139.

- Donachie SP, Saborowski R, Peters G, Buchholz F (1995)** Bacterial digestive enzyme activity in the stomach and hepatopancreas of *Meganyctiphanes norvegica* (M. Sars, 1857). *J Exp Mar Biol Ecol* 188:151–165.
- Donachie SP, Zdanowski MK (1998)** Potential digestive function of bacteria in krill *Euphausia superba* stomach. *Aquat Microb Ecol* 14:129–136.
- Douglas AE (1998)** Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria Buchnera. *Annual review of entomology*, 43(1), 17-37.
- Dziallas C, Grossart H, Tang KW, Nielsen TG (2013)** Distinct Communities of Free-Living and Copepod-Associated Microorganism along a Salinity Gradient in Godthabsjord, West Greenland. *Artic, Antarctic, and Alpine Research*. 45 (4): 1 – 10.
- Escribano R, Hidalgo P (2000)** Spatial distribution of copepods in the north of the Humboldt Current region during coastal upwelling. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 80: 283–290.
- Escribano R, Schneider W (2007)** The structure and functioning of the coastal upwelling system off central/southern Chile. *Progress in Oceanography*, 75: 343 – 347.
- Escribano R, Hidalgo P, Krautz C (2009)** Zooplankton associated with the oxygen minimum zone system in the northern upwelling region of Chile during March 2000. *Deep-Sea Res. II*, 56: 1083-1094
- Escribano R, Hidalgo P, Fuentes M, Donoso K (2012)** Zooplankton time series in the coastal zone off Chile: Variation in upwelling and responses of the copepod community. *Progress in Oceanography*. doi: 10.1016/j.pocean.2011.11.006
- Fevolden SE, Eidså G (1981)** Bacteriological characteristics of Antarctic krill (Crustacea, Euphausiacea), *Sarsia* 66:1, 77-82
- Fujinami S, Takarada H, Kasai H, Sekine M, Omata S, Harada T, Fukai R, Hosoyama A, Horikawa H, Kato Y, Nakazawa H, Fujita N (2013)** Complete genome sequence of *Ilumatobacter coccineum* YM16-304 T. *Standards in genomic sciences*, 8(3), 430.
- Gerdts G, Brandt P, Kreisel K, Boersma M, Schoo KL, Wichels A (2013)** The microbiome of North Sea copepods. *Helgoland Marine Research*, 67(4), 757.
- Glud RN, Grossart HP, Larsen M, Tang KW, Arendt KE, Rysgaard, S, Thandrup B, Gissel Nielsen, T. (2015)** Copepod carcasses as microbial hot spots for pelagic denitrification. *Limnology and Oceanography*, 60(6), 2026-2036.
- Gosink JJ, Woese CR, Staley JT (1998)** *Polaribacter* gen. nov., with three new species, *P. irgensii* sp. nov., *P. franzmannii* sp. nov. and *P. filamentus* sp. nov., gas vacuolate polar marine bacteria of

the Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides group and reclassification of '*Flectobacillus glomeratus*' as *Polaribacter glomeratus* comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 48(1), 223-235.

**Gonzalez RR, Quiñones RA (2002)** Ldh activity in *Euphausia mucronata* and *Calanus chilensis*: implications for vertical migration behaviour. J Plankton Res 24(12), 1349-1356.

**Gowing M, Wishner KF (1992)** Feeding ecology of benthic-pelagic zooplankton on an eastern tropical Pacific seamount. Mar. Biol, 112: 451-467.

**Green DH, Echavarrri-Bravo V, Brennan D, Hart MC (2015)** Bacterial Diversity Associated with the Coccolithophorid Algae *Emiliania huxleyi* and *Coccolithus pelagicus* f. *braarudii*. BioMed research international. doi.org/10.1155/2015/194540

**Grossart HP, Dziallas C, Leunert F, Tang KW (2010).** Bacteria dispersal by hitchhiking on zooplankton. Proceedings of the National Academy of Sciences, 107(26), 11959-11964.

**Hansen B, Bech G (1996)** Bacteria associated with a marine planktonic copepod in culture. I. Bacterial genera in seawater, body surface, intestines and fecal pellets and succession during fecal pellet degradation. Journal of Plankton Research, 18(2): 257-273.

**Harris JM (1993)** The presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: a synthesis. Microb. Ecol., 25: 195-231.

Henry, S., Baudoin, E., López-Gutiérrez, J. C., Martin-Laurent, F., Brauman, A., & Philippot, L. (2004). Quantification of denitrifying bacteria in soils by nirK gene targeted real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 59(3), 327-335.

**Hidalgo P, Escribano R, Morales M (2005)** Ontogenetic vertical distribution and diel migration of the copepod *Eucalanus inermis* in the oxygen minimum zone off northern Chile (20-21° S). Journal of Plankton Research, 27(6): 519-529.

**Hidalgo P, Escribano R, Vergara O, Jorquera E, Donoso K, Mendoza M (2010)** Patterns of copepod diversity in the Chilean coastal upwelling system. Deep-Sea Research. II, 57: 2089 – 2097.

**Hidalgo P, Ferrari F, Yáñez S, Pino P, Escribano R (2012)** Development of *Rhincalanus nasutus* (Giesbrecht, 1888) (Copepoda, Rhincalanidae) from the Humboldt Current System. Crustaceana, 85(9): 1025 - 1053.

**Hirche HJ, Barz K, Ayon P, Schulz J (2014)** High resolution vertical distribution of the copepod *Calanus chilensis* in relation to the shallow oxygen minimum zone off northern Peru using LOKI, a new plankton imaging system. Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers, 88, 63-73.



- Hoff RC, Peterson WT (2006)** Copepod biodiversity as an indicator of changes in ocean and climate conditions of the northern California current system. *Limnol Oceanogr*, 51, 2607-2620.
- Huggett J, Verheye H, Escribano R, Fairweather T (2009)** Copepod biomass, size composition and production in the Southern Benguela: Spatio-temporal patterns of variation, and comparison with other eastern boundary upwelling systems. *Progress in Oceanography*, 83(1), 197-207.
- Jing H, Shek L, Yung W, Jin X, Liu H (2012)** Dynamics of bacterial community composition during degradation of copepod fecal pellets. *Journal of plankton research*, fbs043.
- Kattner G, Hagen W (1998)** Lipid metabolism of the Antarctic euphausiid *Euphausia crystallorophias* and its ecological implications. *Marine Ecology Progress Series*, 170, 203-213.
- Kawaguchi S, Toda T (1997)** Discovery of ciliates reproducing in the gut of Antarctic krill. *Polar Biol* 18(2): 158-160.
- Kelly MD, Lukaschewsky S, Anderson CG (1978)** Bacterial flora of antarctic krill (*Euphausia superba*) and some of their enzymatic properties. *Journal of Food Science*, 43(4), 1196-1197.
- Koch C, Günther S, Desta AF, Hübschmann T, Müller S (2013)** Cytometric fingerprinting for analyzing microbial intracommunity structure variation and identifying subcommunity function. *Nature protocols*, 8(1), 190-202.
- Lenz J (2000)** Introduction. In: Harris RP, Wiebe PH, Lenz J, Skjoldal HR, Huntley M. (eds) *ICES Zooplankton Methodology Manual*. Academic Press, New York, pp 1 - 30.
- Margulis L (1993)** Symbiosis in cell evolution: microbial communities in the Archean and Proterozoic eons.
- Mauchline J (1980)** The biology of mysids. *Advances in Marine Biology* 18. 369 pp.
- Mauchline J (1998)** The Biology of calanoid copepods. *Advances in Marine Biology* 33. 710 pp.
- Moisander PH, Sexton AD, Daley MC (2015)** Stable Associations Masked by Temporal Variability in the Marine Copepod Microbiome. *PloS one*, 10(9), e0138967.
- Morgan CA, Peterson WT, Emmett RL (2003)** Onshore-offshore variations in copepod community structure off the Oregon coast during the summer upwelling season.
- Nagasawa S, Nemoto T (1988)** Presence of bacteria in guts of marine crustaceans and on their fecal pellets. *Journal of Plankton Research*, 10: 559-569
- Palleroni NJ, Bradbury JF (1993)** *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 43(3), 606-609.

**Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO (2007)** Development of the human infant intestinal microbiota. *PLOS Biology*, 5(7): e117.

**Peter H, Sommaruga R (2008)** An evaluation of methods to study the gut bacterial community composition of freshwater zooplankton. *Journal of Plankton Research*, 30(9): 997-1006.

**Peterson WT, Keister JE (2003)** Interannual variability in copepod community composition at a coastal station in the northern California Current: a multivariate approach. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 50(14), 2499-2517.

**Peterson W, Gomez-Gutierrez J, Morgan CA (2002)**. Cross-shelf variation in calanoid copepod production during summer 1996 off the Oregon coast, USA. *Marine Biology*, 141(2), 353-365.

**Pinhassi J, Sala MM, Havskum H, Peters F, Guadayol O, Malits A, Marrasé C (2004)** Changes in bacterioplankton composition under different phytoplankton regimens. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(11), 6753-6766.

**Pino-Pinuer P, Escribano R, Hidalgo P, Riquelme-Bugueño R, Schneider W (2014)** Copepod community response to variable upwelling conditions off central-southern Chile during 2002-2004 and 2010-2012. *Marine Ecology Progress Series*, 515, 83-95.

**Priemé A, Braker G, Tiedje JM (2002)** Diversity of nitrite reductase (*nirK* and *nirS*) gene fragments in forested upland and wetland soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1893-1900.

**Proctor LM (1997)** Nitrogen-fixing, photosynthetic, anaerobic bacteria associated with pelagic copepods. *Aquatic Microbial Ecology*, 12(2), 105-113.

**Prosser JI, Embley TM (2002)** Cultivation-based and molecular approaches to characterisation of terrestrial and aquatic nitrifiers. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81(1-4), 165-179.

**Quetin LB, Ross RM (1985)** Feeding by Antarctic krill, *Euphausia superba*: Does size matter?. In *Antarctic nutrient cycles and food webs* (pp. 372-377). Springer Berlin Heidelberg.

**Raggi L.(2010)** Bacterial-invertebrate symbioses: from an asphalt cold seep to shallow water.

**Rakusa-Suszczewski S, Filcek K (1988)** Protozoa on the body of *Euphausia superba* Dana from Admiralty Bay (the South Shetland Islands). *Acta Protozool* 27(1): 21-30.

**Rakusa-Suszczewski S, Zdanowski MK (1989)** Bacteria in krill (*Euphausia superba* Dana) stomach. *Acta Protozool* 28: 87–90.

**Riquelme-Bugueño R, Escribano E, Gómez-Gutiérrez J (2013)** Somatic and molt production in *Euphausia mucronata* off central-southern Chile: the influence of coastal upwelling variability. *Mar Ecol Progr Series* 476: 39-57.

**Röling WF (2014)** The Family Geobacteraceae. In *The Prokaryotes* (pp. 157-172). Springer Berlin Heidelberg.

**Ruby EG, Henderson B, McFall-Ngai MJ (2004)** We Get By with a Little Help from Our (Little) Friends. *Science*, 303(5662), 1305-7

**Schmid M, Walsh K, Webb R, Rijpstra WI, Van de Pas-Schoonen K, Verbruggen MJ, Damsté JSS (2003)** *Candidatus* “*Scalindua brodae*”, sp. nov., *Candidatus* “*Scalindua wagneri*”, sp. nov., two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 26(4), 529-538.

**Sherr E, Sherr B (1988)** Role of microbes in pelagic food webs: A revised concept. *Limnol. Oceanogr*, 33(5): 1225-1227.

**Shoemaker KM, Moisander PH (2015)** Microbial diversity associated with copepods in the North Atlantic subtropical gyre. *FEMS microbiology ecology*, 91(7), fiv064.

**Shyu C, Soule T, Bent SJ, Foster JA, Forney LJ (2007)** MiCA: a web-based tool for the analysis of microbial communities based on terminal-restriction fragment length polymorphisms of 16S and 18S rRNA genes. *Microbial ecology*, 53(4), 562-570.

**Skovgaard A, Castro-Mejia JL, Hansen LH, Nielsen DS (2015)** Host-Specific and pH-Dependent Microbiomes of Copepods in an Extensive Rearing System. *PloS one*, 10(7), e0132516.

**Sochard MR, Wilson DF, Austin B, Colwell RR (1979)** Bacteria Associated with the surface and gut of marine copepods. *Applied and environmental microbiology*, 37(4): 750-759.

**Sowell SM, Norbeck AD, Lipton MS, Nicora CD, Callister SJ, Smith RD, Barofsky DF, Giovannoni SJ (2008)**. Proteomic analysis of stationary phase in the marine bacterium “*Candidatus* *Pelagibacter ubique*”. *Applied and environmental microbiology*, 74(13), 4091-4100.

**Steinberg DK, Nelson NB, Carlson (2004)** Production of chromophoric dissolved organic matter (CDOM) in the open ocean by zooplankton and the colonial cyanobacterium *Trichodesmium* spp. *Mar. Ecol. Ser.* 267: 45-46.

**Stevens H, Ulloa O (2008)** Bacterial diversity in the oxygen minimum zone of the eastern tropical South Pacific. *Environmental Microbiology*, 10 (5): 1244-1259.

**Stewart FJ, Ulloa O, DeLong EF (2012)** Microbial Metatranscriptomics in a Permanent Marine Oxygen Minimum Zone. *Environmental Microbiology*, 14.1: 23–40.

**Tang K (2005)** Copepods as microbial hotspots in the ocean: effects of host feeding activities on attached bacteria. *Aquatic Microbial Ecology*, 38: 31-40

**Tang KW, Freund CS, Schweitzer CL (2006)** Occurrence of copepod carcasses in the lower Chesapeake Bay and their decomposition by ambient microbes. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 68(3), 499-508.

**Tang K, Dziallas C, Hutalle-Schmelzer K, Grossart H (2009)** Effects of food on bacterial community composition associated with the copepod *Acartia tonsa* Dana. *Biology letters*, doi: 10.1098/rsbl.2009.0076

**Tang KW, Turk V, Grossart HP (2010)** Linkage between crustacean zooplankton and aquatic bacteria. *Aquatic Microbial Ecology*, 61(3), 261-277.

**Tang KW, Glud RN, Glud A, Rysgaard S, Nielsen TG (2011).** Copepod guts as biogeochemical hotspots in the sea: Evidence from microelectrode profiling of *Calanus* spp. *Limnology and Oceanography*, 56(2), 666-672.

**Thiel M, Macaya EC, Acuña E, Arntz WE, Bastías H, Brokordt K, Camus P, Castilla JC, Castro LR, Cortés M, Dumont CP, Escribano R, Fernández M, Gajardo JA, Gaymer CF, Gómez I, González AE, González HE, Haye PA, Illanes JE, Iriarte JL, Lancellotti DL, Luna-Jorquera G, Luxoro C, Manriquez PH, Marín V, Muñoz P, Navarrete SA, Pérez E, Poulin E, Sellanes J, Sepúlveda HH, Stotz W, Tala F, Thomas A, Vargas CA, Vásquez JA, Vega JMA (2007)** The Humboldt Current system of northern and central Chile oceanographic processes, ecological interactions and socioeconomic feedback. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev*, 45: 195 - 344.

**Tims S, Derom C, Jonkers DM, Vlietnick R, Saris WH, Kleerebezem M, De Vos WM, Zoetendal EG (2013)** Microbiota conservation and BMI signatures in adult monozygotic twins. *The ISME Journal*, 7: 707-717.

**Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, Nelson K, et al (1997)** The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, 388(6642), 539-547.

**Tremblay N, Abele D (2015)** Response of three krill species to hypoxia and warming: an experimental approach to oxygen minimum zones expansion in coastal ecosystems. *Marine Ecology-An Evolutionary Perspective*.

**Throbäck IN, Enwall K, Jarvis Å, Hallin S (2004)** Reassessing PCR primers targeting nirS, nirK and nosZ genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiology Ecology*, 49(3), 401-417.

**Ulloa O, Pantoja S (2009)** The oxygen minimum zone of the eastern South Pacific. *Deep Sea Research II*, 56: 987 – 991.

- Ulloa O, Canfield DE, DeLong EF, Letelier RM, Stewart FJ (2012)** Microbial oceanography of anoxic oxygen minimum zones. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 109 (40):15996-16003.
- Ulloa O, Wright JJ, Belmar L, Hallam SJ (2013)** Pelagic Oxygen Minimum Zone Microbial Communities. In: Rosenberg E. DeLong EF. Lory S. Stackebrandt E. Thompson F. (Eds.). *The Prokaryotes*. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, pp. 528.
- Urios L, Agogué H, Lesongeur F, Stackebrandt E, Lebaron P (2006)** *Balneola vulgaris* gen. nov., sp. nov., a member of the phylum Bacteroidetes from the north-western Mediterranean Sea. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(8), 1883-1887.
- Verheye HM, Hutchings L, Huggett JA, Painting SJ (1992)** Mesozooplankton dynamics in the Benguela ecosystem, with emphasis on the herbivorous copepods. *South African Journal of Marine Science*, 12(1), 561-584.
- Woeckel D, Lam P, Kuypers MM, Naqvi S, Kartal B, Strous M, Jetten MSM, Fuchs BM, Amann R (2008)** A microdiversity study of anammox bacteria reveals a novel *Candidatus Scalindua* phylotype in marine oxygen minimum zones. *Environmental Microbiology*, 10(11), 3106-3119.
- Work KA, Havens KE (2003)** Zooplankton grazing on bacteria and cyanobacteria in a eutrophic lake. *Journal of Plankton Research*, 25: 1301-1307.
- Wright J, Konwar K, Hallam ST (2012)** Microbial ecology of expanding oxygen minimum zones. *Nature Reviews Microbiology*. doi:10.1038/nrmicro2778
- Yañez S, Hidalgo P, Escribano R (2012)** Mortalidad natural de *Paracalanus indicus* (Copepoda, Calanoida) en áreas de surgencia asociada a la Zona de Mínimo Oxígeno en el Sistema de Corrientes de Humboldt: implicancias en el transporte pasivo del flujo de carbono. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 47(2): 295 – 310.
- Zhang C, Zhang M, Wang S, Han R, Cao Y, Hua W, Mao Y, Zhang X, Pang X, Wei C, Zhao G, Chen Y, Zhao L (2010)** Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. *The ISME Journal*, 4: 232-241.
- Zoetendal EG, Collier CT, Koike S, Mackie R, Gaskins R (2004)** Molecular Ecological Analysis of the Gastrointestinal Microbiota: A Review. *The Journal of Nutrition*, 134 (2): 465-472.