

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**



**DIVERSIDAD DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS
ADHERENTES EN BIOPSIAS DE MUCOSA COLÓNICA DE
PACIENTES CHILENOS Y ESPAÑOLES CON ENFERMEDAD DE
CROHN Y COLITIS ULCEROSA**

Tesis
Entregada a la
Universidad de Chile
en Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
para Optar Al Grado De

DOCTOR EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN MICROBIOLOGÍA

Por

NAYARET LIA CHAMORRO VELOSO

Enero, 2019

**DIRECTOR DE TESIS DR: ROBERTO VIDAL ÁLVAREZ
CODIRECTORES: MARCELA A. HERMOSO RAMELLO
RAMÓN ROSSELLÓ-MÓRA**

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata:

NAYARET LIA CHAMORRO VELOSO

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctoren Ciencias Biológicas con mención en Microbiología, en el examen de Defensa Pública de Tesis rendido el día

Director de Tesis:

Dr. Roberto Vidal Álvarez

Co-Directores de Tesis

Dra. Marcela A. Hermoso Ramello

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Francisco Chávez (presidente)

Dr. Romilio Espejo

Dra. Mónica Imarai

Dr. Andrés Marcoleta

RESUMEN BIOGRÁFICO

Nací en primavera, un 24 de septiembre del año 1986. Me inscribieron como Nayaret, nombre a veces pronunciado como Margaret, Nazaret o Marjorie. Así que gracias a esto uso mi segundo nombre, Lia, para comprar comida rápida cuando piden mi nombre en el MacDonald's pero eso es parte de otra historia.

Desde que tengo uso de razón desarrollé amor por la naturaleza, la curiosidad sobre su origen y funcionamiento, siendo así la biología mi materia favorita. Toda la enseñanza media la realicé en el colegio Mater Dei. El año 2006 ingresé a estudiar biología en la Pontificia Universidad Católica de Chile, desarrollando mi tesis de pregrado en el laboratorio del Dr Alejandro Venegas titulándome como Bióloga con mención en Bioprocesos el año 2012.

En el año 2013 ingresé al programa de Doctorado en Ciencias con mención en Microbiología. Realicé dos pasantías, en los años 2014 y 2016 en Palmas de Mallorca, España, bajo la tutela de Dr Ramon Rosselló-Móra, en donde aprendí a trabajar con datos de secuenciación masiva. El 23 de septiembre del 2018 aprobé mi examen privado y el 22 de Enero de año 2019 mi examen público.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a la Fundación Maria Ghilardi, por otorgarme la beca para estudios de postgrado durante el año 2013, a la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICYT-21140975), por otorgarme la beca para estudios de Doctorado (años 2014-2017) y al proyecto FONDECYT 1161161 por financiar esta investigación .

Segundo, quisiera agradecer a los miembros de la comisión evaluadora. Dr. Francisco Chávez, Mónica Imarai, Romilio Espejo y Andrés Marcoleta por los comentarios y sugerencias brindadas en las diferentes etapas de esta tesis.

También quiero agradecer a mi tutor Dr. Roberto Vidal por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y confiar en mí para emprender una nueva línea de investigación. A mi co-tutores Dr. Ramon Rosselló-Móra, por recibirme en Palma de Mallorca enseñarme a trabajar con datos de secuenciación masiva, y a la Dra Marcela Hermoso Ramello por su ayuda con el trabajo de muestras de biopsias. También al Dr Felipe del Canto por sus consejos y ayuda en temas informáticos.

A mis compañeros de doctorado Javiera Ortiz, Nia Oetiker, Maria Isabel, Jorge Lévicán (quien no tiene parentesco con la Dra Lévicán), María Soledad Gutiérrez y Mario Carrasco, por sus consejos, cariño, ñoñez y apoyo. Sobre todo durante el primer año, en el cual casi nos transformamos en un grupo de terapia.

A mis compañeros de laboratorio Daniela Gutiérrez, Leandro Cádiz (alias LCN), Sandra Céspedes, Mirka Pardo, Alexia Torres y Alfonso Miranda por la alegría, locuras, ayuda y la buena música sintonizada en las jornadas laborales. A mis compañeros del laboratorio MMG en Mallorca, Carlota Colomo, Merit Mora, Sara Díaz, Tomeu Viver, Mercedes Urdai y Xisca Font (la futura alcaldesa de Esporles) por el cariño, paciencia ayuda y meriendas. Agradezco especialmente a Raúl Muñoz por su compañía, por llevarme todos los días al instituto, por mostrarme al grupo “Las Bistecs” y cocinar junto a su novio mi última cena en esa maravillosa isla. También quiero agradecer al grupo Telepollo, por las actividades recreacionales en las que se incluyeron paseos y las tardes de conversación. Quiero destacar la participación de Ximena Alemany Errázuriz, quien le dio prestancia y distinción a este grupo.

A mis amigos: Daniela Gutiérrez y Jorge Levican por ser mi contención en los momentos difíciles tanto en lo académico como en lo personal, sobre todo en el tercer año de doctorado (ustedes saben el porqué). La salida al Quitapenas, el trekking a Yerba loca y Aguas de Ramón, y el rafting fueron como una terapia para mí. Dani G, gracias por las conversaciones, por compartir lo que te duele, gracias por las locuras en vacaciones, por hacerme reír con las ocurrencias y los concursos que realizamos en el lab, por entender y compartir ese humor negro que llevamos dentro. Ese que sólo con ciertas personas puedes sacar a flote.

A mis hermanas no sanguíneas: Paulina Merino y Carroll Hernández, gracias por enseñarme que la amistad es incondicional, por ser mis consejeras, por entregarme su hombro, oído y abrazos cuando más lo necesite. Gracias por esas conversaciones sin tapujos ni prejuicios. Gracias por confiarme sus penas y alegrías. Y por enseñarme lo fuerte que puede ser una mujer, no importa cuántas veces te rompan el corazón, siempre puedes ponerte de pie y seguir caminando con el más puro estilo. Admiro profundamente su fortaleza y entereza frente a la vida.

A mi amigo, consejero espiritual y esposo del alma Pablo Gallardo. Tendría que escribir un libro completo sobre ti para agradecerte. Sin duda, una de las mejores cosas que me ha pasado durante el doctorado fue conocerte. He aprendido de ti tanto en lo intelectual como en lo emocional, admiro tu luz, tu energía y resiliencia. Gracias por estar siempre cuando te he necesitado, sin importar la hora o el lugar. Gracias por tu cariño, apapachos, bailes, alegrías y darme a conocer el big bobba tea. Te adoro, eres MaraBenyoncé!

Por último quiero agradecer a mi familia. A mis padres María Soledad Veloso (alias Marisol o Pochol) y David Chamorro (alias Chamorrin), por la paciencia y el amor. Madre, eres la mujer más fuerte que he conocido, no te imaginas cuando te admiro por eso, gracias por tu amor incondicional. Padre, gracias por enseñarme que en ocasiones las palabras sobran y que el cariño también se puede demostrar con gestos simples. Hermano y amigo, David Chamorro (alias didículo), gracias por tus consejos, abrazos, cariño y complicidad, te amo y eres el mejor hermano que alguien puede tener. Por último, gracias a mi perrito Gaspar, por ayudarme con su compañía en los momentos de estrés y alegrarme los días con su movimiento de colita.

INDICE DE MATERIAS

AGRADECIMIENTOS	II
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABLAS	VIII
LISTA DE ABRAVIACIONES	IX
RESUMEN	1
ABSTRACT	4
1. INTRODUCCION	7
1.1. GENERALIDADES	7
1.2. UTILIZACION DE UNIDADES OPERACIONALES PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA	10
1.3. COMPARACION DE RESULTADOS DE MICROBIOA OBTENIDOS A PARTIR DE BIOPSIAS Y MUESTRAS DE HECES	11
1.4. CARACTERIZACION DE LA MICROBIOTA INTESTINAL	12
1.5. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL (EII) Y FACOTES DE RIESGO	14
1.6. MICROBIOTA EN EII	17
1.7. HIPOTESIS DEL OXIGENO EN LA DISBIOSIS INTESTINAL	19
1.8. PEPTIDOS ANTIMICROBIANOS (PAMs) Y MICROBIOTA INTESTINAL	21
1.9. CATELICIDINA HUMANA (CAMP)	22
1.10. ALFA (α -) DEFENSINAS	24
1.11. BETA (β -) DEFENSINAS	24

1.12. EXPRESION DE PAMs EN EII	25
HIPOTESIS	28
OBJETIVO GENERAL	28
OBJETIVOS ESPECIFICOS	28
2. MATERIALES Y METODOS	29
2.1. RECLUTAMIENTO DE PACIENTES Y OBTENCION DE BIOPSIAS	29
2.2. EXTRACCION DE ACIDOS NUCLEICOS, AMPLIFICACION DEL 16S Y PIROSECUENCIACION	33
2.3. TRIMADO DE SECUENCIAS, VERIFICACION DE QUIMERAS AGRUPACION DE OTUs	34
2.4. CONSTRUCCION DE ARBOL FILOGENETICO Y ASIGNACION DE OPUs	35
2.5. ANALISIS ESTADISTICOS	36
2.6. ESPECIES INDICADORAS	37
2.7. TRANSCRIPCION REVERSA Y PCR-TIEMPO REAL (qRT-PCR)	37
2.8. CORRELACIONES Y RED BACTERIANA	39
3. RESULTADOS	
3.1. OBJETIVO ESPECIFICO N°1: DETERMINAR LA COMPOSICION DE LA MICROBIOTA BACTERIANA DE COLON EN PACIENTES COLON EN PACIENTES CON EC, CU Y CTL	40
3.1.1 COMUNIDADES MICROBIANAS EN INDIVIDUOS EII Y CTL	40
3.1.2 DISTRIBUCION DE INDIVIDUOS CON EII Y CTL SEGÚN SU COMPOSICION MICROBIANA	47

3.1.3. COMPOSICION BACTERIANA DE ACUERDO A LOS CINCO GRUPOS EII DEFINIDOS	51
3.1.4. ANALISIS DE LA IDENTIDAD DE LOS OPU _s RELEVANTES QUE DISCRIMINAN PARA CADA UNO DE LOS CINCO GRUPOS CARACTERIZADOS	54
3.1.5. ABUNDANCIA RELATIVA DE ANAEROBIOS FACULTATIVOS, ESTRICTOS Y AEROBIOS EN OPU _s INDICADORES	59
3.2. OBJETIVO ESPECIFICO 2: CONSTRUIR REDES DE ASOCIACION BIOLOGICA ENTRE LA MICROBIOTA BACTERIANA COLONICA DESCRITA EN INDIVIDUOS EC, CU Y CTL	61
3.2.1. REDES DE ASOCIACION BASADAS EN LA ABUNDANCIA RELATIVA Y COEXISTENCIA BACTERIANA ENTRE OPU _s INDICADORES PARA CADA GRUPO DE PACIENTES	61
3.3. OBJETIVO ESPECIFICO N°3: DETERMINAR LOS NIVELES DE EXPRESION RELATIVA DE LOS PAM _s (hBD2-4) Y CAMP EN PACIENTES CON EC, CU Y CTL	65
3.3.1. EXPRESION RELATIVA DE PAM _s EN INDIVIDUOS EC, CU Y CTL	65
4. DISCUSION	68
5. CONCLUSIONES	78
6. REFERENCIAS	80
7. MATERIAL SUPLEMENTARIO	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Curvas de rarefacción	42
Figura 2.	Análisis de agrupamiento de muestras	44
Figura 3.	Abundancia relativa a nivel de phylum	46
Figura 4.	Comparación de abundancia relativa a nivel de phylum según la condición clínica y el país de origen de los individuos en estudio	47
Figura 5.	Análisis de agrupamiento de muestras chilenas y españolas con EC, CU y CTL	49
Figura 6	Dependencia entre las variables	51
Figura 7.	Abundancia relativa de las phyla bacterianas	52
Figura 8.	Abundancia relativa de las clases bacterianas	53
Figura 9.	Abundancia relativa de OPUs indicadores afiliados a bacterias Anaerobias estrictas/facultativas y aerobias estrictas	60
Figura 10.	Matriz de correlación entre OPUs relevantes que discriminan a cada grupo	62
Figura 11.	Red de co-ocurrencia bacteriana de especies indicadoras	63
Figura 12.	Curvas de expresión de PAMs	66
Figura 13.	Expresión relativa de péptidos antimicrobianos	67
Figura 14.	Esquema de disbiosis intestinal de acuerdo a cada uno de los grupos	77

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Umbral taxonómico de bacteria y archaea	9
Tabla 2	Datos clínicos de pacientes	31
Tabla 3.	Partidores para secuenciación en plataforma 454	34
Tabla 4.	Partidores para qRT-PCR de PAMs	38
Tabla 5,	Distribución de lecturas y OPUs por grupos	41
Tabla 6.	Matriz de contingencia	50
Tabla 7.	Abundancia relativa de OPUs relevantes para los grupos EII-1, EII-2, EII-3, EII-5, EII-4.	58

LISTA DE ABREVIACIONES

16S ARNr:	ARN 16S ribosomal
18S ARNr:	ARN 18S ribosomal
5-ASA:	Aminosalicilatos
ECAI:	<i>Escherichia coli</i> adherente invasiva
APC:	Célula presentadora de antígeno
ARN:	16S ARNr
ATG16L1:	Autophagy-related protein 16-1
CAMP:	Catelicidina
CH:	Chile
Cort:	Corticoides
CTL:	Control
CU:	Colitis Ulcerosa
Des	Desviación estándar
DGGE:	Electroforesis con gradiente de desnaturalización
DNBS:	Acido sulfónico dinitrobenceno
EC:	Enfermedad de Crohn
ECM1:	Proteína de matrix extracelular 1
EII:	Enfermedades inflamatorias intestinales
ERVD:	Elementos de respuesta a vitamina D
ES:	España
GADPH:	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

hBD:	Beta defensina humana
HDP:	Alpha beta defensina humana
IFN- γ :	Interferon gamma
IgA:	Inmunoglobulina A
IL:	Interleuquina
Inmprs:	Inmunosupresores
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IRGM:	Immunity-related guanosine triphosphatase
kDa:	Kilodalton
LPS:	Lipopolisacárido
LTP:	Living Tree Project
MDP:	Muramil dipéptido
mmHg:	Milímetro de mercurio
MUC:	Mucina
NF- κ B:	Factor de transcripción nuclear kappa B
NJ:	Neighbor-joining
NO:	Oxido nítrico
NO ₃ ⁻ :	Nitrato
NOD2:	Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2
OPUs:	Unidades Filogenéticas Operacionales
OTUs:	Unidades Taxonómicas Operacionales
PAMs:	Péptidos antimicrobianos
PGN:	Peptidoglicano
PPAR- γ :	Receptor activado por proliferadores de peroxisoma gamma
qRT-PCR:	Transcripción reversa cuantitativa en tiempo real

S.I;	Sin lecturas asociadas
S.T:	Sin tratamiento
T.B:	Terapia biológica
TNF:	Factor necrótico tumoral
T-RLFP:	Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción terminal
UPEC:	<i>Escherichia coli uropatogénica</i>

RESUMEN

La mayor concentración y diversidad de microorganismos asociados a la microbiota humana reside en el intestino, estableciendo una relación comensal o mutualista con el hospedero, la cual puede verse interrumpida cuando la estructura y composición microbiana es alterada (disbiosis). La disbiosis puede estar asociada a cambios en la dieta, el uso de antibióticos y en una serie de enfermedades, entre ellas las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) como Colitis Ulcerosa (CU) y Enfermedad de Crohn (EC). Si bien la mayor parte de los estudios sobre microbiota intestinal se han realizado a partir de muestras de heces debido a su fácil obtención, la microbiota adherente del colon es la más representativa de la comunidad microbiológica que co-evoluciona con el hospedero en el transcurso de la enfermedad, pues ésta puede interactuar de forma más directa con el sistema inmunitario. Considerando los antecedentes expuestos el objetivo de esta tesis es la caracterización de la microbiota adherente de individuos con EII mediante análisis de secuenciación masiva y generación de librerías de rDNA16S, a partir de muestras de biopsias de individuos chilenos y españoles (n=66) diagnosticados con EC, CU y controles (CTL). Nuestros resultados mostraron diferencias significativas entre la abundancia relativa de las phyla *Proteobacteria* y *Firmicutes* entre individuos con EII y CTL, sin embargo no observamos diferencias significativas entre la microbiota de individuos con CU y EC. Por otro lado, a diferencia de los estudios realizados con muestras de heces, donde los individuos con EII fueron clasificados en grupos únicos y definidos (EC, CU o CTL), en nuestro estudio los individuos con EII se clasificaron en 5 grupos distintos según su composición microbiana. Los grupos denominados EII-1, EII-3, EII-2 y EII-5 albergaron únicamente individuos con EC y CU, presentando un enriquecimiento de las phyla

Bacteroidetes (34.5%), *Proteobacteria* (75.4%), y de las Unidades Filogenéticas Operacionales (OPUs) afiliadas a las bacterias *Ruminococcus gnavus* (9.75%); *Cupriavidus necator/Ralstonia pickettii* (6.60%); *Brevundimonas diminuta/Brevundimonas vancouverensis* (5.87%) y *Klebsiella oxytoca* (32.16%). El grupo EII-4 contuvo individuos con EII y CTL mostrando un enriquecimiento del phylum *Firmicutes* (59.85%) y OPUs afiliados a *Faecalibacterium prausnitzii* (14.67%), (bacteria características de individuos sanos). Sumado a los anteriores aquellos individuos pertenecientes a los grupos EII-3, EII-2 y EII-5 presentaron abundancias que abarcaron entre el 12.74 al 55.60% en OPUs afiliados a bacterias anaeróbicas facultativas y abundancias del 4.25% al 9.68% en OPUs afiliados a bacterias aeróbicas estrictas. Por el contrario, los grupos EII-4 y EII-1 abarcaron abundancias del 41.21% al 45.3% en OPUs afiliados a bacterias anaerobias obligadas y abundancias cercanas al 1.5% en OPUs afiliados a bacterias aerobias estrictas. Además, los análisis de correlación mostraron asociaciones negativas entre los OPUs anaerobios facultativos o aerobios, (indicadores de individuos con EII pertenecientes a los grupos EII-1, EII-2, EII-3, EII-5) con aquellos OPUs anaerobios (indicadoras de EII-4). Este tipo de correlación da cuenta de relaciones de competencia (exclusión) entre estas bacterias, dadas posiblemente por las condiciones ambientales del intestino, es decir un incremento en los niveles de oxígeno durante el proceso de inflamación. Estos resultados concuerdan con lo sugerido en la “hipótesis del oxígeno”, donde se plantea que en condiciones de inflamación crónica las paredes intestinales de individuos con EII conducen a una mayor liberación de hemoglobina (que lleva oxígeno), y especies reactivas de oxígeno a la luz del intestinal. Sumado a lo anterior, los colonocitos bajo señales pro-inflamatorias realizarían un cambio en su metabolismo hacia una glicólisis anaeróbica, la cual no consume oxígeno permitiendo que este difunda hacia el epitelio intestinal conduciendo así un ambiente favorable para bacterias anaerobias facultativas y aerobias.

En este contexto, uno de los componentes de la respuesta inmune innata que parece controlar la población que conforma la microbiota intestinal son los péptidos antimicrobianos (PAMs). Entre los PAMs estudiados en el epitelio colónico se encuentran las Catelicidina (CAMP) y β -defensinas (hBD), los cuales poseen actividad antimicrobiana sobre grupos bacterianos específicos. Modelos murinos que sobreexpresan PAMs muestran una disbiosis con respecto a sus pares silvestres, dando cuenta de la importancia de los PAMs como reguladores de la composición microbiana intestinal. Adicionalmente, investigaciones recientes han demostrado que pacientes con EII poseen una expresión alterada de PAMs con respecto a individuos CTL. En esta línea de pensamiento, esta tesis propuso como hipótesis “El aumento de la población de *Proteobacteria* observado en la mucosa intestinal en pacientes con EC con respecto a pacientes CU, se asocia con la disminución en la expresión de péptidos antimicrobianos CAMP y hBD 2-4”. Sin embargo, debido al bajo número de muestras que permitieran obtener un RNA íntegro y de calidad para analizar los niveles de expresión de los PAMs CAMP y hBD-2, no fue posible demostrar que nuestros resultados fueron significativos en la correlación con respecto a los phylum bacterianos. En esta condición esta hipótesis no puede ser aceptada ni rechazada.

ABSTRACT

The highest concentration and diversity of microorganisms belonging to the human microbiota reside in the intestine, establishing a commensal or mutualistic relationship with the host. This relationship can be modified when the microbial structure and composition is altered (dysbiosis). Dysbiosis may be associated to changes in diet, use of antibiotics and to a number of diseases, including inflammatory bowel diseases (IBD) such as Ulcerative Colitis (UC) and Crohn's Disease (CD). Although, due to the easiness to collect them, most of the studies on intestinal microbiota are carried out analyzing stool samples, the adherent microbiota of the colon is representative of the microbial community which co-evolves with the host, interacting directly with the immune system, during the course of the disease. Considering the above, the aim of this thesis was to characterize the adherent microbiota of individuals suffering IBD by means of massive sequencing analysis. Samples (biopsies) were obtained from Chilean and Spanish individuals (n = 66) diagnosed with CD, UC, and control (CTL). Our results showed significant differences between the relative abundance of phyla *Proteobacteria* and *Firmicutes* among individuals with IBD and CTL but no differences were observed when comparing the microbiota of individuals with UC and CD. Unlike the studies based on stool samples, in which individuals with IBD are classified as unique and defined groups (CD, CU or CTL) in our study individuals with IBD were classified into five different groups according to their microbial composition. Groups IBD-1, IBD-3, IBD-2 and IBD-5 contained only individuals with CD and UC, presenting an enrichment of phyla *Bacteroidetes* (34.5%) and *Proteobacteria* (75.4%) and Operational Phylogenetic Units (OPUs) affiliated with bacteria *Ruminococcus gnavus* (9.75%) ;

Cupriavidus necator / *Ralstonia pickettii* (6.60%); *Brevundimonas diminuta* / *Brevundimonas vancouveriensis* (5.87%) and *Klebsiella oxytoca* (32.16%). Group IBD-4 contained individuals with IBD and CTL showing an enrichment of phylum *Firmicutes* (59.85%) and OPUs affiliated with *Faecalibacterium prausnitzii* (14.67%), (bacterium characteristic of healthy individuals). In addition to the above, individuals belonging to groups IBD-3, IBD-2 and IBD-5 showed abundances between 12.74 to 55.60% of OPUs affiliated to anaerobic or facultative bacteria, and abundances of 4.25% to 9.68% of OPUs affiliated to obligate aerobes. On the contrary, groups IBD-4 and IBD-1 showed abundances of 41.21% to 45.3% of OPUs affiliated with obligated anaerobic bacteria and abundances close to 1.5% of OPUs affiliated to obligated aerobic bacteria. In addition, correlation analyzes showed negative associations between facultative anaerobic and aerobic OPUs (indicators of individuals with IBD belonging to groups IBD-1, IBD-2, IBD-3, IBD-5) with those obligated anaerobic OPUs (indicators of IBD-4). This kind of correlation exemplifies competition relationships (exclusion) between these bacteria, possibly due to the environmental conditions of the intestine, i.e. an increase in oxygen levels during the process of inflammation. These results are consistent with the "oxygen hypothesis" which proposes that ~~in~~ under conditions of chronic inflammation, causing the release of oxygen carrying hemoglobin in the intestinal mucosa and reactive oxygen species in the intestinal lumen. In addition, colonocytes under pro-inflammatory signals shift their metabolism towards an oxygen consuming anaerobic glycolysis, increasing epithelial oxygenation which leads to a favorable environment for facultative and aerobic bacteria.

One of the components of the innate immune response that seems to control the microbial population are the antimicrobial peptides (AMPs). Among the AMPs studied in the colonic epithelium, Cathelicidin (CAMP) and β -defensins (hBD), which have antimicrobial activity on specific bacterial groups, can be mentioned. Murine models overexpressing AMPs

showed a dysbiosis when compared to their wild type mates, revealing the importance of AMPs as regulators of the intestinal microbial composition. Additionally, recent research showed that patients with IBD have an altered expression of AMPs when compared to CTL individuals. In this context, this thesis proposed the following hypothesis: "The increase in the population of *Proteobacteria* observed in the intestinal mucosa in patients with CD when compared to patients with UC is associated with the decrease in the expression of antimicrobial peptides CAMP and hBD 2-4". However, due to the low number of samples that allowed to obtain a high-quality RNA to analyze the levels of expression of the CAMP and hBD-2 MAPs, it was not possible to demonstrate that our results were significant in the correlation of MAPs with bacterial phyla. In this condition this hypothesis cannot be accepted or rejected.

1. INTRODUCCION

1.1 Generalidades

Desde el nacimiento, el ser humano está colonizado por una gran variedad de microorganismos los cuales constituyen la microbiota humana. La mayor parte de la microbiota reside en el intestino, los simbioses que la constituyen en su mayoría son comensales o mutualistas y su estructura es relevante para la mantención de la homeostasis y salud humana. Además, ejerce funciones metabólicas, estimula el desarrollo del sistema inmune y se comporta como una barrera frente a organismos patógenos (1) .

Durante muchos años las técnicas de cultivo y tipificación bioquímica fueron utilizadas como los métodos estándar para la identificación de especies bacterianas, entregando una información parcial o sesgada, particularmente en relación al estudio de microorganismos que no podían ser cultivados bajo las condiciones de laboratorio o se encontraban en un estado viable pero no cultivable. Hacia la década de los 90, las técnicas basadas en estudios moleculares (independientes del cultivo microbiológico tradicional) provocaron toda una revolución en relación a la cantidad de información que comenzaron a generar, entregándonos una aproximación más realista respecto de la conformación de la microbiota. Estas técnicas tenían como objetivo la caracterización de los polimorfismos presentes en las secuencias de la subunidad pequeña del ARN ribosomal (16S ARNr), como por ejemplo, la electroforesis con gradiente de desnaturalización (DGGE), el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción terminal (T-RLFP), los micro-arreglos de ADN y las plataformas de secuencias de

siguiente generación (Next Generation Sequencing; NGS) (2) . Esta última herramienta ha sido ampliamente utilizada en estudios para determinar la estructura de comunidades microbianas, pues otorga de forma paralela un número masivo de templados de ADN. Además, al finalizar el proceso es posible realizar una identificación microbiana con una base filogenética y coleccionar datos cuantitativos respecto de la representación de las distintas categorías taxonómicas que conforman la comunidad microbiana (3).

Por otro lado, la clasificación de especies bacterianas está basada en la determinación de un conjunto de caracteres tanto genómicos como fenotípicos. Para lograr lo anterior, es necesario disponer de los microorganismos en cultivo puro, pues para que una especie sea aceptada según el código bacteriológico, ésta debe ser designada como material tipo, depositada en dos colecciones internacionales de cultivos y en países distintos(4). Las especies bacterianas se clasifican dentro de un sistema jerárquico, equivalente al que se ha determinado para los organismos eucariotas y que fue originalmente diseñado por Lineo en su sistema botánico (5). Sólo se considera a las especies como entidades reales, mientras que las jerarquías de categorías superiores que albergan a las especies (género, familia, orden, clase y phylum) son consideradas abstractas y de alguna manera artificiales (5). Sin embargo, el uso del gen rDNA16S también ha sido utilizado para poder evaluar la presencia de distintos taxones en ambientes naturales y de forma independiente al cultivo. Para lograr lo anterior, se han debido calcular ciertos umbrales de identidad de secuencias que permiten establecer si dos o más organismos pertenecen a una misma o distinta categoría taxonómica a nivel de phylum, clase, género o especie (Tabla 1) (6).

Tabla 1 | Umbrales taxonómicos de bacteria y archaea*

	Especie	Género	Familia	Orden	Clase	Filo
Umbrales de identidad	98,7%	94,5%	86,5%	82,0%	78,5%	75,0%

*Tabla modificada de la revisión de Yarza y colaboradores (6). Los umbrales fueron basados en el conjunto de datos de Living Tree Project (LTP) 102.

Hasta ahora, al analizar los diversos estudios de secuenciación masiva por amplicones, no existe un verdadero consenso en relación a cuál de las regiones variables del 16S ARNr debería ser utilizada como blanco para los estudios de identificación taxonómica. Mientras Liu y colaboradores (7) sugieren que la secuenciación de las regiones variables V2 y V3 son óptimas para explorar la diversidad bacteriana, Huse y colaboradores (8) argumentan que la secuenciación de las regiones variables V3 y V6 proveen una mejor asignación taxonómica. Así mismo el grupo de Wang (9) sugiere que la región V2 y V4 proveen una mejor asignación a nivel de género. Recientemente Yarza y colaboradores (6) postularon que dado al grado de variabilidad entre las diferentes regiones del gen rDNA16S, es de esperar que la resolución a nivel de asignación taxonómica en sus distintas categorías dependa de la región variable del gen 16S ARNr que sea secuenciada. Estos autores calcularon los umbrales taxonómicos, tanto para las distintas regiones variables del gen rDNA16S como para la secuencia completa de este gen. En este estudio, se tomaron como referencia un conjunto de secuencias completas del gen y las especies tipo previamente clasificadas, las que fueron colectadas desde la base de datos del Living Tree Project (LTP). Los resultados permitieron observar que las regiones por si mismas, previamente definidas para el rDNA16S, o la combinación de regiones variables claramente subestiman enormemente la riqueza del set de datos del LTP, especialmente en los rangos

taxonómicos más altos (por sobre la categoría de género) (6) . El sesgo de la sub-estimación se va corrigiendo conforme aumenta la longitud de la secuencia, y es por ello que los análisis que incluyen los primeros 750 nucleótidos del rDNA16S, son suficientes para discriminar sobre el 90% del total de la riqueza de la muestra para las categorías de familia, género y especie (6). Por ende la secuencia completa del gen rDNA16S es requerida para una estimación y clasificación taxonómica más precisa.

1.2 Utilización de unidades operacionales para la caracterización de microbiota

Los estudios sobre la diversidad microbiana agrupan el conjunto de secuencias del gen rDNA16S (tomando como base el porcentaje de su identidad), denominándolas OTUs (Unidades Taxonómicas Operacionales). Un OTU está formado por un conjunto de secuencias agrupadas por un mínimo umbral de identidad, donde el porcentaje de identidad utilizado varía entre el 97-98,7%, para diferentes estudios (6, 10, 11). Sin embargo, debido a que el proceso de secuenciación puede entregar secuencias de diversas longitudes para un set de muestras (previniendo así una clara asignación a nivel de género y especie), se ha propuesto utilizar OPUs (Unidades filogenéticas Operacionales) en lugar de OTUs para la asignación taxonómica. En este sentido, la confección de OPUs no se basa en umbrales de identidad ya que las secuencias son insertadas en un árbol filogenético depurado utilizando el algoritmo de Parsimonia (12, 13). De este manera, la afiliación se realiza por inferencia filogenética, basada en la señal genealógica de las secuencias que es relativamente independiente de la longitud de éstas y minimiza la influencia de los errores. En otras palabras, la incorporación en un OPU está basada en la afiliación filogenética de la secuencia (6, 13) . Los OPUs están formados por un conjunto de secuencias que comparten una misma historia evolutiva y que por lo tanto, forman

una rama independiente en una reconstrucción filogenética. La discriminación de OPUs se realiza mediante un análisis de la topología del árbol y la decisión sobre el punto de circunscripción es dependiente de que se identifique como un clado monofilético independiente. Un clado puede albergar secuencias con diversos valores de identidad, así mismo un clado puede contener uno o más OTUs compartiendo la misma historia evolutiva. Debido a ello se considera que la agrupación por OPUs tendría un valor más significativo que al agrupar por OTUs, pues este sistema de afiliación tiene una base filogenética (13) . Por otro lado, el enfoque de OPUs reduce la diversidad observada por los OTUs, produciendo resultados de mayor confianza (13) .

En este sentido, en el campo clínico donde el exhaustivo conocimiento acerca de la conformación del microbioma humano es clave para entender las relaciones entre la microbiota y las enfermedades, este nuevo tipo de análisis y asignación taxonómica resulta ser clave. Desde la aparición de NGS, el análisis estructural de las comunidades microbianas en distintos órganos y tejidos genera gran interés, en particular las presentes en el intestino.

1.3 Comparación de resultados de microbiota obtenidos a partir de biopsias y muestras de heces

Hasta ahora, la mayor parte de los estudios sobre la composición microbiana intestinal se ha realizado a partir de muestras de heces. Lo anterior, debido a su fácil accesibilidad y a que permiten repetir el muestreo de los individuos a través del tiempo sin grandes complicaciones. Sin embargo, las comunidades microbianas fecales no representan con precisión las comunidades bacterianas que viven en el tracto gastrointestinal y que se distribuyen localmente (por ejemplo, colon, íleo e intestino delgado) (14, 15). Por otro lado, el almacenamiento inadecuado de las muestras de heces puede producir una alteración en la composición microbiana, la cual depende de la disponibilidad de nutrientes y la concentración de oxígeno

(16). Publicaciones recientes han demostrado que la composición microbiana de los individuos se agrupa separadamente según provenga éste resultado de muestras de heces o biopsias, sugiriendo que el lumen intestinal y la mucosa intestinal pueden ser colonizados por distintas comunidades microbianas (16-18). Estudios comparativos entre ambos tipos de muestras han permitido observar que algunos miembros del phylum *Firmicutes*, como *Lactobacillus* spp., se encuentran en mayor abundancia en muestras de heces en comparación a las muestras de biopsias tomadas desde un mismo individuo (17, 18). Por el contrario el phylum *Proteobacteria* se encuentra en mayor abundancia en muestras de biopsias en comparación a las muestras de heces (17). Las diferencias entre las comunidades microbianas de ambos tipos de muestras reflejan los diferentes procesos fisiológicos que se producen en la luz intestinal respecto de la mucosa (17). Mientras las muestras fecales reflejan el entorno luminal (incluidas las bacterias ingeridas con los alimentos), las bacterias de la mucosa intestinal interactuarían directamente con las células del hospedero, siendo estas últimas representativas de un microbioma endógeno que coevoluciona con el huésped (19). Sumado a lo anterior, se ha propuesto que las interacciones hospedero-microorganismo son relevantes para la generación de síntomas en ciertos desordenes gastrointestinales como el colon irritable (20), debido a esto el estudio de la microbiota obtenido desde biopsias genera gran interés.

1.4 Caracterización de la microbiota Intestinal

Existen estudios que han determinado que la composición filogenética de las comunidades bacterianas evoluciona hacia una conformación adulta más estable dentro de los primeros 3 años de vida. Desde el nacimiento, la diversidad bacteriana incrementa con la edad, por lo tanto, las variaciones interpersonales son mayores en comparación a los adultos (21) . A

edades tempranas, los grupos bacterianos dominantes corresponden al género *Bifidobacterium*, perteneciente al phylum *Actinobacteria*, seguido por diversos géneros de *Bacteroides* y *Enterobacterias* (22) , mientras que en los adultos disminuyen las *Actinobacterias*, particularmente *Bifidobacterium*, siendo las phyla *Firmicutes* y *Bacteroidetes* la microbiota dominante del intestino(23) .

La microbiota intestinal se agrupa en tres enterotipos distintos, independiente de la zona geográfica, indicando que la variación de la microbiota intestinal es estratificada y no continua. Tales enterotipos son identificables por la variación en los niveles de los géneros *Bacterioides* (Enterotipo 1), *Prevotella* (Enterotipo 2) y *Ruminococcus* (Enterotipo 3) (23) .

Adicionalmente, los estudios de metatranscriptomas han determinado que la mayoría de las secuencias pertenecientes al phylum *Firmicutes* corresponden al orden de los *Clostridiales*, siendo *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae* las familias más representadas (24) . Estas dos familias son importantes degradadores de pectina, celulosa y participan activamente en la fermentación de fibras dietarias en el colon. Específicamente *Ruminococcaceae* fue asociada principalmente con la biosíntesis de antibióticos, reflejando su importancia en la defensa contra patógenos. *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae* y *Rickenellaceae*, familias pertenecientes al phylum *Bacteroidetes*, son otros de los componentes funcionalmente significativos de la microbiota intestinal humana (24) .

Como ha sido mencionado anteriormente, la relación simbiótica entre la microbiota comensal y su hospedero puede verse interrumpida cuando la composición microbiana es alterada (disbiosis). La disbiosis microbiana intestinal ha sido asociada entre otros, a cambios en la dieta del individuo (25) , el uso de antibióticos (26) y a una serie de enfermedades (27-29) , entre ellas las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) (30, 31).

1.5 Enfermedad inflamatoria intestinal (EII) y factores de riesgo

Entre las EIIs se encuentran la enfermedad de Crohn (EC) y la Colitis Ulcerosa (CU). Mientras la EC es una inflamación transmural que puede afectar cualquier región del tracto gastrointestinal (desde la boca hasta el ano) provocando un engrosamiento de la pared intestinal, la CU se caracteriza por una inflamación y ulceración del recto (pudiendo extenderse de forma difusa hacia el colon)(32). La incidencia de ambas enfermedades a nivel mundial ha ido en aumento, registrando los mayores valores de prevalencia en Europa (CU: 505/100 000 hab en Noruega; EC: 322/100 000 hab en Alemania) y Norteamérica (CU: 286/100 000 en USA; EC: 319/100 000 hab en Canadá). Desde 1990, la incidencia ha ido en aumento en los continentes y países recientemente industrializados, tales como África, Asia y América del Sur, incluido Brasil (33). En Chile, no existen datos de incidencia y prevalencia de estas enfermedades, no obstante, la experiencia clínica muestra un aumento en la atención de pacientes con EIIs en los últimos años (34, 35).

Tanto la EC como la CU se caracterizan por periodos de actividad, los cuales se presentan con dolor abdominal, fiebre, signos clínicos de obstrucción intestinal y diarrea sanguinolenta con o sin mucosidad; mientras los estados de remisión se caracterizan por la ausencia de síntomas. La aparición de ambos periodos varía según los pacientes, en algunos casos la remisión puede durar años, mientras que en otros se puede producir intervalos de tiempo reducidos (36). El diagnóstico clínico de ambas enfermedades conlleva exámenes físicos, estudios de laboratorio, exámenes patológicos e histológicos. De acuerdo a estos resultados, los pacientes con EC son reconocidos según la clasificación de Montreal, que consta de tres categorías: Edad de diagnóstico (A), Localización de la enfermedad (L), donde es posible distinguir las de tipo: L1 si

es íleo, L2 si es colónica, L3 si es íleo-colónica, L4 si la región afectada está por sobre el tracto intestinal. Respecto del patrón evolutivo (B) esta puede ser clasificada en: B1 no obstructivo, no fistulizante (predominan manifestaciones de inflamación), B2 estenosante (comprende fibrosis y engrosamiento de la pared intestinal) y B3 fistulizante (existen comunicaciones entre distintas zonas del tubo digestivo, o con otros órganos) (37). En el caso de la CU, ésta puede ser clasificada según la extensión en: E1 proctitis (inflamación del recto), E2 colitis distal (limitada al colón izquierdo) y E3 colitis extensa (extensión más allá del ángulo esplénico). Asimismo, estos pacientes según sus hallazgos endoscópicos son reconocidos según el subíndice endoscópico de Mayo, donde el índice 0 es remisión, 1 actividad leve, 2 moderada y 3 severa (38).

En cuanto al tratamiento, su objetivo principal es inducir y mantener el periodo de remisión así como también reducir el número y la duración de las recaídas. Para ello los pacientes pueden ser tratados con soportes nutricionales, antiinflamatorios, inmunomoduladores, antibióticos y en algunos casos más graves tratamiento quirúrgico (resección de parte del intestino) (39), no existiendo hasta ahora un tratamiento 100% efectivo (40). El tipo de tratamiento es indicado según la gravedad del paciente y en ocasiones éstos pueden ser combinados. En una primera instancia los pacientes son tratados con fármacos convencionales, los cuales constan de aminosalicilatos (5-ASA), corticoides e inmunomoduladores. Estos últimos, son utilizados en los casos moderados y graves debido a que requieren de un elevado grado de control por parte del especialista al reducir inespecíficamente la actividad del sistema inmunitario (31). En la EII, la terapia biológica es indicada para aquellos pacientes con una condición moderada o grave donde además de inducir y mantener el estado de remisión, este tipo de terapia también tiene como objetivo el cierre de fístulas y la cicatrización de la mucosa (31). Entre algunos de los efectos secundarios de estas terapias se encuentra la cefalea, náuseas, mialgias, artralgias y alteraciones dermatológicas (40).

Aunque la causa etiológica de la EC y la CU es desconocida, se exploran distintos factores que otorgan susceptibilidad, entre los que destacan la genética del individuo, la respuesta inmunológica y el ambiente (37, 38, 41, 42). En cuanto al componente genético, los pacientes con EII poseen una predisposición genética a desarrollar la enfermedad, destacándose polimorfismos en los genes *NOD2*, *IRGM*, *ATG16L1* y *ECM1*, entre otros (43). *NOD2* es un sensor bacteriano citoplasmático, que forma parte de la inmunidad innata y se expresa en células presentadoras de antígeno (APC), monocitos y en células de Paneth presentes en la base de las criptas intestinales (44). *IRGM* (immunity-related guanosine triphosphatase) es un miembro de la familia IRG (immunity-related GTPase genes) que se caracteriza por ser inducido por interferón, conferir resistencia frente a patógenos intracelulares, estar implicado en el proceso de autofagia y formar parte de la inmunidad innata contra patógenos intracelulares (45, 46). *ATG16L1* (Autophagy-related protein 16-1) es una proteína cuya función es participar en la eliminación de patógenos intracelulares mediante el proceso de autofagia (47). *ECM1* codifica para la proteína de matriz extracelular 1, expresada en el intestino delgado y grueso, el cual activa la vía de señalización de NF- κ B, un factor de transcripción clave en la respuesta inmunitaria e inflamatoria (48).

Entre los componentes inmunológicos, los linfocitos T han sido implicados en la patogénesis de la EC y CU en virtud de su elevado número en la mucosa intestinal inflamada y la secreción de una gran cantidad de citoquinas pro-inflamatorias derivadas de estas células. Los pacientes con EC presentan un perfil de citoquinas Th-1, caracterizado por una elevada producción de IFN- γ , TNF α , IL-12 e IL-2, una producción de IL-4 disminuida y formación de granulomas (49-51). En contraste a la EC, pacientes con CU presentan un perfil de citoquinas tipo Th-2, caracterizado por una elevada producción de IL-5 e IL-13, observándose también una elevada secreción de IFN- γ y TNF- α y una disminuida producción de IL-4 (49, 52).

Como factores ambientales involucrados en la EC y la CU, destacan el estrés y el uso de antibióticos, entre otros (42). Estudios prospectivos han mostrado una asociación positiva entre altos niveles de estrés y exacerbación de los síntomas (53). Si bien no está definido el mecanismo por el cual el estrés actúa, estudios de colitis inducida químicamente en ratones Balb/c (mediante la administración intrarectal de ácido sulfónico dinitrobenzeno; DNBS), mostraron que luego de una recuperación de 6 semanas posterior a la inducción, los signos clínicos pueden ser reactivados mediante estímulos de estrés más una dosis subumbral de DNBS, pero no con la sola administración de DNBS. Estos ratones presentaron una reducción en la producción de mucus y un incremento en la permeabilidad del colon, siendo ambos fenómenos característicos en las EII (54).

Finalmente, la exposición recurrente a antibióticos desde la niñez es un factor de riesgo para desarrollar EII (54). Al respecto, se ha observado que pacientes en EC tratados con antibióticos presentan una exacerbación de la disbiosis en comparación a pacientes sin este tratamiento (55).

1.6 Microbiota en EII

A la fecha, varias investigaciones han demostrado de manera constante la disbiosis de la microbiota y su contribución con el desarrollo de las EII, sin embargo, su relación causa efecto ha sido difícil de probar en humanos (56). Recientemente se demostró en un modelo murino libre de gérmenes, el cual presenta una delección en el elemento regulador ARE, 3'UTR del factor necrótico tumoral (TNF), el desarrollo de ileitis asociada a EC tras recibir un trasplante de microbiota disbiótica, a diferencia de ratones silvestres, apoyando el hecho de que se requiere cierta susceptibilidad genética para el desarrollo de la patología después de la transferencia microbiana (57).

En cuanto a las comunidades microbianas en pacientes con EII, estos presentan una disminución significativa del phylum *Firmicutes*, en particular de *Faecalibacterium prautnitzii* (indicador de salud en la microbiota de colon) y *Roseburia* (58, 59) . También se ha observado un incremento en la familia *Enterobacteriaceae*, especialmente la bacteria *Escherichia coli* adherente invasiva (ECAI) (60, 61).

La mayoría de los estudios que tratan sobre la composición microbiana de pacientes con EII, utilizando la secuenciación masiva de amplicones del gen 16S ARNr, consideran sólo algunas de las regiones variables del gen y el proceso de identificación taxonómica basado en OTUs (55, 62, 63). En estos estudios, los individuos con EIIs se distribuyen como un grupo homogéneo. Por ejemplo, Vidal y colaboradores (64) analizaron la diversidad microbiana colónica de pacientes españoles con EC, utilizando secuencias de 580 pb, en promedio, y el proceso de afiliación basado en OPUs, y clasificaron a los pacientes en 4 grupos según la composición de su microbiota. Dos de estos grupos presentan disbiosis de la microbiota en comparación con pacientes sanos. El grupo CD1 presenta un incremento en la proporción de *Bacteroidetes*, mientras que el CD2 muestra un incremento en la proporción de *Proteobacteria* en comparación a los controles. En este estudio también se describió un grupo de pacientes diagnosticados con EC los cuales poseen una microbiota intestinal similar a los pacientes sanos (64). Las razones por las cuales se observan estos distintos grupos para un mismo diagnóstico clínico de EC colónica aún no han sido dilucidadas. Sin embargo, se puede pensar en una modificación de la comunidad microbiana de forma gradual, desde una estructura similar a la de individuos controles (sin inflamación intestinal) a una radicalmente distinta en paciente que han acusado la enfermedad por años y presentan una microbiota completamente alterada en relación a la proporción de los *Firmicutes* versus *Proteobacterias*. [61]_

En la actualidad, no existen reportes donde se haya utilizado el proceso de filiación por OPUs para muestras provenientes de pacientes con CU. La composición microbiana colónica de pacientes con CU presenta un incremento de las phyla *Actinobacteria* y *Proteobacteria* (65), y de las familias *Clostridiaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Enterobacteriaceae* y *Actinomycetaceae* en comparación a pacientes control (66), y al igual que en pacientes con EC, el phylum *Firmicutes* se encuentra disminuido(66). A pesar de que los individuos con CU presentan una alteración en su composición microbiana, la disbiosis es mayor en EC que en CU (37) en particular el phylum *Proteobacteria* que aparece incrementado significativamente en pacientes con EC respecto a pacientes con CU y controles (67, 68). Lo anterior, de acuerdo al análisis de la librería de clones del 16S y DGGE, lo cual también es replicado por secuenciación masiva de amplicones del 16S (68).

1.7. Hipótesis del oxígeno en la disbiosis intestinal

Se sugiere que desde el nacimiento las bacterias aerobias y anaerobias facultativas consumen el oxígeno intestinal permitiendo así un ambiente propicio para el crecimiento de bacterias anaerobias obligadas (69). Estas observaciones se encuentran avaladas por estudios en donde se observa un predominio de las bacterias pertenecientes a la clase *Gammaproteobacteria*, tolerantes al oxígeno en el intestino de recién nacidos (70, 71). El gradiente de oxígeno en el intestino se extiende desde el tejido a través de la interfaz de la mucosa, hacia el lumen donde los microorganismos adyacentes al tejido consumen gran parte del oxígeno disponible, manteniendo la mayor parte del lumen profundamente anaeróbico (72). Estudios realizados con ratones sometidos en cámaras hiperbáricas han mostrado una alteración en la oxigenación luminal del intestino, conduciendo así una alteración en la composición microbiana,

específicamente en una reducción de las bacterias anaerobias obligadas pertenecientes al género *Anaerostipes* (72).

La disbiosis en EII es caracterizada por una reducción de anaerobios obligados pertenecientes al phylum *Firmicutes*, con un aumento en la abundancia de anaerobios facultativos pertenecientes al phylum *Proteobacteria*. En este imbalance se cree que el oxígeno y las especies reactivas de oxígeno juegan un papel importante. La “hipótesis del oxígeno” (73) postula que la inflamación crónica de las paredes intestinales resulta en una mayor liberación de hemoglobina que lleva oxígeno y especies reactivas de oxígeno en la luz intestinal, esto a su vez crearía un microambiente favorable para el crecimiento de bacterias anaerobias facultativas, la disminución resultante en anaerobios obligados como *F. prausnitzii* que liberan compuestos antiinflamatorios como el butirato (74), causan un aumento de la inflamación estableciendo un circuito de retroalimentación positiva que acelera el proceso de la enfermedad (73)._Esta hipótesis ha sido evaluada en un trabajo *in silico* (75),_en donde se recreó un biofilm intestinal compuesto por las bacterias anaerobias *F. prausnitzii*, *B. thetaiotaomicron* y la bacteria anaerobia facultativa *E. coli*, siendo estas representantes de los phylum *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Proteobacteria* respectivamente, además en este experimento se recrearon los niveles de ácidos grasos de cadena corta presente en el intestino de individuos sanos. Luego de aplicar oxígeno en el biofilm se observó que la comunidad microbiana evoluciono hacia un fenotipo de EII caracterizado por una disminución de *F. prausnitzii*, seguido por una disminución de los ácidos grasos propinato y butirato, además de aumento en la abundancia de *E. coli* (75). En este sentido se refleja que el proceso de inflamación estaría dado por un fenómeno de retroalimentación positiva, en donde la disbiosis induce una inflamación en el intestino provocando un aumento en la liberación de oxígeno y de especies reactivas de oxígeno en el lumen amplificando así el proceso de disbiosis.

Si bien el tracto gastrointestinal, y particularmente el colon, alberga un gran número de bacterias (68) el intestino de los mamíferos ha evolucionado para minimizar el contacto de la microbiota con el epitelio intestinal, así como también detectar y destruir aquellos microorganismos que atraviesan esa la barrera epitelial (1) .

1.8 Péptidos antimicrobianos (PAMs) y microbiota intestinal

El mucus intestinal es la primera línea de defensa, que impide el contacto de las bacterias con el epitelio intestinal. El intestino delgado está compuesto por una capa de mucus, la cual no se encuentra anclada a la superficie epitelial. Esta capa de mucus está constituida por lípidos, la Inmunoglobulina A secretora (IgA) y proteínas glicosiladas de alto peso molecular denominadas mucinas secretadas por las células de Goblet y de Paneth (76) . Por el contrario, el colon posee dos capas de mucus, una gruesa capa interna la cual se mantiene firmemente unida a las células epiteliales y otra externa, similar a la encontrada en el intestino delgado (76). Aunque las bacterias comensales pueden residir dentro de la capa externa, éstas no penetran la capa mucosa más interna, minimizando así el contacto de los microorganismos con el epitelio del colon (76). En pacientes con EII se ha observado una pérdida en la integridad de la barrera intestinal ocasionando con ello la translocación de antígenos bacterianos. Un ejemplo de ello es lo observado en individuos con CU, los cuales poseen una disminución en la síntesis y secreción de la mucina MUC2, permitiendo con ello el contacto directo de la microbiota colónica con la barrera epitelial (77).

Otro de los mecanismos utilizados por las células intestinales para minimizar el contacto de las bacterias con el epitelio intestinal es la secreción de potentes PAMs con actividad

microbicida contra bacterias Gram-positivo y Gram-negativo, hongos y algunos virus envueltos, ya que actúan perforando la membrana celular (78) . Entre los diferentes PAMs producidos por el intestino se encuentran la Catelicidina y las α y β Defensinas. Mientras las α -defensinas se expresan de manera constitutiva, algunas de las β -defensinas y las Catelicidina son expresadas bajo condiciones de inflamación y por los componentes bacterianos, tales como el lipopolisacarido (LPS), encontrado en la membrana externa de las bacterias Gram-negativo y el peptidoglicano (PGN), encontrado en la pared de bacterias Gram- negativo y Gram- positivo (79) .

1.9. Catelicidina humana (CAMP)

Las Catelicidinas, por su parte constituyen una familia de proteínas precursoras de péptidos antimicrobianos las cuales se expresan en mamíferos, reptiles, peces y anfibios, no obstante los seres humanos, a diferencia de otras especies, expresan sólo una Catelicidina denominada CAMP o LL-37 (80). CAMP poseen una región amino conservada de aproximadamente 100 residuos, denominada Catelina, la cual es flanqueada por un péptido señal en su región N-terminal y por un domino carboxilo variable, el cual contiene las propiedades antimicrobianas (80) . Luego del procesamiento de CAMP, se obtiene un péptido activo, el cual contiene 37 aminoácidos, de naturaleza catiónica y anfipática con propiedades antimicrobianas denominado LL-37 (81). La proteína CAMP es expresada en una variedad de células epiteliales, entre ellas las del epitelio gástrico, intestino delgado y colon (82).

Mientras que el mecanismo de regulación e inducción de CAMP no ha sido detallado, otros estudios han mostrado que el gen de CAMP posee sitios de unión a factores de transcripción como STAT3, C/EBP PU.1y además, cuenta con elementos de respuesta a

vitamina D (ERVD) en su región promotora (83). La relación entre la inducción de Catelicidina mediante vitamina D ha sido observada en cultivos de keratinocitos y monocitos tratados con vitamina D y muramil dipéptido (MDP), un constituyente de la pared celular de bacterias Gram positivo y Gram negativo (84). Muestras de biopsias de vejiga urinaria de mujeres tratadas previamente con vitamina D, mostraron un incremento en los niveles proteicos de CAMP tras la infección con la cepa uropatogénica (UPEC) *E. coli* CFT07. Este incremento a su vez mejora el efecto antibacteriano tras la infección con UPEC (85). En el epitelio colónico, La proteína CAMP se expresa al interior de las células epiteliales superficiales y en las zonas superiores de las criptas del colon, no así en las criptas más profundas, sugiriendo que CAMP se expresa principalmente en células altamente diferenciadas (86) . Los ácidos grasos de cadena corta, involucrados en la diferenciación celular, como butirato, isobutirato y propionato, han mostrado tener un efecto inductor en la expresión de CAMP en el epitelio colónico (87). A diferencia de las β -defensinas, CAMP no es inducida en respuesta a citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1 α , IFN- γ (87).

Sobre la actividad antimicrobiana, CAMP ha mostrado tener actividad bactericida contra las bacterias Gram-negativo tales como *E.coli* enteropatogénica (EPEC), *E.coli* enterohemorrágica (EHEC) (88), *Salmonella* sp y bacterias Gram-positivo como *E. faecalis* y *Lactobacillus casei* (82). Estudios en ratones deficientes para el gen de Catelicidina murino (mCRAMP), mostraron que estos presentan un incremento significativo de la colonización de *Citrobacter rodentium* sugiriendo un importante rol de CAMP en la inmunidad innata intestinal (89).

En condiciones de salud la expresión y secreción de estos PAMs, ayudan a mantener la barrera mucosal intestinal, previniendo el contacto con microorganismos. No obstante estudios recientes han mostrado que pacientes con EII, posee una expresión alterada de estos PAMs (90-92) .

1.10 Alfa (α -) defensinas

Un total de 6 tipos de α -defensinas (HDP): HNP1-HNP4 principalmente expresadas en neutrófilos, mientras que las HDP5 y HDP6 son expresadas de forma constitutiva, principalmente en las células de Paneth del intestino delgado (78, 79). Debido a que el presente proyecto se centra en el estudio de muestras de colon, no se profundizará en la descripción de estas defensinas.

1.10 Beta (β -)defensinas

Existen 33 genes de β -defensinas (hBD), siendo las hBD-1, hBD-2, hBD-3, hBD-4 las mayormente estudiadas en el tracto gastrointestinal (93). Estos péptidos catiónicos pequeños son ricos en arginina y su peso molecular varía entre los 3 y 5 kDa. Además, contienen 6 cisteínas que participan en la formación de puentes disulfuro intramoleculares (94). Mientras que hBD-1 se expresa de manera constitutiva en las células de Goblet, enterocitos y las células de Paneth en el íleo, hBD-2-4 son expresadas en bajas cantidades en condiciones normales, siendo inducidas durante condiciones de inflamación en el colon (95, 96). Sobre los mecanismos involucrados en la expresión de las β -defensinas, el de hBD-2 es el que ha sido mayormente estudiado. La expresión de hBD-2, en las líneas celulares Caco-2 y HT-29, es rápidamente inducida bajo la estimulación de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 α , IL-1 β y por componentes bacterianos como el LPS y el PGN (79). Las bacterias patogénicas *Salmonella dublin*, *E.coli* O29: NM así como también algunas cepas probióticas, median la inducción de hBD-2 en células Caco-2 (95, 97). Análisis utilizando el gen reportero luciferasa y mutaciones sitio dirigidas mostraron que los

sitios de unión para NF- κ B y AP-1 en el promotor de hBD-2, son requeridos para la inducción de ésta defensina con *E.coli Nissle 1917*(98). .

En cuanto a la actividad antimicrobiana de las β -defensinas, estudios *in vitro* han mostrado que hBD-1 posee una pobre actividad bactericida en su forma oxidada, sin embargo la reducción de sus puentes de disulfuro hace que hBD-1 se transforme en potente péptido antimicrobiano contra bacterias comensales Gram positivo pertenecientes al género de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (96). Por otro lado hBD-2 ha mostrado tener una actividad particularmente eficaz contra bacterias Gram-negativo pero relativamente menos potente contra bacterias Gram-positivo (97) . Su actividad bactericida ha sido demostrada *in vitro* contra las bacterias Gram-negativo *E. coli*, *P.aeruginosa*, *A. baumannii* y Gram positivo como *E. faecalis*, *E. faecium* y *S. aureus* (99). hBD-3 posee una amplia actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivo como *S. aureus* y *S. pyogenes*, *E. faecium*(89), y bacterias Gram-negativo como *E. coli* y *P. aeruginosa* (100) . Mientras que para hBD-4 se ha demostrado su actividad antimicrobiana contra *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* (90).

1.12 Expresión de PAMs en EII

Los pacientes con EII presentan alteraciones en la expresión tanto de CAMP y β -defensinas en la mucosa del colon. En cuanto a CAMP, pacientes con CU presentan elevados niveles de expresión de ARNm para este PAM, en comparación a muestras control (90) . En contraste a lo anterior, los niveles de ARNm de CAMP en pacientes con EC no presenta diferencias significativas en comparación a pacientes control, independiente al grado de inflamación de la mucosa (90) . En el caso de las defensinas, se ha descrito que pacientes con EC y CU presentan una disminución en los niveles de ARNm de hBD-1 en comparación a los

controles, mientras que los niveles de ARNm de hBD-2 en pacientes con EC esta levemente incrementada con respecto a pacientes sanos y es significativamente menor en comparación a pacientes con CU (91, 92, 101, 102). La deficiencia en la expresión de hBD-2 en pacientes con EC podría estar correlacionada con un bajo número de copias del gen hBD-2 (menos de 4 copias por genoma) en comparación a pacientes sanos y pacientes con CU (mayor o igual a 4 copias por genoma) (103) . No obstante un estudio realizado en pacientes con EC en Nueva Zelanda, mostró que pacientes con más de 4 copias para hBD-2 posee un mayor riesgo a desarrollar EC que aquellos que poseen menos de 4 copias para hBD-2 (104) por lo tanto el número de copias no sería la única explicación por la cual se observa una expresión disminuida de hBD-2 en pacientes con EC.

La menor expresión relativa de los transcritos de PAMs en pacientes con EC en comparación a CU, da cuenta de una respuesta diferente en la defensa mucosal innata entre estos dos cuadros clínicos. Hasta la fecha no se han realizado estudios para determinar si la expresión diferencial de PAMs se asocia con la disbiosis observada en los pacientes con EC y CU en comparación a sujetos control. No obstante Salzman y colaboradores (105) observaron que ratones de la cepa FVB (expresan el transgen DEFA5 de una α -defensina humana), presentan una disminución en el phylum *Firmicutes* y un incremento de *Bacteroidetes* en comparación con ratones silvestres. Además, ratones de la cepa B6 deficientes de matrisilina (MMP-7, una enzima requerida para el procesamiento de α -defensinas), presentan un incremento del phylum *Firmicutes* y disminución de *Bacteroidetes* en comparación con ratones silvestres (105). Estos resultados dan cuenta de la importancia de las defensinas como reguladores de la composición microbiana intestinal en un modelo ratón (105).

Sumado a lo anterior, la bibliografía reporta que en pacientes con EC y CU se observa una disbiosis de la microbiota bacteriana, en donde la proporción del phylum *Proteobacteria* se

ve incrementado en pacientes con EC en comparación con controles y pacientes con CU. Adicionalmente, también se han descrito niveles de expresión relativa distintos para CAMP y β -defensinas en pacientes con EII respecto de sujetos sanos. Considerando todo lo expuesto anteriormente, se propone como hipótesis que “El aumento de la población de *Proteobacterias* en la mucosa intestinal, observado en los pacientes con EC respecto de pacientes con CU, se asocia con la disminución en la expresión relativa de los transcritos de CAMP y defensinas (hBD2-4)”. Una vez obtenidos los resultados de microbioma y presencia de PAMs en los tres grupos de pacientes en estudio en este proyecto, se aplicará un enfoque de biología de redes (106, 107) esperando poder establecer *in silico* una red de asociaciones entre grupos que componen la microbiota y la presencia de PAMs particulares. Esta aproximación permitirá identificar una correlación biológica entre los grupos taxonómicos y niveles de expresión de PAMs. Lo anterior es relevante, considerando que estas redes proporcionarán un marco teórico para la comprensión de aquellas interacciones que mantienen el balance entre la salud y enfermedad, en este caso EC y CU, el cual podrá ser comprobado en estudios futuros.

HIPOTESIS

El aumento de la población de *Proteobacteria* observado en la mucosa intestinal de los pacientes con EC respecto de pacientes con CU, se asocia con la disminución en la expresión de PAMs CAMP y hBD2-4

OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar la microbiota bacteriana intestinal desde biopsias de colon y los niveles de PAMs, CAMP y hBD2-4, en mucosa intestinal de pacientes con EC, CU y controles.

Objetivos específicos

Objetivo específico 1: Determinar la composición de la microbiota bacteriana de biopsias de colon de individuos con EC, CU y CTL.

Objetivo específico 2: Construir redes de asociación biológica entre la microbiota bacteriana colónica en individuos con EC, CU y CTL.

Objetivo específico 3: Determinar los niveles de expresión de los PAMs, CAMP y hBD2-4, en individuos con EC, CU y CTL.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Reclutamiento de pacientes y obtención de biopsias

En este estudio se incluyeron individuos con EC, CU y controles (CTL) de edad adulta (26-73). Se colectaron biopsias de colon de 20 pacientes chilenos diagnosticados con EC (EC_CH), 20 pacientes chilenos diagnosticados con CU (CU) y 9 individuos controles chilenos sin diagnóstico de EII (CTL_CH). Es importante destacar que en el presente estudio los individuos CTL correspondieron a personas que fueron sometidas a colonoscopia por antecedentes familiares de cáncer de colon y que no presentaron signos de enfermedad inflamatoria intestinal, lo que no significa que sean individuos sanos y sin algún tipo de patología. En este contexto, se eliminaron las muestras 83CTL_CH y 84CTL_CH, ya que presentaron adenoma vellosos, adicionalmente se retiraron las muestras 66CTL_CH y 85CTL_CH por presentar una microbiota similar a los individuos con adenoma y no dar certeza de ser individuos CTL sin patología inflamatoria (Tabla 2, Materia suplementario figura 1 y 2).

Para la obtención de cada muestra se contó con la firma de un consentimiento informado y con la aprobación de los Comités Éticos Institucionales, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y Clínica las Condes. Como criterio de exclusión, no se colectaron muestras de pacientes sometidos a tratamiento antibióticos con un mes de anterioridad a la colonoscopia.

Adicionalmente, con la finalidad de aumentar nuestro tamaño de muestra, se incluyeron datos de 17 pacientes españoles diagnosticados con EC (EC_ES) y 7 individuos CTL de la misma nacionalidad (CTL_ES). Los pacientes del estudio con EII fueron categorizados según sus características clínicas, tales como actividad endoscópica, localización de lesiones intestinales, fenotipo y tratamiento. La localización de lesiones y fenotipo de la EC fueron definidas utilizando la Clasificación de Montreal, distinguiéndose los pacientes con lesiones en íleon, colon e ileocolon; y fenotipos inflamatorio, estenosante y/o fistulizante (34). En pacientes con CU, los hallazgos endoscópicos fueron graduados según el subíndice endoscópico de Mayo, donde el índice 0 es remisión, 1 actividad leve, 2 moderada y 3 severa (39) (Tabla 2). Un score ≥ 3 en EC y un subíndice ≥ 2 en CU fueron definidos como enfermedad endoscópicamente activa. La extensión de la CU también fue definida mediante la Clasificación de Montreal en (34) proctitis, colitis izquierda y colitis extensa (38). Las biopsias de 1 mg de peso aproximado y con un tamaño de 2mm^3 fueron colectadas durante la colonoscopia. Las biopsias fueron colocadas inmediatamente en tubos estériles y almacenados a -80°C para la extracción de ADN/ARN.

Tabla 2. Datos clínicos de pacientes

Grupo	Muestra	País	Diagnóstico	Año de nacimiento	Sexo	Cirugía	Actividad	Localización	Extensión	Comportamiento	Índice Mayo	Medicación (al menos 3 meses)
IBD-1	25EC_CH	Chile	EC	1960	M	No	Activa	L3		B1		Sin tratamiento
	31EC_CH	Chile	EC	1980	M	Si	Activa	L1		B1		Infliximab + Imuran
	2EC_ES	España	EC	1963	M	Si	Remisión	L3		B3		Agente inmunosupresivo
	10EC_ES	España	EC	1949	M	Si	Activa	L1		B1		No
	12EC_ES	España	EC	1978	M	No	Remisión	L1		B2		Agente inmunosupresivo
	24EC_ES	España	EC	1989	F	Si	Remisión	L1		B3		Agente inmunosupresivo
	57CU	Chile	CU	1950	M	No	Activa		E3		2	Salofalk + Prednisona+ Azatioprina
62CU	Chile	CU	1965	F	Si	Activa		E3		1	Salofalk 4gr	
IBD-2	4EC_ES	España	EC	1955	F	Si	Remisión	L1		B2		5 Aminosalicilates
	5EC_ES	España	EC	1992	M	Si	Activa	L3		B2		Agente inmunosupresivo
	6EC_ES	España	EC	1958	M	Si	Remisión	L2		B2		5 Aminosalicilates
	8EC_ES	España	EC	1974	F	No	Activa	L3		B3		No
	9EC_ES	España	EC	1976	F	Si	Activa	L1		B3		Antagonista de TNF
IBD-3	29EC_CH	Chile	EC	1994	M	No	Activa	L3		B1		Sin tratamiento
	39EC_CH	Chile	EC	1944	F	Si	Activa	L1		B2		Azatioprina
	69EC_CH	Chile	EC	1991	F	Si	Activa	L3		B2		Infliximab
	1EC_ES	España	EC	1975	M	Si	Activa	L3				Agente inmunosupresivo
	59CU	Chile	CU	1949	M	Si	Activa		E3		1 - 2	Azulfidine
	60CU	Chile	CU	1983	M	No	Activa		E2		1	Metotrexato
IBD-5	36EC_CH	Chile	EC	1983	F	No	Activa	L3		B1		Certolizumab Pegol + Metotrexato
	67EC_CH	Chile	EC	1972	F	Si	Activa	L2		B1p		Azatioprina + Metronidazol
	68EC_CH	Chile	EC	1984	M	Si	Activa	L1		B1		Buscapina, Fentanyl, midazolam
	66CTL_CH	Chile	Control	1972	M	No						
	83CTL_CH*	Chile	Control	1960	F	No						
	84CTL_CH*	Chile	Control	1953	M	No						
	85CTL_CH	Chile	Control	1954	F	No						
	55CU	Chile	CU	1971	M	No	Activa		E3		3	Salofalk oral + Hidrocortisona ev
	61CU	Chile	CU	1990	F	No	Activa		E3		2	Azulfidine
77CU	Chile	CU	1973	F	No	Activa		E3		1	Azulfidine	
79CU	Chile	CU	1965	F	No	Activa		E3		2	Infliximab + Metotrexato	

Grupo	Muestra	País	Diagnóstico	Año de nacimiento	Sexo	Cirugía	Actividad	Localización	Extensión	Comportamiento	Índice de Mayo	Medicamentos (Al menos 3 meses)	
IBD-4	26EC_CH	Chile	EC	1988	M	Si	Activa	L1		B1		Infliximab + Azatioprina	
	27EC_CH	Chile	EC	1936	F	No	Activa	L2		B1p		Mesalazina	
	32EC_CH	Chile	EC	1988	F	No	Activa	L2		B1		Sin tratamiento	
	33EC_CH	Chile	EC	1984	M	No	Activa	L3		B1		Infliximab	
	38EC_CH	Chile	EC	1982	F	No	Activa	L2				Mesalazina	
	71EC_CH	Chile	EC	1970	F	No	Activa	L3			B1		Sin tratamiento
	72EC_CH	Chile	EC	1983	M	Si	Activa	L2			B1p		Infliximab+ Azatioprina
	73EC_CH	Chile	EC	1978	M	No	Remisión	L2			B1		Azatioprina
	74EC_CH	Chile	EC	1980	F	No	Activa	L3			B1		Azatioprina + Pensata
	75EC_CH	Chile	EC	1967	M	No	Activa	L2			B1		Corticoides
	76EC_CH	Chile	EC	1964	F	No	Activa	L2			B1		Sin tratamiento
	87EC_CH	Chile	EC	1985	F	No	Activa	L2			B1		Hidrocloridato de ev
	1EC_ES	España	EC	1975	M	Si	Remisión	L1			B3		Agente inmunosupresivo
	3EC_ES	España	EC	1967	M	Si	Remisión	L3			B2		Agente inmunosupresivo
	7EC_ES	España	EC	1983	F	No	Activa	L3			B1		Antagonista de TNF
	11EC_ES	España	EC	1977	F	No							Agente inmunosupresivo
	14CTL_ES	España	Control	1952	M	No							
	15CTL_ES	España	Control	1965	M	No							
	16CTL_ES	España	Control	1945	M	No							
	17CTL_ES	España	Control	1953	M	No							
	20CTL_ES	España	Control	1936	F	No							
	22CTL_ES	España	Control	1938	M	No							
	23CTL_ES	España	Control	1961	F	No							
	63CTL_CH	Chile	Control	1985	M	No							
	64CTL_CH	Chile	Control	1966	F	No							
	65CTL_CH	Chile	Control	1966	F	No							
	80CTL_CH	Chile	Control	1977	F	No							
	81CTL_CH	Chile	Control	1977	F	No	Remisión			E3		0	
	41CU	Chile	CU	1966	M	No	Activa			E1		3	salofalk 4 + calcio + Bion 3
	42CU	Chile	CU	1986	F	Si	Activa			E3		3	Sin tratamiento
	44CU	Chile	CU	1993	M	No	Activa			E2		2	Azatioprina
	45CU	Chile	CU	1974	F	No	Activa			E3		1	Infliximab
	47CU	Chile	CU	1978	M	Si	Activa			E3		3	Salofalk / Pentasa
	48CU	Chile	CU	1991	F	No	Activa			E3		1 - 2	Mesalazina
	50CU	Chile	CU	1979	F	No	Activa			E3		1	Azatioprina/ Salofalk
	51CU	Chile	CU	1982	F	Si	Activa			E2		3	Immuran / Salofalk
	52CU	Chile	CU	1972	M	No	Activa			E3		1	Azatioprina/ Mesalazina
	53CU	Chile	CU	1958	F	Si	Activa			E1		2	Infliximab / Salofalk / Immuran / CDal-D / Omeprazol
	56CU	Chile	CU	1978	M	No	Activa			E3		1	Azulfidina
	78CU	Chile	CU	1991	M	Si	Activa			E3		2	5 Asa

2.2. Extracción de ácidos nucleicos, amplificación del 16S y pirosecuenciación

Desde las muestras de biopsias se extrajo el ADN/ARN total utilizando E.Z.N.A. DNA/RNA Isolation kit (Omega-Bio-Tek) siguiendo las indicaciones del fabricante. A partir del ADN extraído, se amplificó mediante PCR el gen rDNA16S para cada muestra, utilizando los partidores universales GM3 (5'-AGAGTTTGATCMTGGC-3') y 907r (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), considerando 30 ciclos de amplificación. A partir del producto amplificado se realizó un segundo PCR (PCR anidado), que consistió en 7 ciclos de reacción para cada muestra. Lo anterior, permitió incorporar al producto de la primera amplificación los adaptadores para la plataforma de secuenciación, una secuencia TCAG dictada según lo los requerimientos de la plataforma de secuenciación GS FLX+ y un identificador múltiple, el cual permite identificar una muestra específica desde un grupo de muestras enviadas a secuenciación (Tabla 3). Los productos de PCR fueron purificados utilizando E.Z.N.A. Gel Purification kit (Omega-Bio-Tek), siguiendo las indicaciones del fabricante. La concentración del producto purificado fue cuantificada utilizando el equipo Synergy HT spectrophotometer (Biotek™), y finalmente enviado a secuenciar como un pool conteniendo una concentración equimolar de cada una de las muestras. Estas fueron enviadas a secuenciar a Macrogen (Seul Korea) utilizando la plataforma de secuenciación 454 GS-FLX+.

Tabla 3. Partidores para secuenciación en plataforma 454.

		Partidores 454-pyrosequencing
	Nombre	Secuencia 5' - 3'
	454-Bact F 1	CCTATCCCCGTGTGCCCTTGGCAGTCTCAGAGAGITTTGATCMTGGC
1	454-Univ R 1	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACGAGTGGCTCCGTCAATTCMTTGGAGTTT
2	454-Univ R 2	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACGCTCGACACCGTCAATTCMTTGGAGTTT
3	454-Univ R 3	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGACGCACTCCGTCAATTCMTTGGAGTTT
4	454-Univ R 4	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGCACTGTAGCCGTCAATTCMTTGGAGTTT
5	454-Univ R 5	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGATCAGACACGCCGTCAATTCMTTGGAGTTT
6	454-Univ R 6	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGATATCGCGAGCCGTCAATTCMTTGGAGTTT
7	454-Univ R 7	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGTGTCTCTACCGTCAATTCMTTGGAGTTT
8	454-Univ R 8	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTCGCGTGTCCGTCAATTCMTTGGAGTTT
9	454-Univ R 9	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAGTATCAGCCGTCAATTCMTTGGAGTTT
10	454-Univ R 10	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTCTATGCGCCGTCAATTCMTTGGAGTTT
11	454-Univ R 11	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGATACGTCTCCGTCAATTCMTTGGAGTTT
12	454-Univ R 12	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTACTGAGCTACCGTCAATTCMTTGGAGTTT
13	454-Univ R 13	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCATAGTAGTGCCGTCAATTCMTTGGAGTTT
14	454-Univ R 14	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGAGAGATACCGTCAATTCMTTGGAGTTT
15	454-Univ R 15	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGATACGACGTACCGTCAATTCMTTGGAGTTT
16	454-Univ R 16	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTACGTAACCGTCAATTCMTTGGAGTTT
17	454-Univ R 17	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGTCTAGTACCGTCAATTCMTTGGAGTTT
18	454-Univ R 18	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTACGTAGCCGTCAATTCMTTGGAGTTT
19	454-Univ R 19	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGTACTACTCCGTCAATTCMTTGGAGTTT
20	454-Univ R 20	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACGACTACAGCCGTCAATTCMTTGGAGTTT
21	454-Univ R 21	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGTAGACTAGCCGTCAATTCMTTGGAGTTT
22	454-Univ R 22	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTACGAGTATGCCGTCAATTCMTTGGAGTTT
23	454-Univ R 23	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTACTCTCGTGCCGTCAATTCMTTGGAGTTT

Adaptador A, Adaptador B, Secuencia TCAG, Identificador múltiple, secuencia 16S

2.3. Trimado de secuencias, verificación de quimeras, agrupación de OTUs

Los datos fueron procesados utilizando la herramienta Mothur pipeline para el análisis para las secuencias de rDNA16S obtenidas a partir de la secuenciación con 454. Se eliminaron aquellas lecturas de baja calidad, en decir aquellas con menos de 300 pb, más de 8 homopolímeros y ambigüedad en los partidores. Las quimeras fueron eliminadas mediante Chimera Uchime implementado en Mothur (105). Las secuencias fueron agrupadas dentro de OTUs al 99% de identidad, utilizando la herramienta UCLUST incluida en QUIIME (106). La lectura más abundante de cada OTU fue seleccionada como representativa.

2.4 Construcción de árbol filogenético y asignación de OPUs

Las lecturas de los OTUs representativos fueron alineadas mediante SINA (107), incluido en el programa ARB 6.0 (8), e incorporadas mediante parsimonia a un árbol previamente construido y agrupado en OPUs en el estudio de muestras españolas (61), utilizando la base de datos LTP111 de SILVA(108). Aquellas lecturas que no fueron circunscritas dentro de los OPUs previamente construidas, fueron alineadas e incorporadas a la base de datos LTP 123, seleccionando de ella las secuencias relativas más cercanas para cada OTU. Las bases de datos LTP111 de SILVA y LTP 123 se fusionaron construyendo así un árbol filogenético mediante el algoritmo neighbor joining con la corrección de Jukes-Cantor y añadiendo un filtro conservador del 30% para eliminar las posiciones hipervariables. Todas las alineaciones fueron revisadas y supervisadas manualmente. Para la reconstrucción final del árbol, las secuencias relativas más cercanas fueron seleccionadas con un conjunto adicional de aproximadamente 750 secuencias de apoyo (el de más alta calidad en el LTP y cubriendo una representación equilibrada de todos los phyla principales de los dominios Bacteria y Archaea) construyendo así el árbol filogenético mediante neighbor joining. El grupo de Archaea de la base de datos LTP 123 fue utilizado para formar la raíz de árbol, la estabilidad de las ramas (llamada NJ_30) se evaluaron usando el análisis de bootstrap implementado en el software ARB. Las secuencias OTU finalmente se insertaron en el árbol usando la herramienta de parsimonia de ARB. Las secuencias OTUs se agruparon en OPUs basadas en una inspección manual del árbol NJ_30, definiendo como un OPU al clado monofilético más pequeño que contiene una o más secuencias amplificadas que se unen con al menos una secuencia de referencia. En esta tesis cada vez que se hable de un OPU se hará referencia a la especie bacteriana afiliada. El número de acceso

respectivo, más el nombre de la bacteria respectivo al OPU indicado se presenta en el Materia suplementario, tabla 1.

2.5. Análisis estadísticos

La abundancia de lecturas para cada OPU y por cada muestra fue codificada como una matriz de datos. Para la normalización de datos, los recuentos de lectura fueron transformados a abundancias relativas. Las curvas de rarefacción y los análisis de β -diversidad se calcularon utilizando los paquetes "betapart"(109) y "vegan"(110) incluidos en el programa RStudio. Para la comparación de grupos se utilizó en análisis de varianza (ANOVA) seguido por el test de comparaciones múltiple Bonferroni utilizado el programa RStudio. Un $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo. Los análisis de dependencia de variables se realizaron mediante el test χ^2 de Pearson. Para ello se creó una tabla de contingencia tomando en cuenta el número de individuos identificados con las variables a analizar, considerando un $p < 0.05$ como estadísticamente significativo. Mediante el análisis de residuos del test χ^2 se realizaron análisis de correspondencia entre las variables categóricas mediante el programa RStudio.

Para los análisis de agrupamiento, los datos fueron transformados aplicando la corrección $\log(x+1)$. Los análisis de componentes principales (PCA) fueron realizados utilizando el programa STAMP (versión 2.1.3), mientras que para los dendogramas se utilizó el programa RStudio, utilizando el paquete "Vegan". Para comparar las medias de los niveles taxonómicos de los distintos grupos se utilizó el test Kruskal-Wallis. Para las diferencias estadísticamente significativas se utilizó el test a post-hoc Pairwise Wilcox.

2.6 Especies indicadoras

En este estudio, se determinaron aquellos OPUs indicadores que permiten discriminar cada uno de los grupos a nivel microbiológico, mediante el programa R-3.3.2, utilizando el paquete “Indicspecies”, siguiendo el protocolo de De Cáceres y Legendre (*III*). El orden jerárquico de especies indicativas se determinó por el valor *stat*, definido como la significancia de la asociación entre las especies y el tipo de muestra o sitios de origen (*III*). De la lista de las especies indicadoras entregadas por el programa, se seleccionaron aquellas que tuviesen el mayor promedio de abundancia por OPU y por grupo, y que además estuviesen representadas en más de la mitad de las muestras.

2.7 Transcripción reversa y PCR-tiempo real (qRT-PCR)

Se extrajo ARN total desde cada muestra de biopsia. La integridad de la extracción del ARN fue determinada mediante gel de agarosa y cuantificada mediante el equipo Synergy HT spectrophotometer (BiotekTM). Posteriormente las muestras fueron tratadas a 37°C por 30-60 minutos con 20-50 U de DNAsa libre de RNAsa (Roche) y el ADNc se obtuvo transcribiendo 300ng de ARN utilizando Transcriptasa Reversa (Fermentas). Mediante la técnica de PCR-tiempo real se estimaron los niveles de expresión génica de los PAMs CAMP y hBD-2. La cuantificación fue realizada en un equipo Agilent AriaMX10 usando Fast EvaGreen qPCR Master Mix (Biotium), utilizando los partidores descritos en la Tabla 4.

Tabla 4. Partidores para qRT-PCR de PAMs.

Nombre	PAMs	Partidor	cita
CAMP- Forward	CAMP	5'-GGAAGCTGTGCTTCGTGCTATAGA-3'	*
CAMP-Reverse	CAMP	5'-CAGGATCGCCTATAACCACCAA-3'	*
hBD-2. Forward	hBD-2	5'GTTGCCGGAAGAAATGTCG-3'	*
hBD-2.Reverse	hBD-2	5'-CAGGATCGCCTATAACCACCAA-3'	*
hBD-3-Forward	hBD-3	5'-TTTGGTGCCTGTTCCAGGTCAT-3	(112)
hBD-3-Reverse	hBD-3	5'TCCTTTGGAAGGCAGCTGAGCA-3'	(112)
hBD-3.2-Forward	hBD-3	5'-TCTCAGCGTGGGGTGAAGC-3'	(113)
hBD-3.2-Reverse	hBD-3	5'- CGGCCGCCTCTGACTCTG-3'	(113)
hBD-3.3-Forward	hBD-3	5'- TGAAGCCTAGCAGCTATGAGGATC-3'	(103)
hBD-3.3-Reverse	hBD-3	5'- CCGCCTCTGACTCTGCAATAA-3'	(103)
hBD-4-Forward	hBD-4	5'- TCAAGATCTTCCAGTGAGAAGCGA-3'	(112)
hBD-4-Reverse	hBD-4	5'- TCTTGGCTGCGACATTTCTTCC-3'	(112)
hBD-4.2-Forward	hBD-4	5'- AGCCCCAGCATTATGCAGAGA-3'	(113)
hBD-4.2-Reverse	hBD-4	5'- GCGACTCTAGGGACCAGCACTAC-3'	(113)
GADPH- Forward	GADPH	5'- AACCTGCCAAATATGATCAC-3'	(114)
GADPH-Reverse	GADPH	5'-GTTGTCATAACCAGGAAATGAG-3'	(114)
18s-Forward	18s	5'GTGGAGCGATTTGTCTGGTT-3'	(115)
18s-Reverse	18s	5'- CGCTGAGCCAGTCAGTGTAG -3'	(115)

*Partidores generados en este estudio.

2.8. Correlaciones y red bacteriana

Dada la matriz de abundancia de cada OPU por paciente, se analizaron correlaciones entre los distintos OPUs utilizando el algoritmo “corrplot” (116) del programa R, basándose en el coeficiente de correlación de Pearson. La red de correlaciones fue generada a partir del programa qgraph proveniente de la librería del programa R.

3. RESULTADOS

3.1 Objetivo específico N°1: Determinar la composición de la microbiota bacteriana de colon en pacientes con EC, CU y CTL.

3.1.1 Comunidades microbianas en individuos EII y CTL

El presente estudio de la microbiota asociada al epitelio del colon fue realizado a partir de muestras de biopsias de mucosa intestinal de 20 pacientes chilenos diagnosticados con enfermedad de Crohn (EC_CH), 20 muestras de pacientes chilenos diagnosticados con CU y 9 de individuos controles chilenos (CTL_CH), 17 pacientes españoles diagnosticados con enfermedad de Crohn (EC_ES) y 7 pacientes controles de la misma nacionalidad (CTL_ES). Los resultados de la pirosecuenciación arrojaron un total de 483818 lecturas con un promedio de 5506 lecturas por muestra (Tabla 5). Luego de remover secuencias cortas (<300 pb) y de baja calidad, la base de datos se redujo en un 26.3%. Se identificaron un total de 614 OPUs con un promedio de 88 OPUs por muestra. La relación entre el número de OTUs y OPUs y el número de lecturas asociadas por muestra es presentada en la Figura 1A y 1B. En ellas se observa que las curvas de rarefacción de OPUs se acercaron a la saturación con un número mucho menor de lecturas que el observado para las curvas de OTUs, lo que estaría indicando una sobreestimación de las unidades taxonómicas (diversidad) cuando se utiliza un enfoque tradicional de OTU.

Tabla 5. Distribución de lecturas y OPUs por grupo.

	Total	EC_ES	EC_CH	CTL_ES	CTL_CH	UC
NºTotal de lecturas	483818	109253	143195	42888	50112	138370
Individuos totales	69	13	22	7	9	20
Lecturas removidas	127118 (26.3%)	13351 (12.29%)	55631 (38.8%)	6955 (16.2%)	6330 (12.6%)	44851 (32.4%)
Promedio de Lecturas por muestra	5506 (\pm 974)	7377(\pm 2810)	5490(\pm 3866)	5127(\pm 1470)	4864(\pm 2017)	4675(\pm 1805)
Promedio de OTUs al 99%	224	219	148	194	342	215
Promedio de OPUs	88	83	91	101	83	80

*Dentro de los 9 individuos CTL_CH, dos de ellos poseen adenoma vellosos y dos de ellos cáncer de colon por cuanto fueron retirados de los futuros análisis. Los detalles de estos pacientes se destacan en la sección materiales y métodos Tabla 2.

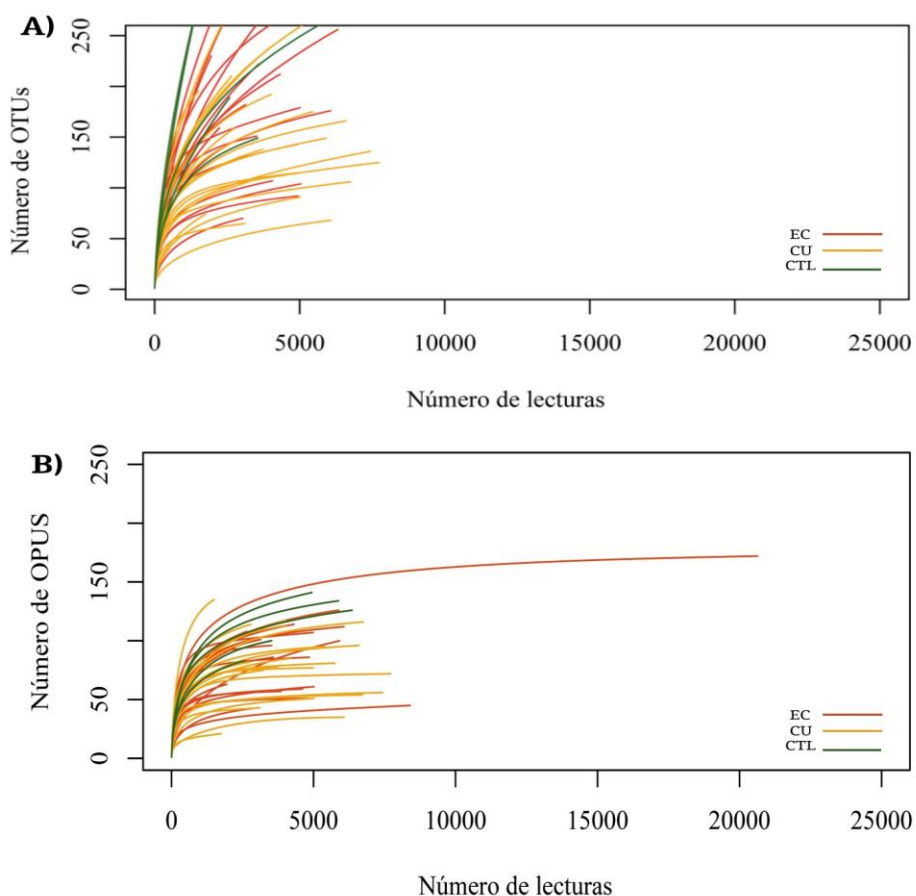


Figura 1. Curvas de rarefacción. Las curvas de rarefacción fueron realizadas según la detección de OTUs A) y OPUs B) por cada una de las muestras de EC (rojo), CU (naranja) y CTL (verde). Cada una de las líneas representa una muestra independiente.

De acuerdo a los datos de diagnóstico clínico obtenidos por los centros hospitalarios, observamos que dos de las nueve muestras clasificadas como individuos CTL poseen adenoma vellosa, pólipo premaligno del tracto gastrointestinal precursor de cáncer colorectal (117). Se ha reportado que sujetos diagnosticados con adenoma vellosa, poseen una disbiosis de su microbiota colónica adherente, en comparación a individuos que no poseen adenoma (118). Teniendo en cuenta estos antecedentes realizamos análisis de similitud entre los individuos CTL según la abundancia relativa de los OPUs por cada muestra. Utilizando el índice de Bray-Curtis

observamos que los individuos con Adenoma veloso, más dos de las muestras clasificadas CTL, se separaban en un cluster distinto al resto de los individuos CTL (Materia suplementario Figura 1), presentando una microbiota abundante en *Proteobacteria* (Materia suplementario Figura 2), característica común en individuos con cáncer colónico (118). Considerando estos resultados, se decidió eliminar estas cuatro muestras CTL de los análisis, continuando con las cinco muestras CTL restantes (64CTL_CH, 65CTL_CH, 80CTL_CH, 81CTL_CH) para el resto de los análisis.

De acuerdo su composición microbiana, es decir el número de lecturas asignadas a cada OPU por individuo, los análisis de PCA no muestran una diferenciación de los individuos con EC, CU y CTL (Figura 2A). Además según su composición microbiana observamos que los individuos chilenos se agrupan en conjunto con los individuos españoles (Figura 2B).

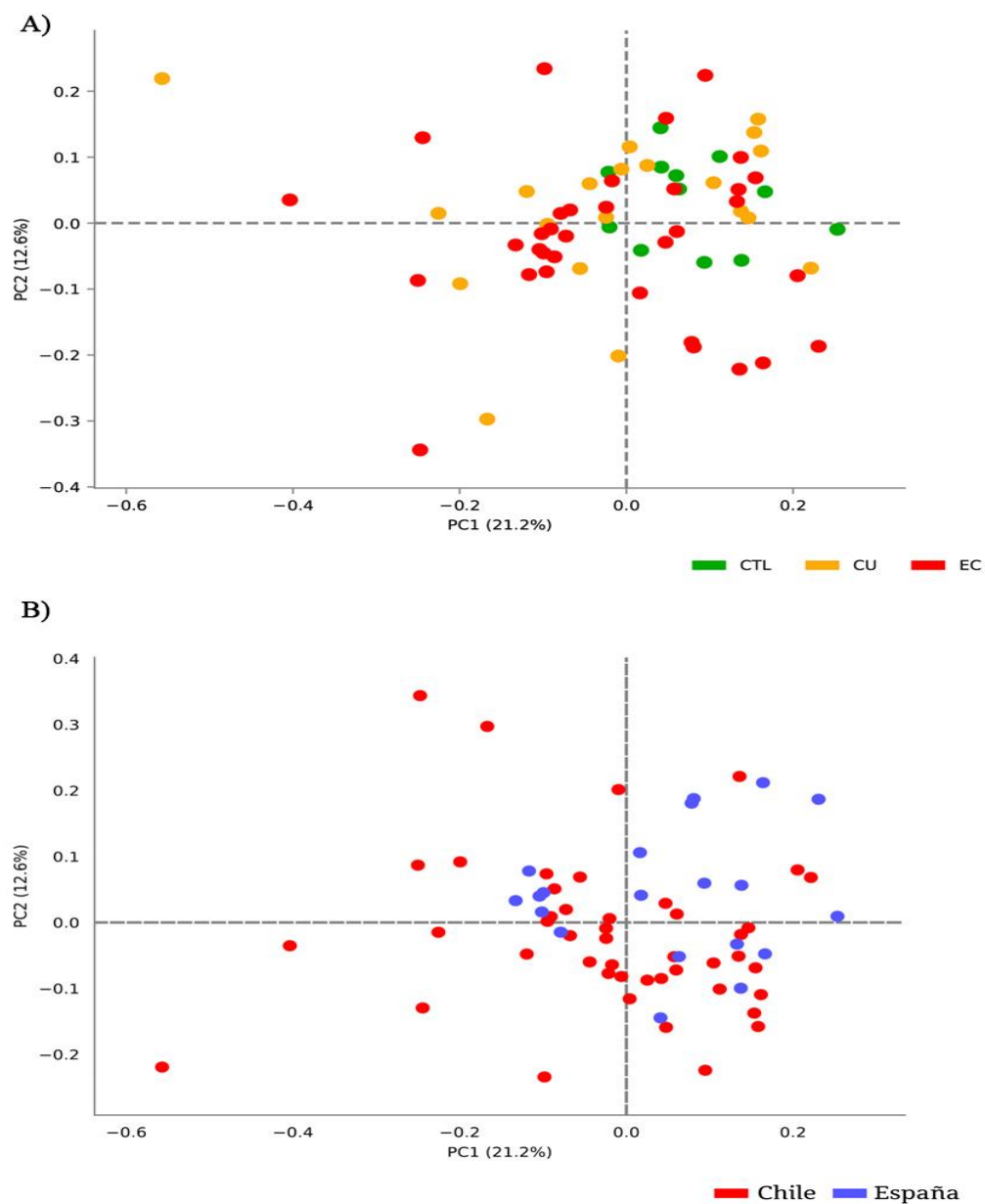


Figura 2. Análisis de agrupamiento de muestras. Según la abundancia relativa de los OPUs por cada individuo se realizó una matriz de distancia utilizando el índice de similitud de Bray-Curtis. Para el análisis de PCA la clasificación de cada muestra según su condición clínica (EC, CU O CTL) (A) o su país de origen (Chile o España) (B) fue utilizada como variable explicativa, mientras que la abundancia relativa de los OPUs como la variable respuesta. Los datos se normalizaron utilizando la transformación de $\log(x+1)$. La agrupación de muestras y la significación de los ejes se analizaron mediante ANOVA.

En estudios previos realizados con muestras fecales se observó que individuos con EC poseen una mayor abundancia del phylum *Proteobacteria* en comparación a individuos con CU y CTL [62]. En nuestro estudio realizado con muestras de biopsias, observamos una mayor abundancia relativa para el phylum *Proteobacteria* en los individuos con EC (31.53%) y CU (28.74%), siendo estas diferencias significativas con respecto a CTL (4.82%, EC vs CTL, $p=1.1e-4$; CU vs CTL, $p=5.2e-3$, Figura 3A). Además, contrario a lo planteado en nuestra hipótesis y a lo observado en estudios anteriores [62], no se observaron diferencias significativas en el phylum *Proteobacteria* entre las muestras de biopsias de los pacientes con EC y CU. Nuestra descripción de la microbiota de pacientes con EII, permitió observar que para el phylum *Firmicutes* los individuos CTL presentaron una mayor abundancia relativa (66.28%) en comparación a los individuos con EC (40.78% $p=1.8e-3$). Al igual que en otros estudios basados en la caracterización de la microbiota de heces [62], en este trabajo tampoco se observaron diferencias significativas entre individuos CTL y pacientes con CU (50.00%) para el phylum *Firmicutes* (Figura 3B). Sumado a lo anterior, no se observaron diferencias significativas en los phylum *Bacteroidetes* y *Actinobacteria* entre los diferentes grupos estudiados (Figura 3C, D). Además, de acuerdo a nuestros resultados los individuos con CU y CTL presentan una microbiota adherente similar, mientras que los individuos con EC una disbiosis mayor. La descripción de la composición microbiana entre individuos, tampoco permitió observar diferencias en las abundancias relativas de las cuatro phyla mencionadas entre sujetos chilenos y españoles, mostrando que independiente del país de origen la microbiota adherente intestinal de estos individuos es similar (Figura 4)

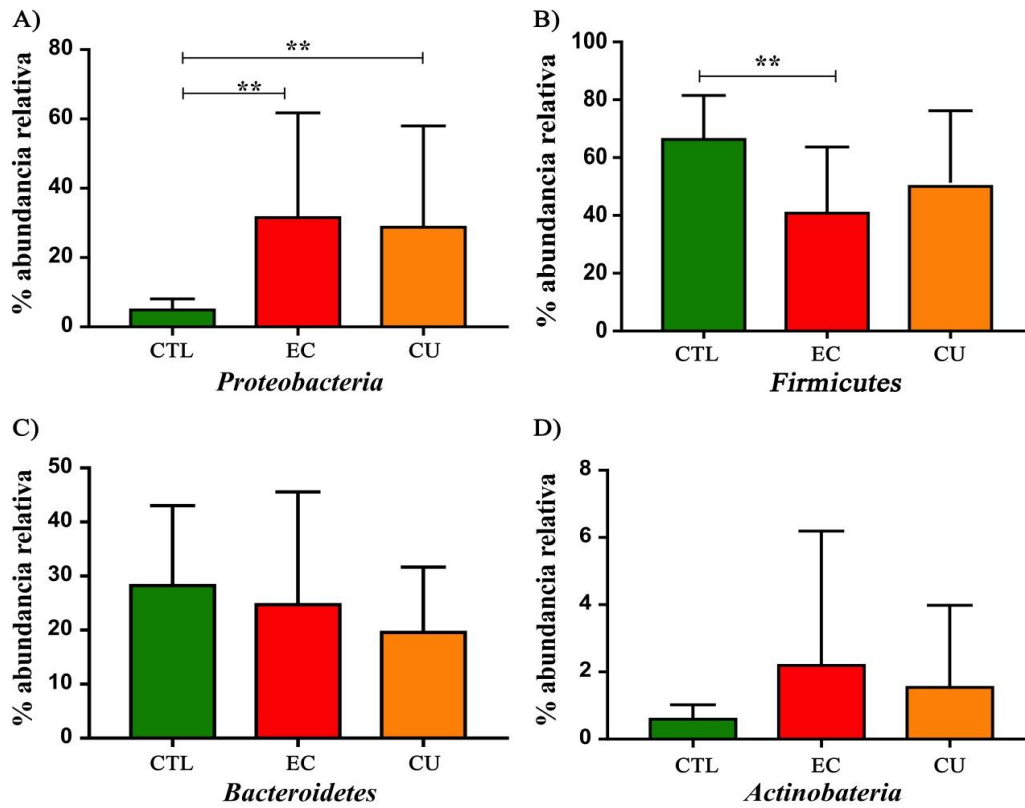


Figura 3. Abundancia relativa a nivel de phylum. Las abundancias para los phylum A) *Proteobacteria* B) *Firmicutes* C) *Bacteroidetes* y D) *Actinobacteria*, fue realizada de acuerdo a la abundancia relativa de las lecturas por muestras asignadas a cada taxón. Los valores significativamente diferentes son indicados con barras y asteriscos siendo **p < 0.001

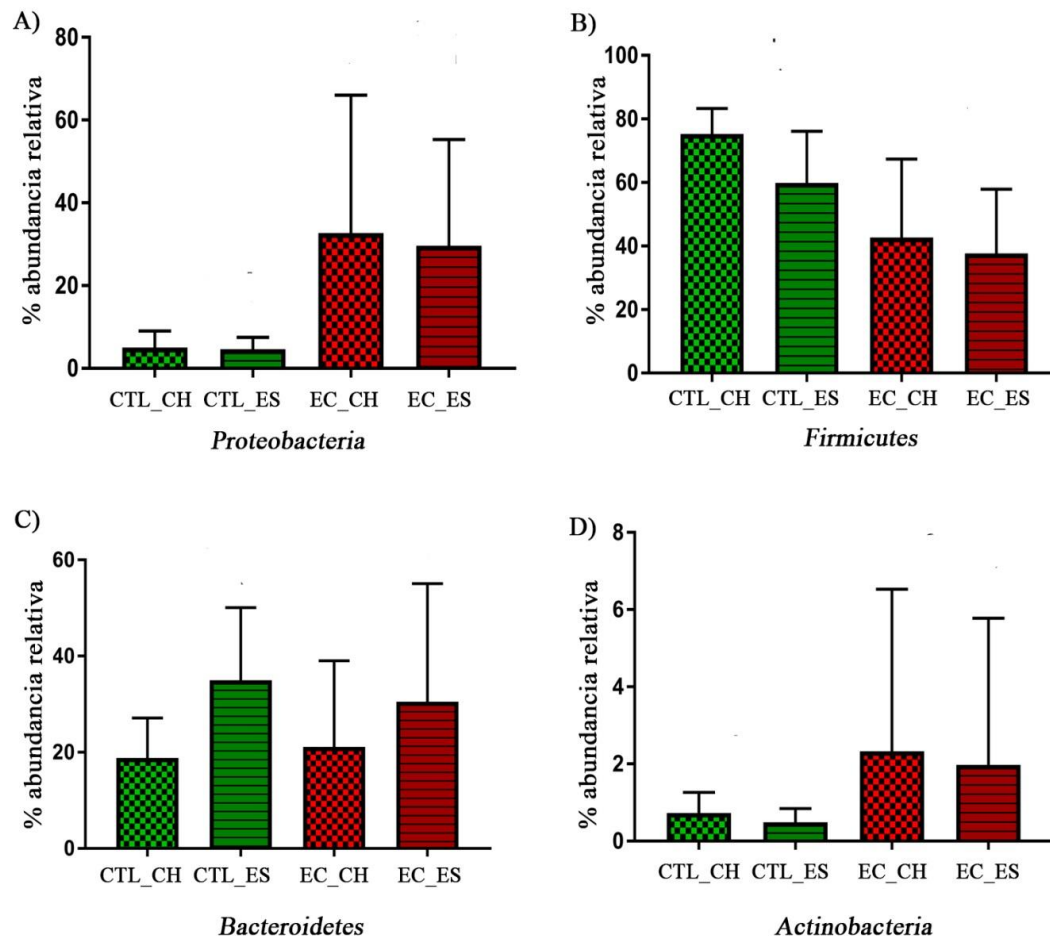


Figura 4. Comparación de abundancia relativa a nivel de phylum según la condición clínica y el país de origen de los individuos en estudio. En A) *Proteobacteria*, B) *Firmicutes*, C) *Bacteroidetes* y D) *Actinobacteria*. En verde se encuentran los individuos CTL y en rojo pacientes con EC. No se observaron diferencias significativas entre estos individuos

3.1.2 Distribución de individuos con EII y CTL según su composición microbiana

En el estudio previo realizado con las muestras de biopsias de los individuos españoles, en el que se utilizó la sistemática de OPU para el análisis de la microbiota (63), se logró observar que según su composición microbiana los pacientes con EC se clasificaban en 4 grupos distintos, en donde el grupo denominado CD1 obtuvo una predominancia de *Bacteroidetes* en

comparación al resto de los grupos, mientras las abundancias para CD2 fue de *Proteobacteria* y para CD3 de *Firmicutes*. El grupo CD4 presentaba una composición similar a los individuos control, cuya microbiota fue abundante en *Firmicutes*, seguido por *Bacteroidetes*. Considerando tanto las muestras obtenidas de individuos chilenos como de españoles y según la abundancia relativa de los OPUs por cada uno de los individuos, se realizó una matriz de distancia utilizando el índice de similitud de Bray-Curtis construyendo así un dendograma. En el dendograma se pueden observar con claridad la presencia de 5 clados distintos (Figura 5). El primero de ellos denominado grupo EII-1, se corresponde con el grupo CD1 del estudio español y está constituido por cuatro muestras de pacientes españoles con EC (EC_ES), dos muestras de pacientes chilenos con EC (EC_CH) y dos muestras de pacientes con CU; el grupo denominado EII-2, se corresponde con el grupo CD2 y está conformado sólo por muestras españolas de pacientes con EC; el grupo EII-3 correspondiente a CD3, incluye una muestra EC_ES, tres EC_CH y dos CU; el grupo EII-4 está formado por 2 muestras españolas, pertenecientes al grupo CD4 del estudio español, catorce individuos EC_CH, doce con CU, siete individuos CTL_ES y cinco CTL_CH (Figura 5). Además, el dendograma deja ver un nuevo grupo obtenido en este estudio, denominado EII-5, el cual comprende tres muestras EC_CH y cuatro muestras con CU (Figura 5). Es importante recordar que todas las muestras de pacientes con CU corresponden a pacientes chilenos.

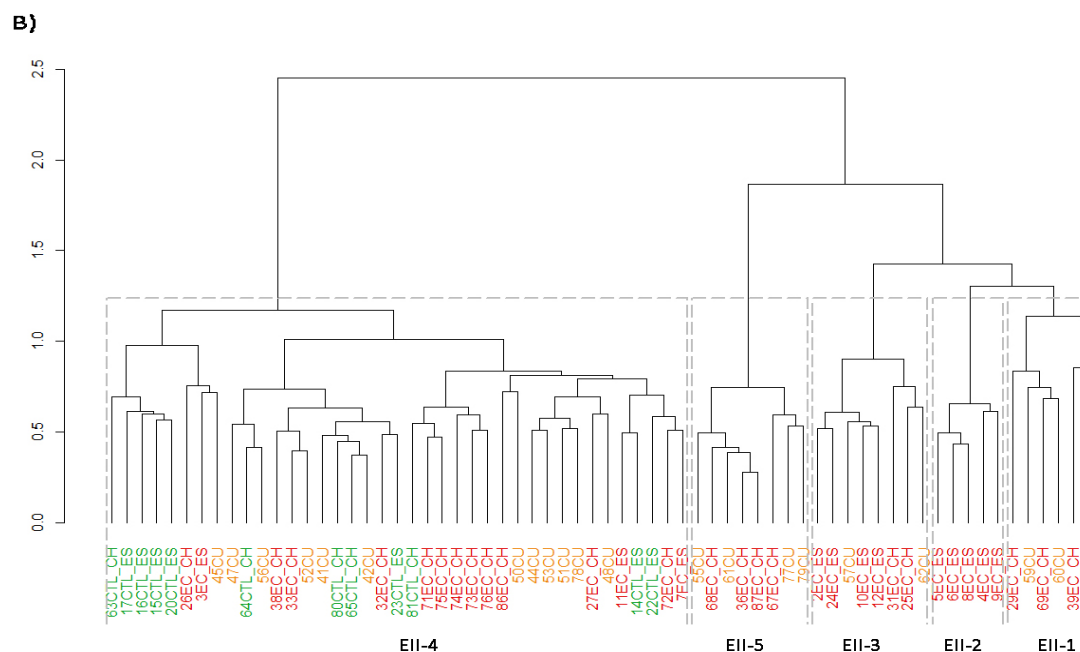


Figura 5. Análisis de agrupamiento de muestras chilenas y españolas con EC, CU y CTL. Según la abundancia relativa de los OPUs por cada individuo, se realizó una matriz de distancia utilizando el índice de similitud de Bray-Curtis. El análisis del dendrograma representa la similitud entre los sujetos según la abundancia relativa de los OPUs por cada muestra, pudiendo observar que los individuos con EC, CU y CTL se distribuyen dentro de los grupos EII-1, EII-2, EII-3, EII-4 y EII-5. En rojo se distinguen los individuos con EC, en naranja los individuos con CU mientras que en verde los individuos CTL.

Dado el agrupamiento de los individuos en EII-1, EII-2, EII-3, EII-4 y EII-5 y las características del país de origen (Chile, España), sexo (femenino o masculino, diagnóstico clínico (EC, CU O CTL), tratamiento (Sin tratamiento, 5-ASA, corticoides, inmunosupresores o tratamiento biológico), cirugía (resección de parte del intestino), se creó una tabla de contingencia (Tabla 6). Mediante el test de χ^2 , a pesar de encontrar asociaciones positivas y negativas entre los grupos y las variables mencionadas, estas no fueron significativas ($p=0.08$) (Figura 6).

Tabla 6. Matriz de contingencia

GRUPO	país		sexo		diagnóstico			tratamiento					cirugía	
	Chile	España	M	F	EC	CU	CTL	S.T	5_ASA	Cort	Inmprs	T. B	SI	NO
EII-1	4	4	6	2	6	2	0	2	2	1	5	1	5	4
EII-2	0	6	2	4	6	0	0	1	2	0	1	1	4	2
EII-3	5	1	4	2	4	2	0	1	1	0	3	1	4	2
EII-4	30	9	10	20	15	12	12	16	11	3	11	6	9	30
EII-5	7	0	2	5	3	4	0	0	4	1	3	2	2	5

Con el número de individuos observados entre la combinación de la variable grupo EII-1,EII-2, EII-3, EII-4, EII-5 y las variables de país de origen, género, cirugía, diagnóstico clínico y tratamiento se creó una matriz de contingencia. El test χ^2 fue utilizado para evaluar la asociación entre las variables mencionadas ($p=0.08$).

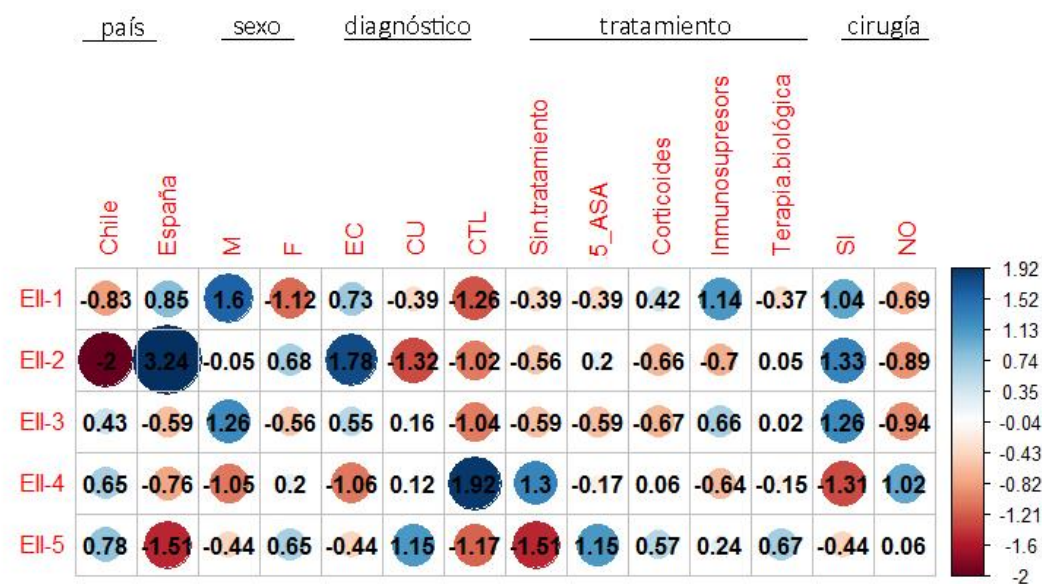


Figura 6. Dependencia entre las variables. A partir del test χ^2 se graficaron los valores residuales de Pearson. La asociación entre las variables en color azul corresponde a aquellas donde las asociaciones fueron positivas mientras que en color rojo la asociación es negativa entre las variables. Los números al interior de la circunferencia indican los valores residuales del test.

3.1.3. Composición bacteriana de acuerdo a los cinco grupos EII definidos

Una vez identificados los grupos, se procedió a caracterizar la composición bacteriana de cada uno de ellos. Los grupos EII-2, EII-3 y EII-5 presentaron una dominancia en el phylum *Proteobacteria* (Figura 7A), siendo todas estas significativamente diferentes a la abundancia relativa obtenida en EII-4 (EII-4 =10.6% vs: EII2=57.2%, $p=3.1e-4$; EII-3=51.9%, $p=8.3e-3$ y EII-5=75.4%, $p=6.0e-6$). Continuando con el phylum *Proteobacteria* EII-2, EII-3 y EII-5 presentaron una dominancia en la clase *Gammaproteobacteria*, siendo estas diferencias significativas con respecto a EII-4 (EII-4=5.53% vs: EII2=25.02%, $p=4.1e-3$; EII-3= 26.3%, $p=8.0e-4$; EII-5=26.3%, $p=3.8e-3$) (Figura 8A). En la clase *Betaproteobacteria*, EII-2 presentó diferencias significativas en su abundancia relativa con respecto EII-4 (11.87% vs 2.31%,

$p=9.8e-4$) (Figura 8B). EII-2 también presentó una dominancia en la clase *Alphaproteobacteria* (19.85%), seguido por EII-5 (9.80%), ambos presentaron diferencias significativas respecto de los grupos EII-1 y EII-4 (Figura 8C).

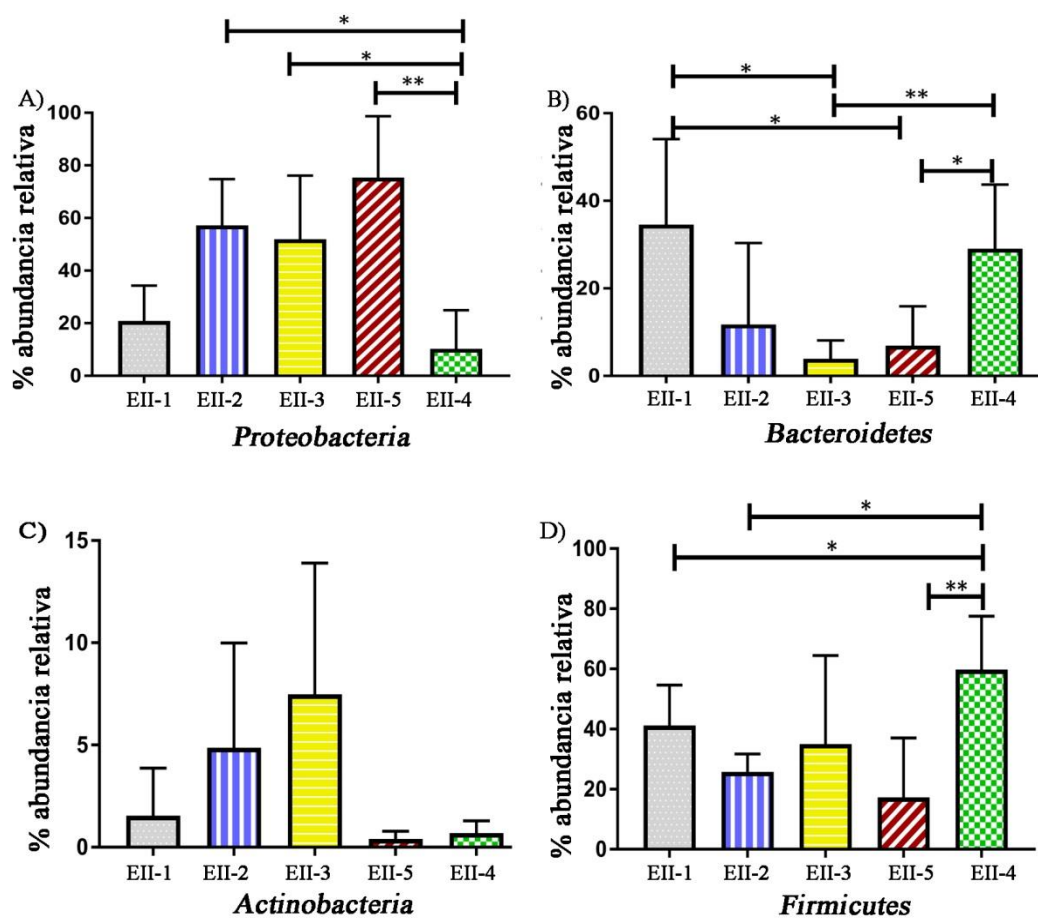


Figura 7. Abundancia relativa de las phyla bacterianas. Se presenta la abundancia relativa para las phyla A) *Proteobacteria*, B) *Bacteroidetes*, C) *Actinobacteria*, D) *Firmicutes*. Los valores significativamente diferentes son indicados con barras y asteriscos siguiendo: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

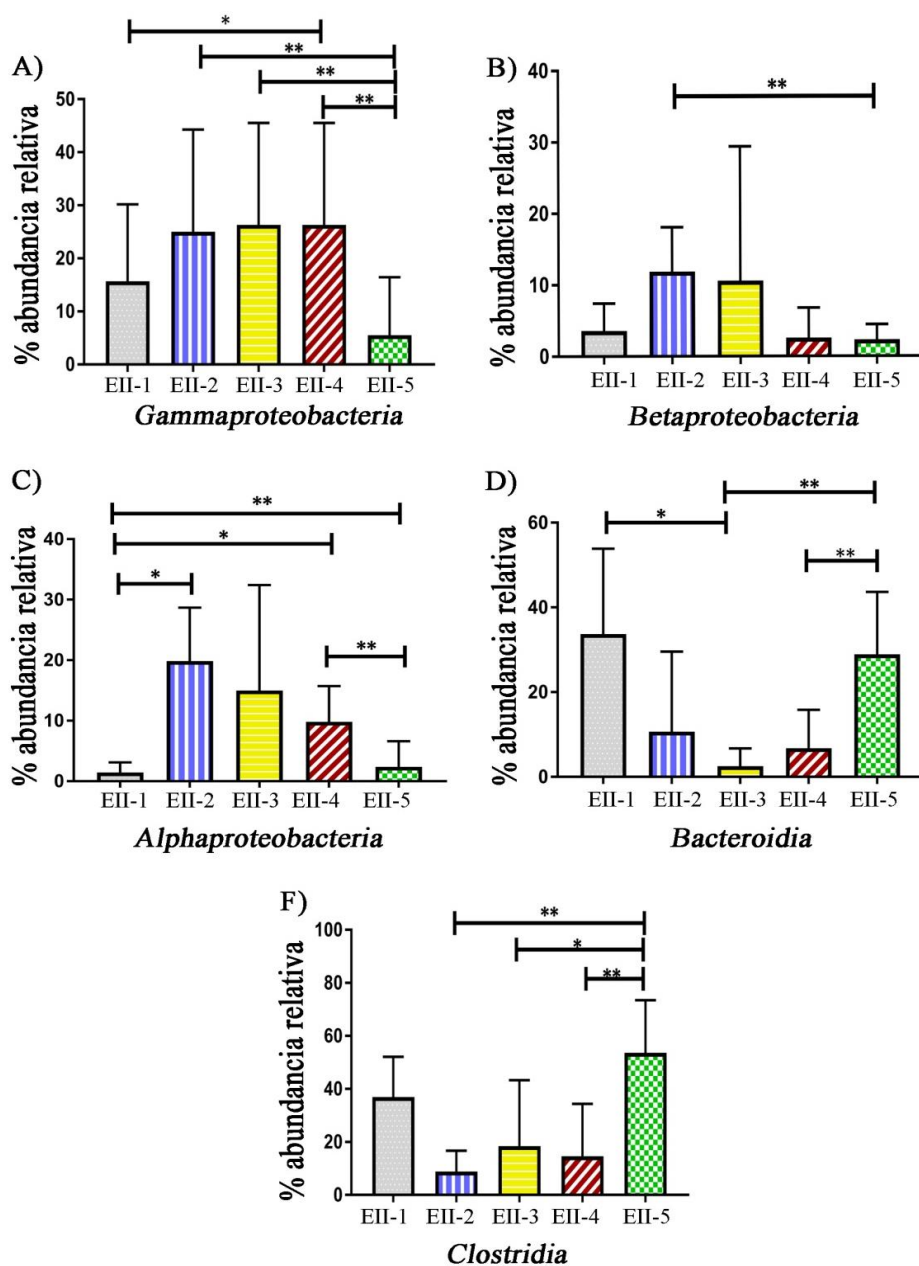


Figura 8. Abundancia relativa de las clases bacterianas. Se presenta la abundancia relativa para las phyla A) *Gammaproteobacteria*, B) *Betaproteobacteria*, C) *Alphaproteobacteria*, D) *Bacteroidia*, E) *Clostridia*. Los valores significativamente diferentes son indicados con barras y asteriscos siguiendo: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Al estudiar el phylum *Bacteroidetes*, EII-1 presentó la mayor abundancia para este phylum seguido por el grupo EII-4. Ambos grupos presentaron diferencias significativas con respecto a EII-3 (EII-3=7.4% vs: EII-1=34.5%, $p=0.04$; EII-4=28.6%, $p=4.1e-5$) y a EII-5 (EII-

5=6.09% vs: EII-1=34.5%, $p=0.03$; EII-4=28.6%, $p=1.0e-3$) (Figura 7B). Tanto EII-1 como EII-4 presentaron dominancia en la clase *Bacteroides*, siendo significativamente diferentes a EII-3 y EII-5 (figura 8D).

El grupo EII-3, presentó la mayor abundancia para el phylum *Actinobacteria* (7.4%) seguido por el grupo EII-2 (4.8%) (Figura 7C), sin embargo, estas diferencias no fueron significativas con respecto a las abundancias del resto de los grupos. En relación al phylum *Firmicutes*, EII-4 presentó la mayor abundancia (59.85%), siendo esta significativamente diferente a las obtenidas en EII-1 (41.20%, $p=0.04$), EII-2 (25.80%, $p=1.8e-3$) y EII-5 (17.28%, $p=4.7e-4$) (Figura 7D). Siempre asociado a la abundancia relativa del phylum *Firmicutes*, EII-4 presentó una dominancia en la clase *Clostridia* (53.64%), siendo esta significativamente mayor a la observada en los grupos EII-2 (8.84%, $p=0.026$), EII-3 (18.42%, $p=0.035$) y EII-5 (14.64%, $p=1.92e-3$) (Figura 8E). Según los antecedentes expuestos los individuos pertenecientes a los grupos EII-5, EII-2 y EII-3 presentan una microbiota disbiótica característica de pacientes con EII, mientras que el grupo EII-1 presenta un perfil de EII menos exacerbado en comparación a los grupos mencionados anteriormente. El grupo EII-4 presentó una microbiota semejante a lo observado en individuos “control” chilenos sin EII o bien individuos “sanos” cuando nos referimos a los controles españoles.

3.1.4 Análisis de la identidad de los OPUs relevantes que discriminan para cada uno de los cinco grupos caracterizados.

El estudio de la composición bacteriana, pero a nivel de OPUs, permitió reconocer 614 OPUs distintos en la totalidad de las muestras analizadas. A partir de ellos se estimaron aquellos

que permitieran discriminar a cada uno de los grupos de EII (Tabla 5). Para los grupos EII-1 y EII-4 predominaron los OPUs asociados al phylum *Firmicutes*. Siendo los OPUs indicadores para EII-1: OPU-206 afiliado a *Ruminococcus gnavus*, OPU-142 afiliado a *Clostridium ramosum* y OPU-314 con afiliación a *Butyricoccus pullicaecorum/Eubacteria desmolans*. Los OPUs, OPU-89 *Bacteroides faecis/ B. finegoldii/ B. thetaiotaomicron*, perteneciente al phylum *Bacteroidetes*, y el OPU-046-2 afiliado a *Sutterella wadsworthensis*, perteneciente a *Proteobacteria* también fueron indicadores de EII-1. Con respecto a EII-4 los OPUs indicadores se encontraron afiliados a las familias *Eubacteriaceae*, *Ruminococcaceae*, *Clostridiaceae* y *Lachnospiraceae*. El OPU-253 afiliado a *Eubacterium rectale*, uno de los microorganismos productores de butirato en el intestino, se encontró presente en el 90% de las muestras del grupo EII-4. Continuando con la familia *Eubacteriaceae*, el OPU-298 *Eubacterium coprostanoligenes*, tuvo una abundancia del 0.54%, mientras que para los grupos EII-1, EII-2 y EII-3 no se encontraron lecturas asociadas a este OPU.

Asociados a la familia *Ruminococcaceae* se encontró el OPU-291, con filiación a *Geminger. formicilis/Subdoligranulum variabile* y el OPU-290, a *Faecalibacterium prausnitzii*, siendo esta última una reconocida especie asociada como indicador de individuos sanos, en la literatura (59). En nuestro estudio el OPU-290 se encontró presente en el 97.5% de las muestras pertenecientes al grupo EII-4, mientras que para el resto de los grupos su abundancia relativa estuvo por debajo del 7%. Los OPUs asociados a la familia *Lachnospiraceae* fueron; OPU-209 *Dorea formicigenerans*; OPU-215 *Blautia wexlerae* y OPU-220 *Blautia luti*. Continuando con las especies indicadoras de EII-4 el OPU-84, perteneciente al phylum *Bacteroidetes* y afiliado a *Bacteroides dorei-Bacteroides vulgatus*, mostró la mayor abundancia para este grupo (14.7%), seguido por el OPU afiliado a *Faecalibacterium prausnitzii* (Tabla 7).

En lo que respecta al grupo EII-2, predominaron los OPUs pertenecientes al phylum *Proteobacteria* siendo los OPUs indicadores: OPU-172 correspondiente a uncultured bacterium, OPU 070-2 con afiliación a *Agromonas oligotrophica*- *Bradyrhizobium japonicum*; OPU-67 emparentado con *Mesorhizobium plurifarum* y OPU-28 con afiliación a *Cupriavidus necator* - *Ralstonia pickettii*. Tanto el OPU-28 como el OPU-67 se encontraron presentes en todas las muestras españolas, incluyendo los controles de la misma nacionalidad (Materia suplementario Tabla 2). No obstante las muestras con EC españolas correspondientes al grupo EII-2, son las que presentaron una mayor abundancia para estas especies bacterianas (Tabla 7, Materia suplementario tabla 2).

Los OPUs que permitieron discriminar a EII-3 se distribuyeron entre las phyla *Actinobacteria*, *Firmicutes* y *Proteobacteria* (Tabla 7). Con respecto al phylum *Actinobacteria* estos OPUs fueron: OPU-410 afiliado a *Microbacterium hatanonis* y el OPU-179 afiliado a *Corynebacterium macjineleyi*/ *Corynebacterium tuberculostearicum*. En cuanto al phylum *Firmicutes* los OPUs indicadores fueron el OPU-484 asociado a *Lactobacillus acidophilus*, mientras que en el phylum *Proteobacteria* el OPU-79 afiliado a *Brevudimonas diminuta*/*Brevudimonas vancouverensis* fue el indicador más abundante.

El grupo EII-5, compuesto únicamente de muestras EC y CU chilenas, presenta un OPU indicador pertenecientes al phylum *Firmicutes*, este OPU fue el OPU-336 con afiliación a *Enterococcus faecalis*. El resto de los OPUs indicadores pertenecieron al phylum *Proteobacteria*, siendo estos los OPUs: OPU-64 afiliado a *Rhizobium borbori*/*Rhizobium larrymoorei*/*Rhizobium pusense*, OPU-69 *Rhizobium leguminosarum*/*Rhizobium tibeticum*/*Rhizobium tubonense*, OPU- 18 afiliado a *Aeromonas fluviialis*, OPU-525 afiliado a

Shewanella Sohaensis/Shewanella pacifica/Shewanella decolorationis/ Shewanella putrefacies y por último el OPU-08, con afiliación *Klebsiella oxytoca*, este último fue el OPU con mayor abundancia para EII-5, siendo esta de $31.4\% \pm 22.75$ y destacándose en aquellos pacientes con diagnóstico de adenoma vellosa (Materia suplementario Tabla 2). Mientras en el resto de los grupos, este OPU presentó un promedio de abundancia entre el 0.01% al 1.43%.

Por último se destaca el OPU-01 afiliado a *Escherichia coli- Shigella dysenteriae*, el cual presento una abundancia relativa de 2.29% para el grupo EII-4, mientras que para el resto de los grupos su abundancia relativa promedio se encontró al rededor del 11.4%

Tabla 7. Abundancia relativa en OPUs relevantes para los grupos EII-1, EII-2, EII-3, EII-5, EII-4.

Secuencia relativa cercana	EII-1	EII-2	EII-3	EII-5	EII-4
	promedio \pm des	promedio \pm des	promedio \pm des	promedio \pm des	promedio \pm des
OPU 206 <i>Ruminococcus gnavus</i>	9.75 \pm 4.42	1.38 \pm 0.82	0.17 \pm 0.33	0.05 \pm 0.92	0.31 \pm 0.83
OPU 142 <i>Clostridium ramosum</i>	7.80 \pm 6.50	1.45 \pm 1.34	0.23 \pm 0.52	0.32 \pm 1.13	0.50 \pm 1.21
OPU 314 <i>Butyrivibrio pullicaecorum/Eubacterium desmolans</i>	0.36 \pm 0.69	s.l	0.02 \pm 0.05	0.06 \pm 0.23	0.25 \pm 0.26
OPU 89 <i>Bacteroides faecis/B. finegoldii/B. thetaiotaomicron</i>	2.96 \pm 3.55	0.22 \pm 0.43	0.22 \pm 0.44	0.02 \pm 1.36	0.96 \pm 1.27
OPU 046-2 <i>Sutterella wadsworthensis</i>	2.24 \pm 1.43	s.l	s.l	0.00 \pm 0.47	0.20 \pm 0.50
OPU 070-2 <i>Agromonas oligotrophica/Bradyrhizobium japonicum</i>	0.03 \pm 0.07	3.28 \pm 3.15	0.05 \pm 0.07	0.04 \pm 0.12	0.04 \pm 0.10
OPU 67 <i>Mesorhizobium plurifarum</i>	0.16 \pm 0.20	5.65 \pm 2.20	0.02 \pm 0.02	0.04 \pm 0.17	0.07 \pm 0.15
OPU 28 <i>Cupriavidus necator/Ralstonia pickettii</i>	0.24 \pm 0.39	6.60 \pm 2.66	0.23 \pm 0.52	0.01 \pm 0.11	0.11 \pm 0.15
OPU 12 <i>Morganella morganii</i> subsp. <i>morganii</i>	0.14 \pm 0.27	1.73 \pm 1.04	0.10 \pm 0.14	0.00 \pm 0.05	0.01 \pm 0.04
OPU 172 bacteria no cultivable	0.12 \pm 0.20	5.36 \pm 1.30	s.l	0.00 \pm 0.02	0.04 \pm 0.11
OPU 179 <i>Corynebacterium macginleyi/C. tuberculostearicum</i>	0.11 \pm 0.20	0.07 \pm 0.13	0.35 \pm 0.43	0.00 \pm 0.01	0.01 \pm 0.02
OPU 410 <i>Microbacterium hatanonis</i>	s.l	s.l	0.27 \pm 0.38	0.02 \pm 0.04	0.01 \pm 0.03
OPU 484 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	0.00 \pm 0.01	s.l	0.41 \pm 0.73	0.00 \pm 0.04	0.01 \pm 0.04
OPU 79 <i>Brevundimonas diminuta/B. vancouveriensis</i>	s.l	0.10 \pm 0.20	5.87 \pm 9.72	0.00 \pm 0.97	0.21 \pm 0.89
OPU 336 <i>Enterococcus faecalis/Vagococcus fluvialis</i>	0.04 \pm 0.06	s.l	0.13 \pm 0.29	1.44 \pm 0.71	0.09 \pm 0.31
OPU 64 <i>Rhizobium borbori/R. larrymoorei/R. pusense</i>	0.03 \pm 0.08	0.24 \pm 0.47	0.14 \pm 0.30	4.88 \pm 4.28	0.72 \pm 3.04
OPU 69 <i>Rhizobium leguminosarum/R. tibeticum/R. tubonense</i>	0.01 \pm 0.02	0.34 \pm 0.40	0.13 \pm 0.25	3.04 \pm 2.22	0.20 \pm 0.83
OPU 8 <i>Klebsiella oxytoca</i>	0.01 \pm 0.02	s.l	0.22 \pm 0.49	32.16 \pm 19.23	1.46 \pm 6.74
OPU 18 <i>Aeromonas fluvialis</i>	0.00 \pm 0.01	6.56 \pm 13.03	0.02 \pm 0.05	1.81 \pm 1.12	0.09 \pm 0.38
OPU 525 <i>Shewanella sohaensis/S. pacifica/S. decolorationis/S. putrefaciens/S. baltica</i>	0.00 \pm 0.01	s.l	0.07 \pm 0.15	7.88 \pm 6.01	0.23 \pm 0.88
OPU 86 <i>Bacteroides dorei/B. massiliensis/B. sartorii/B. vulgatus</i>	20.93 \pm 17.37	3.50 \pm 6.52	1.33 \pm 2.35	2.35 \pm 11.09	15.00 \pm 11.53
OPU 253 <i>Eubacterium rectale</i>	s.l	s.l	0.13 \pm 0.30	0.02 \pm 1.69	1.24 \pm 2.27
OPU 145 bacteria no cultivable	0.10 \pm 0.26	s.l	0.75 \pm 1.26	0.44 \pm 1.61	2.70 \pm 6.48
OPU 290 <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	1.60 \pm 4.03	0.01 \pm 0.02	1.25 \pm 1.62	6.48 \pm 11.35	14.67 \pm 9.93
OPU 291 <i>Gemmiger formicilis/Subdoligranulum variabile</i>	0.01 \pm 0.01	s.l	0.44 \pm 0.83	0.04 \pm 1.20	1.76 \pm 2.98
OPU 209 <i>Dorea formicigenerans</i>	0.06 \pm 0.15	s.l	0.27 \pm 0.54	0.08 \pm 0.98	1.25 \pm 0.97
OPU 215 <i>Blautia wexlerae</i>	1.61 \pm 1.88	0.16 \pm 0.33	0.30 \pm 0.61	0.64 \pm 4.38	3.74 \pm 4.81
OPU 220 <i>Blautia luti</i>	0.23 \pm 0.58	s.l	s.l	0.14 \pm 0.85	0.99 \pm 0.90
OPU 298 <i>Eubacterium coprostanaligenes</i>	s.l	s.l	s.l	0.03 \pm 0.90	0.54 \pm 0.82
OPU 1 <i>Escherichia coli/Shigella dysenteriae</i>	14.38 \pm 13.78	7.72 \pm 2.22	11.55 \pm 20.36	12.31 \pm 7.53	2.29 \pm 3.44

Los valores representan el promedio del porcentaje de abundancia relativa de cada OPU por muestra y su desviación estándar (des). En rojo se muestran aquellos OPUs con mayor abundancia relativa para cada uno de los grupos. S.l= sin lecturas asociadas

3.1.5 Abundancia relativa de anaerobios facultativos, estrictos y aerobios en OPU indicadores

El intestino de individuos sanos en edad adulta se encuentra colonizado por anaerobios estrictos pertenecientes a las phyla *Firmicutes* y *Bacterioides*, siendo estos dominantes por sobre los anaerobios facultativos (73). Por el contrario, se sabe que en individuos con EII existe un incremento de bacterias anaerobias facultativas y una disminución de anaerobios estrictos (73). En este escenario, nos pareció interesante analizar la abundancia relativa de los OPU indicadores de cada grupo, pero ahora según el tipo de respiración de la bacteria afiliada a cada uno de ellos. En nuestro estudio observamos que EII-1 seguido por EII-4 presentan la mayor abundancia de anaerobios estrictos, siendo estas significativamente diferentes con EII-2 (EII-2: 6.71% vs EII-1: 45.3%, $p=0.02$; vs EII-4: 41.21%, $p=2.46e-3$), EII-3 (EII-3: 6.82% vs EII-1: 45.3%, $p=0.024$; vs EII-4: 41.21%, $p=2.8e-3$) y EII-5 (EII-5: 10.44% vs EII-1: 45.3%, $p=0.022$; vs EII-4: 41.21%, $p=8.9e-5$) (Figura 9 A). Con respecto a los anaerobios facultativos la mayor abundancia la presentó EII-5 seguido de EII-2, siendo estas significativamente diferentes a la abundancia obtenida en EII-4 (EII-4: 4.29% vs EII-5: 55.60%, $p=3.8e-6$; vs EII-2: 22.61%, $p=9.8e-4$) (Figura 9 A). Además de anaerobios, nuestros resultados también mostraron OPU indicadores afiliados a aerobios estrictos, siendo estos dominantes en EII-2 y EII-5 con abundancias relativas significativamente diferentes a las obtenidas en EII-4 (EII-4: 1.43% vs EII-2: 9.68%, $p=2.5e-3$; vs EII-5: 8.00%, $p=1.4e-4$) y EII-1 (EII-1: 1.57% vs EII-5: 8.00%, $p=0.012$) (Figura 9 A). Considerando los resultados anteriormente expuestos observamos que la mayor abundancia relativa de los OPU afiliados a bacterias aerobias en los grupos EII-5, EII-3 y EII-2 coincide con el grado de disbiosis observado en estos grupos a nivel de phylum (Figura 5).

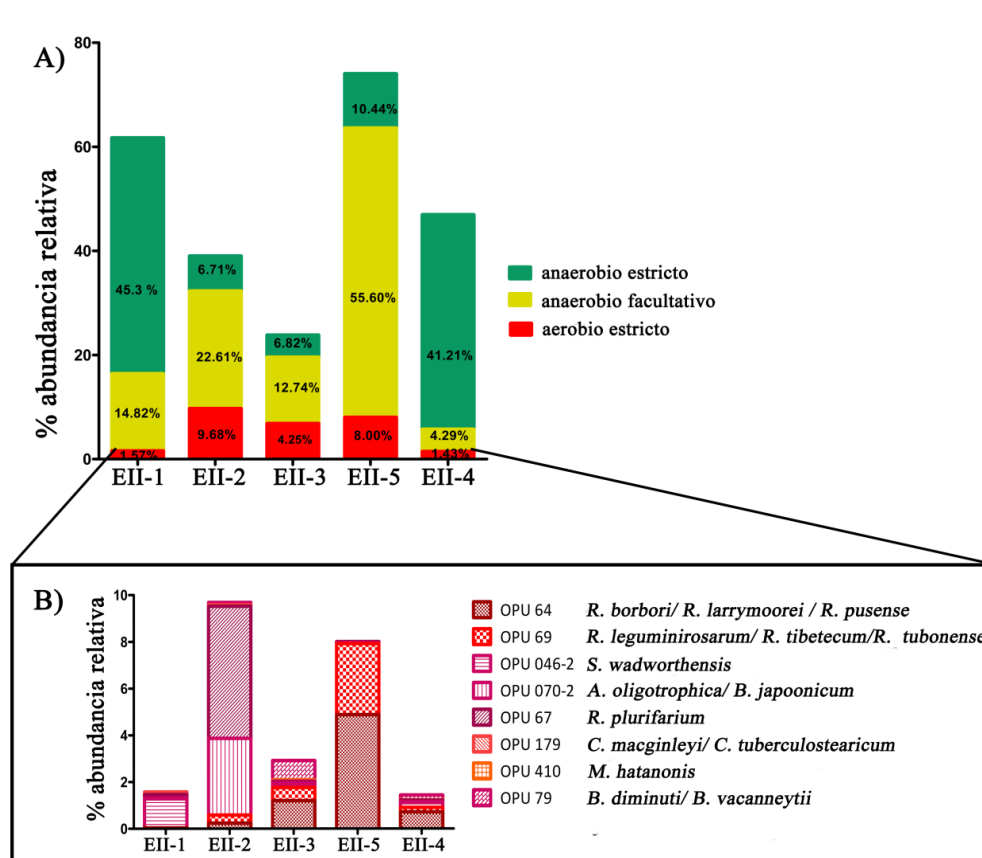


Figura 9. Abundancia relativa de OPU indicadores afiliados a bacterias anaerobias estrictas/facultativas y aerobias estrictas. La abundancia relativa de anaerobios estrictos/facultativos y aerobios estrictos A), fueron calculados considerando la abundancia relativa de los OPU indicadores de cada grupo. En B) se analizan específicamente las abundancias relativas de los OPU aerobios encontrados en cada grupo analizados en A).

En relación a nuestros resultados donde se describen OPU afiliados a microorganismos aerobios, observamos que en el grupo EII-2 estos fueron: OPU-67 (*Mesorhizobium plurifarium*, 5.65%) siendo su abundancia relativa significativamente diferente a la obtenida en EII-1 (0.16%, $p=0.041$), EII-5 (0.04%, $p=0.042$) y EII-4 (0.06%, $p=6.3e-4$) (Figura 9 B). Por otro lado, en EII-5 los OPU más abundantes fueron: OPU-64 (*Rhizobium borbori/Rhizobium larrymoorei/Rhizobium pusense*, 4.88%), presentando diferencias significativas con los grupos

EII-1 (0.032%, $p=0.01$), EII-3 (1.2%, $p=0.02$) y EII-4 (0.72%, $p=1.5e-4$); y el OPU-69 (*Rhizobium leguminosarum/Rhizobium tibeticum/ Rhizobium tubonense*, 3.04%) siendo su abundancia significativamente diferente a la encontrada en EII-1 (0,008%, $p=0.010$) y EII-4 (0,19%, $p=5.8e-05$). Aunque estadísticamente el OPU-042-6, afiliado a *S. wadworthensis* no mostro diferencias significativas, observamos que es más abundante en el grupo EII-1 (1.32%) en comparación a EII-4 (0.22%), lo que podría diferencia a ambos grupos que poseen una microbiota similar a nivel de phylum (Figura 5 y 9 B).

3.2 Objetivo específico 2: Construir redes de asociación biológica entre la microbiota bacteriana colónica descrita en individuos con EC, CU y CTL.

3.2.1 Redes de asociación basadas en la abundancia relativa y coexistencia bacteriana entre OPUs indicadores para cada grupo de pacientes

Con el objetivo de evaluar matemáticamente las posibles relaciones de exclusión (correlaciones negativas) dadas en el intestino, se realizó una matriz de correlación con los 30 OPUs indicadores de cada grupo (Figura 10). En esta matriz, se observaron correlaciones positivas significativas ($p<0.05$) entre los OPUs pertenecientes a un mismo grupo y además, entre el OPU-1 (*Escherichia. coli/Shigella dysenteriae*), abundante los grupos EII-1, EII-2, EII-3 y EII-5, y los OPUs: OPU-206 (*Ruminococcus gnavus*), OPU-142 (*Clostridium ramosum*), ambos pertenecientes a EII-1 y los OPUs: OPU-69 (*Rhizobium leguminosarum/Rhizobium tibeticum /Rhizobium tubonense*), OPU-8 (*Klebsiella oxytoca*) y OPU-336 (*Enterococcus faecalis/Vagococcus fluvialis*), todos ellos pertenecientes a EII-5.

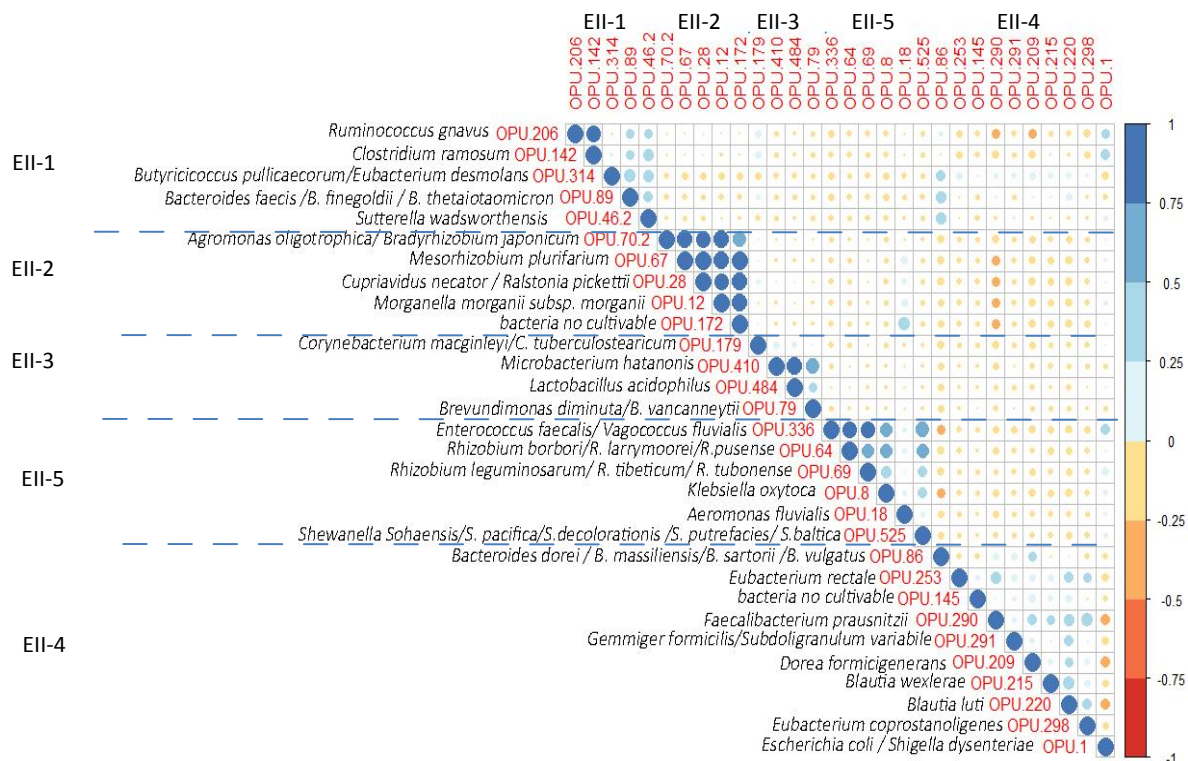
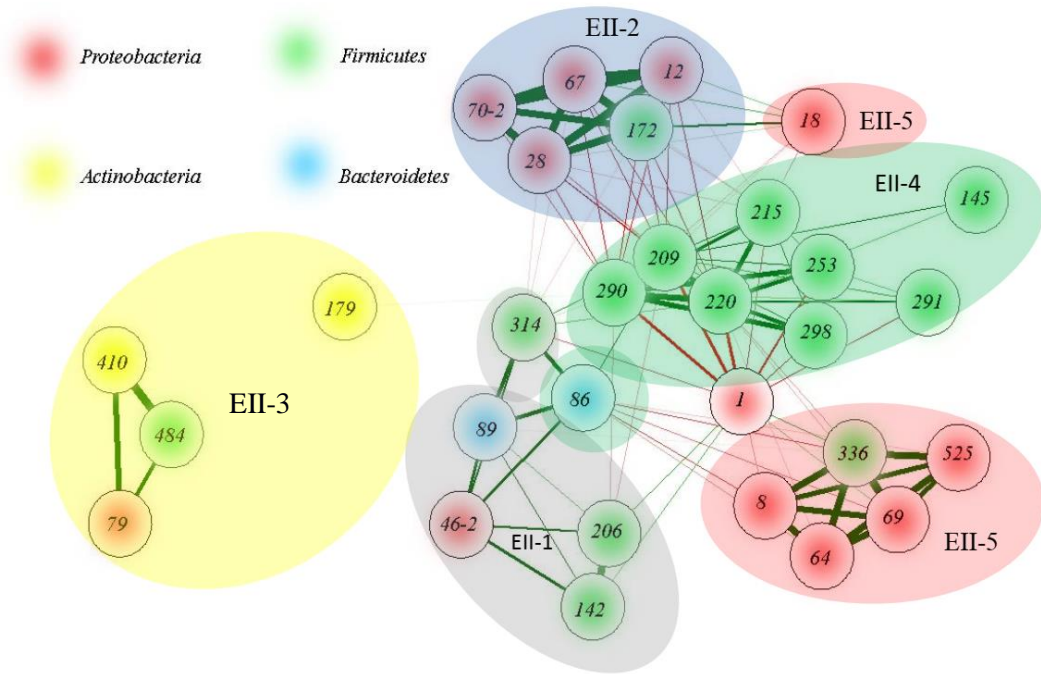


Figura 10. Matriz de correlación entre OPUs relevantes que discriminan a cada grupo. El tamaño de la circunferencia y la intensidad de color indican la fuerza de correlación entre los OPUs, siendo de color azul las correlaciones positivas y en rojo las negativas.

También se observaron correlaciones positivas entre el OPU-18 (*Aeromonas fluvialis*), perteneciente al grupo EII-5 y los OPUs: OPU-67 (*Mesorhizobium plurifarium*), OPU-28 (*Cupriavidus necator* / *Ralstonia pickettii*), OPU-12 (*Morganella. morgani*) y OPU-172 (bacteria no cultivable), todos ellos pertenecientes al grupo EII-2. Así mismo, también se observaron correlaciones positivas entre el OPU-86 (*Barcteroides dorei* / *Bacteroides vulgatus*) perteneciente a EII-4 y los OPUs: 314 (*Butyricoccus pullicaecorum/Eubacterium desmolans*), OPU-89 (*Bacteroides faecis* /*Bacteroides finegoldii* / *Bacteroides thetaiotaomicron*) y 46-2 (*Sutterella wadsworthensis*), todos estos indicadores de EII-1. (Figura 11)



OPU 1	OPU-8	OPU-18	OPU-28	OPU 046-2
<i>Escherichia coli/Shigella dysenteriae</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Aeromonas fluviialis</i>	<i>Cupriavidus necator/Ralstonia pickettii</i>	<i>Sutterella wadsworthensis</i>
OPU-64	OPU-67	OPU 69	OPU-070-2	OPU 79
<i>Rhizobium borbori/R. larrymoorei/R. pusense</i>	<i>Mesorhizobium plurifarum</i>	<i>Rhizobium leguminosarum/R. tibeticum/R. tubonense</i>	<i>Agromonas oligotrophica/Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Brevundimonas diminuta/B. vancouveriensis</i>
OPU-86	OPU-89	OPU-142	OPU-145	OPU- 179
<i>Bacteroides dorei/B. massiliensis/B. sartorii/B. vulgatus</i>	<i>Bacteroides faecis/B. finegoldii/B. thetaiotaomicron</i>	<i>Clostridium ramosum</i>	uncultured bacterium	<i>Corynebacterium macginleyi/C. tuberculostearicum</i>
OPU-206	OPU-209	OPU-215	OPU-220	OPU-253
<i>Ruminococcus gnavus</i>	<i>Dorea formicigenerans</i>	<i>Blautia wexlerae</i>	<i>Blautia luti</i>	<i>Eubacterium rectale</i>
OPU-290	OPU-291	OPU-298	OPU-314	OPU-336
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	<i>Gemmiger formicilis/Subdoligranulum variabile</i>	<i>Eubacterium coprostanoligenes</i>	<i>Butyricoccus pullicaecorum/Eubacterium desmolans</i>	<i>Enterococcus faecalis/Vagococcus fluviialis</i>
OPU-410	OPU-484	OPU-525		
<i>Microbacterium hatanonis</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Shewanella Sohaensis/S. pacifica/S. putrefaciens</i>		

Figura 11. Red de co-ocurrencia bacteriana de especies indicadoras. En cada círculo de la figura se denota el número de OPUs, mientras que en el recuadro nombra la bacteria afiliada a cada número de OPU. En círculos rojos se marcan aquellos OPUs pertenecientes a las phyla *Proteobacteria*, en verde *Firmicutes*, en amarillo *Actinobacteria* y en celeste *Bacteroidetes*. Las elipses encierran a los OPUs indicadores de cada grupo. Las líneas de color verde muestran correlaciones positivas entre las bacterias, mientras las de color rojo muestran correlaciones negativas ($p < 0.05$). El grosor de las líneas verdes y rojo se ve aumentado con la fuerza de correlación positiva o negativa respectivamente.

Por el contrario, las correlaciones negativas significativas fueron observadas entre el OPU-1 y los OPUs: OPU-253 (*Eubacterium rectale*), OPU-209 (*Dorea formicigenerans*), OPU-215 (*Blautia wexlerae*), OPU-220 (*Blautia luti*), OPU-298 (*Eubacterium coprostanoligenes*), OPU-291 (*Gemmiger formicilis/ Subdoligranulum variabile*), OPU-290 (*Faecalibacterium prausnitzii*), todos estos indicadores de EII-4 y el OPU 314 (*Butyricoccus pullicaecorum/Eubacterium desmolans*) indicador de EII-1. Adicionalmente, también se observaron correlaciones negativas entre el OPU-314 y los OPUs: OPU-336 (*Enterococcus*

faecalis/Vagococcus fluvialis), OPU-64 (*Rhizobium borbori/ Rhizobium larrymoorei/ Rhizobium pusense*), OPU-08 (*Klebsiella oxytoca*), OPU-69 (*Rhizobium leguminosarum/ Rhizobium tibeticum/ Rhizobium tubonense*), todos estos indicadores de EII-5 y los OPU: OPU-28(*Cupriavidus necator / Ralstonia pickettii*), OPU-67(*M. plurifarum*), OPU-12 (*Morganella morganii*), OPU-70.2 (*Agromonas oligotrophica/ Bradyrhizobium japonicum*) y OPU-172 (bacteria no cultivable, afiliada a *Firmicutes*), todos estos indicadores de EII-2. Además, los OPU indicadores de EII-2 y EII-5 se correlacionaron negativamente con el OPU-290 (*Faecalibacterium prausnitzii*), OPU-209, (*Dorea formicigenerans*), OPU- 215 (*Blautia wexlerae*) y OPU-220 (*Blautia luti*), indicadores de EII-4. (Figura 9)

3.3 Objetivo específico N°3: Determinar los niveles de expresión relativa de los PAMs (hBD2-4) y CAMP en pacientes con EC, CU y controles.

3.3.1. Expresión relativa de PAMs en individuos EC, CU y CTL

Una vez estudiada la composición microbiana de los individuos agrupados entre los grupos EII1 al EII5, correspondió analizar la expresión relativa de los péptidos antimicrobianos. Este estudio sólo fue realizado en pacientes chilenos y en aquellas muestras en donde el ARNm se encontró íntegro de acuerdo a la información que entregan los geles de integridad. En total, la expresión relativa de las defensinas fue analizada en 13 individuos siendo 5 de ellos EC, 6 CU y 2 CTL, para ninguno de ellos se detectó la expresión de las hBD-3 y 4 (Figura 12 C y D), por lo que los siguientes análisis se realizaron con CAMP y hBD-2. Los genes de referencia *GADPH* y *18S* fueron utilizados como controles de normalización y no se observaron diferencias en su expresión en las muestras estudiadas. Finalmente, las expresiones de CAMP y hBD-2 fueron normalizadas utilizando el gen de referencia *GADPH* descrito previamente (76). Nuestros

resultados no mostraron diferencias en la expresión relativa del ARNm de CAMP y hBD-2 entre EC y CU (Figura 13 A y B). Con respecto a las muestras CTL, no se observó la expresión relativa del ARNm de hBD-2 (Figura 13B). Considerando el bajo número de muestras desde las cuales se pudo recuperar ARNm de calidad, no fue posible establecer si existen diferencias significativas en la expresión de PAMs entre los grupos de estudio.

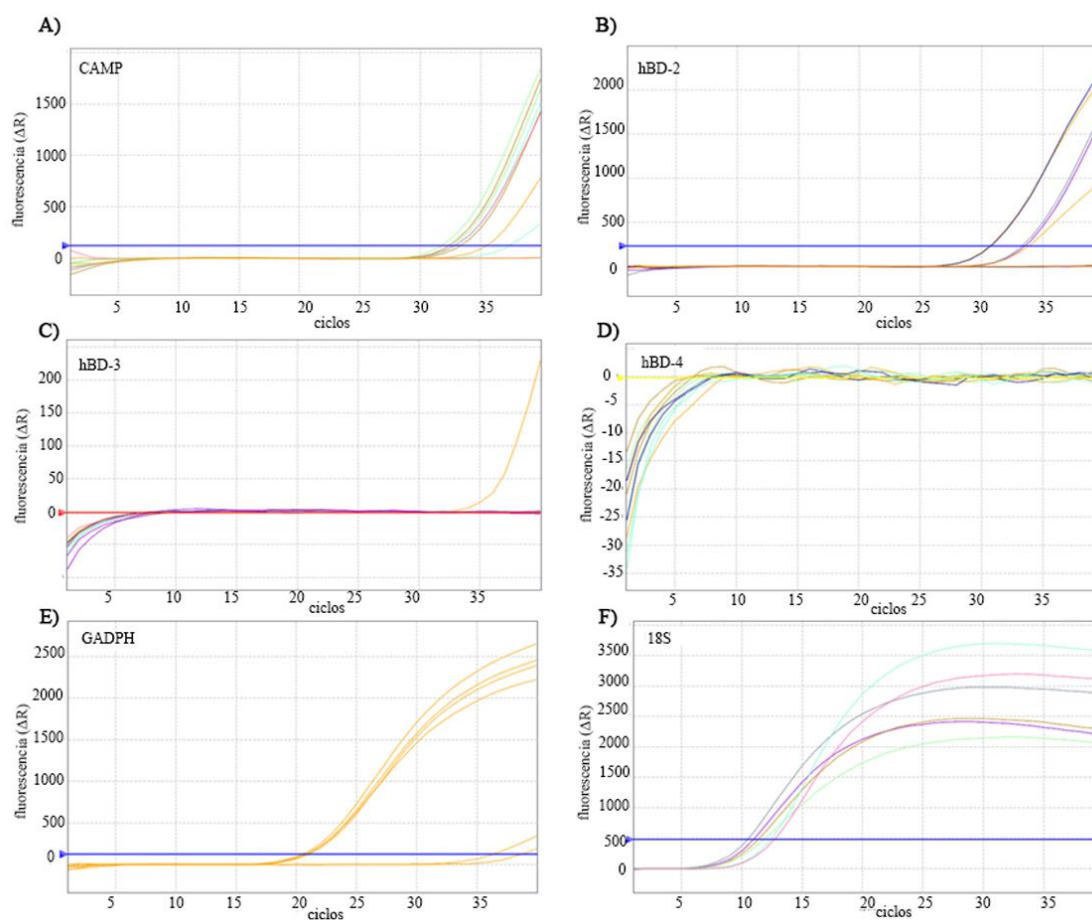


Figura 12. Curvas de expresión de PAMs. Curvas representativas de la expresión de A) CAMP, B) hBD-2, C) hBD-3, D) hBD-4, E) GADPH y F) 18S.

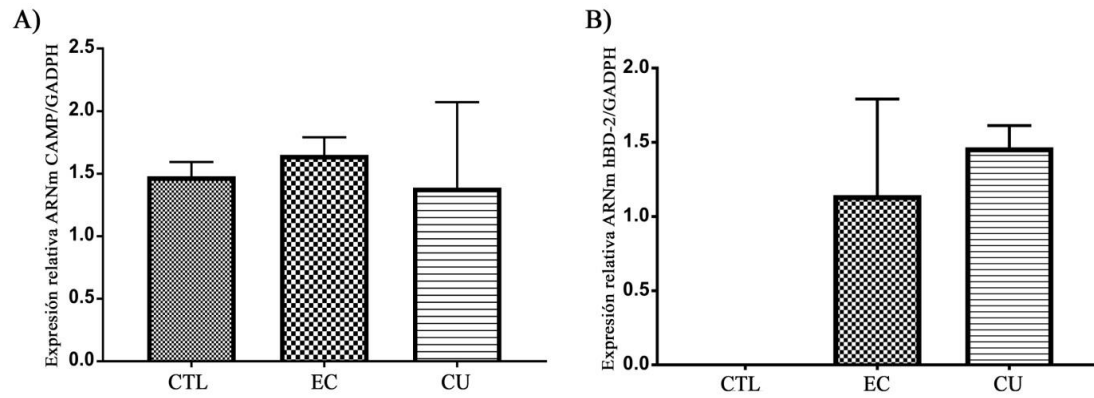


Figura 13. Expresión relativa de péptidos antimicrobianos. A) Expresión relativa del gen CAMP. B) Expresión relativa del gen hBD-2. La expresión de cada PAMS fue normalizada por el valor del gen de referencia GADPH. N=13

4. DISCUSIÓN

Estudios recientes han explorado el potencial para identificar estados de enfermedad basados en la composición microbiana asociada al huésped, incluyendo psoriasis (119), obesidad (120), autismo (121) o EII (122). Además, en el caso de patologías del sistema gastrointestinal como en EII, Dirk Gevers y colaboradores (55) evaluaron la composición de la microbiota en tres tipos diferentes de muestras (biopsias de tejido de íleon, recto y muestras de heces). Los resultados expuestos muestran que el mejor rendimiento para clasificar EC (de acuerdo a su composición microbiana) fue obtenido por las muestras íleon seguido de cerca por las biopsias rectales, mientras que las muestras de heces tuvieron un rendimiento inferior al tratar de clasificar la microbiota asociada con la enfermedad (55).

La microbiota adherente del colon, obtenida desde muestras de biopsias, es representativa de la comunidad microbiana que co-evoluciona con el hospedero en el transcurso de la enfermedad (27) interactuando de forma directa con el sistema inmunitario del individuo, en comparación a aquellas bacterias luminales, las cuales pueden incluir en su estructura microbiota transiente y no replican completamente los perfiles microbianos asociados a la mucosa que podrían estar interactuando de manera única con las células epiteliales e inmunitarias (123). Debido a los antecedentes expuestos, decidimos caracterizar la microbiota asociada a mucosa de individuos con EII obteniendo muestras de biopsias de individuos diagnosticados con EC y CU. No obstante, destacamos la dificultad en el proceso de obtención de este tipo de muestra en individuos CTL, donde la mayoría de los individuos que fueron sometidos al procedimiento de colonoscopia tenían algún antecedente familiar que representaba

riesgo de poseer algún tipo de enfermedad intestinal o cáncer de colon. En estas condiciones, los individuos CTL no pueden describirse como sujetos completamente sanos. En relación a este punto, inicialmente nuestro trabajo contó con 9 individuos diagnosticados como CTL, no obstante dos de estos fueron posteriormente diagnosticados con adenoma veloso, (un pólipo premaligno del tracto gastrointestinal). Estas lesiones tienen malignidad entre 4% a 40%, por lo que su presencia sería un factor de riesgo de padecer cáncer rectal. Una vez caracterizada su microbiota, al igual que pacientes con EII, los individuos con adenoma veloso mostraron una disbiosis en su microbiota con un incremento en la abundancia relativa de *Proteobacterias* en comparación a individuos CTL (Materia suplementario figura 2), lo cual ha sido previamente reportado en la literatura (101). Con estos antecedentes, decidimos eliminar las muestras de los individuos diagnosticados con adenoma veloso, además de dos muestras de individuos clasificados inicialmente como CTL las cuales mostraban una composición microbiana similar a la de los individuos con adenoma veloso.

Por otro lado, tal como se ha descrito en los estudios realizado a partir de muestras de heces(67), la microbiota adherente en los individuos con EII presentó una mayor abundancia en el phylum *Proteobacteria* en comparación a individuos CTL. No obstante, y a diferencia de los estudios realizados por Uri Gophna y colaboradores (67), en nuestros resultados no observamos diferencias significativas en el phylum *Proteobacteria* entre los individuos con EC y CU. Continuando con este punto, un estudio realizado en individuos con CU mostró que las muestras de biopsias de estos individuos presentaron una mayor abundancia en el phylum *Proteobacteria* en comparación a las muestras de heces tomadas desde los mismos sujetos (17), debido a esto sugerimos que nuestros resultados se contrastan a los expuestos por Uri Gophna y colaboradores debido en parte a la procedencia de la muestra.

En lo referente a phylum *Firmicutes*, observamos diferencias significativas entre los individuos con EC y CTL, siendo estos últimos los que presentan una mayor abundancia. No observamos diferencias significativas entre los individuos CTL y CU para las phyla *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Actinobacterias*, por lo que sugerimos que los individuos con CU presentarían a nivel de phylum una microbiota similar a los individuos CTL.

Por otro lado, según la composición microbiana, de los 5 grupos obtenidos nos pareció particularmente interesante el grupo EII-4, ya que contiene individuos con EII en conjunto con individuos CTL. Este grupo presentó una mayor abundancia de bacterias representativas de individuos sanos, destacando los OPUs afiliados a las bacterias *F. prausnitzii*, *E. rectale* pertenecientes al phylum *Firmicutes*, y *B. dorei/B.vulgatus* perteneciente al phylum *Bacteroides*, en comparación al resto de los grupos con EII (124). En el caso de *F. prausnitzii*, es una de las especies bacterianas más abundantes en la microbiota intestinal humana de adultos sanos (representando más del 5% de la población bacteriana total) (124) que junto con *E. rectale*, son relevantes para la producción de butirato (125), ácido graso de cadena corta que juega un papel importante en la integridad de la mucosa del colon, regulando la proliferación y la diferenciación celular, además de disminuir la expresión de citoquinas proinflamatorias (126).

Según un estudio publicado por Jonas Halfvarson y colaboradores (127), la microbiota de pacientes con EII es dinámica, y en ocasiones fluctúa dentro de un plano de microbiota propia de individuos sanos (particularmente en aquellos individuos que reciben tratamiento con corticoides) para luego volver a un estado de disbiosis (127). En relación a lo expuesto, en nuestro estudio aquellos individuos diagnosticados con EII y con tratamiento con corticoides se agruparon principalmente en EII-4, presentando una microbiota característica de individuos sanos. Lo anterior, nos permite inferir que su clasificación en conjunto con individuos CTL podría corresponder a un estado de fluctuación hacia una microbiota sana coincidente con la

toma de muestra, o bien, que aquellos individuos con EII agrupados en EII-4 podrían encontrarse en un estadio inicial de la enfermedad sin presentar disbiosis.

Por otro lado, considerando que los individuos del grupo EII-1 presentan un enriquecimiento de las phyla *Firmicutes* y *Bacteroidetes* con una baja abundancia de *Proteobacteria*, semejante a lo observado en el grupo EII-4, es factible pensar que estos individuos presentan una disbiosis leve en comparación a los grupos EII-2, EII-3 y EII-5. Sumado a lo anterior, el OPU-206 afiliado *R. gnavus*, es un OPU abundante e indicador de individuos en el grupo EII-1, que presentó correlaciones positivas con el OPU-86 afiliado a *B. vulgatus*, indicador del grupo EII-4 y que también es abundante en EII-1. Una de las explicaciones de esta asociación es que *R. gnavus* secreta α - y β -glucosidasas al medio extracelular y estas glucosidasas son capaces de remover los azúcares terminales de las mucinas intestinales (128), los que una vez removidos permiten que los oligosacáridos expuestos de las mucinas se vuelven fácilmente degradables por otras bacterias colónica no mucolíticas tales como *B. vulgatus* (128). De este modo, la abundancia de *R. gnavus* podría beneficiar de manera positiva el crecimiento de *B. vulgatus*. Adicionalmente, en nuestra red observamos que el OPU-86 (*B. vulgatus*) se correlacionó positivamente con *B. pullicaecorum* (OPU-314), indicadora del EII-1 y abundante en EII-4. En este sentido, se ha descrito que la administración de *B. pullicaecorum*, en un modelo murino de colitis inducido por ácido 2,4,6-trinitrobenceno sulfónico (TNBS), ha mostrado tener un nivel protector significativo al disminuir los niveles de TNF- α y IL-12, citoquinas que están incrementadas en individuos con EII (129). Sumado a lo anterior, pacientes con EII han mostrado poseer una abundancia significativamente menor de *B. pullicaecorum* en comparación a individuos CTL (129). Debido a los antecedentes expuestos y a la mayor abundancia de *B. pullicaecorum* en EII-1 y EII-4 en comparación al resto de los

individuos, proponemos que esta bacteria tendría propiedades protectoras que impedirían la exacerbación de una disbiosis en individuos con EII en ambos grupos.

Con respecto a los grupos EII-2, EII-3 y EII-5, estos presentaron una mayor abundancia del phylum *Proteobacteria* y una menor abundancia del phylum *Firmicutes* en comparación a EII-4 y EII-1. Estos resultados permiten plantear que en base a la composición microbiana de estos grupos, ellos se ordenarían en EII-3 < EII-2 < EII-5, siendo este último grupo el que presenta el mayor grado de disbiosis. El grupo EII-5 fue el que mostró los mayores porcentajes de abundancia de *Proteobacteria* y la menor abundancia de *Firmicutes* (Figura 6). Con respecto a EII-3, la especie indicadora más abundante fue *B. diminuta*/*B. vancouveriensis* (OPU-79), seguida por *L. acidophilus* (OPU-484). Hasta la fecha no existen reportes de la implicancia de ambas bacterias en el desarrollo de EII, no obstante *L. acidophilus*, inhibe la adhesión e invasión de cepas patógenas de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) H10407 y *E. coli* enteropatógena (EPEC) en cultivos de células Caco-2 (130). En nuestra red, no observamos una clara exclusión de *L. acidophilus* con *E. coli*. Estudios *in vitro* son necesarios para comprobar si existe una relación de exclusión entre ambas especies aisladas de pacientes con EII.

En relación a EII-2, caracterizado por contener únicamente muestras de individuos españoles con EII, el OPU-28 afiliado a *C. necator*/*R. pickettii* fue el más abundante. *R. pickettii* ha sido reportada en infecciones en humanos, cuyo origen fueron suministros de agua contaminada con esta bacteria (131), recurso del cual también ha sido aislada en sistemas de abastecimientos de hospitales (132) y agua embotellada (133). En este sentido, nuestro trabajo sería el primer reporte donde se relaciona a *R. pickettii* con individuos con EII.

Con respecto a EII-5, el OPU más abundante fue el asociado a *K. oxytoca* (OPU-8), patobionte intestinal causante de colitis hemorrágica asociada al consumo de antibióticos y cuya

presencia en sujetos saludables ha sido reportada en bajas proporciones (134). Zollner-Schwetz y colaboradores (135) mostraron que en un universo de 150 individuos con EC, la prevalencia de esta bacteria fue del 5,5% mientras que en 85 pacientes reclutados con CU, la prevalencia fue del 3,5%. De igual forma, se observó que la producción de la citotoxina Tivalline ha sido asociada como parte del mecanismo por el cual *K. oxytoca* altera la barrera epitelial induciendo colitis (136). Los mismos autores, también describieron que sólo 2 de las 11 cepas aisladas de *K. oxytoca* fueron positivas para la producción de Tivalline y uno de estos aislados se encontró en un paciente con EC en estado de remisión mientras que el otro aislado estaba presente en un paciente con CU activa. También dentro de este grupo destacamos al OPU-336 afiliado a *E. faecalis/V. fluvialis*, el cual estuvo ausente en todas las muestras CTL de EII-4 con excepción de la muestra del individuo 81CTL_CH (Materia suplementario, Tabla 2). *E. faecalis* ha sido frecuentemente aislada desde heces de pacientes con EII (137). Entre los factores de virulencia de las cepas de *E. faecalis* se encuentra el gen *gelE* (138), que codifica por una metaloproteínasa dependiente de zinc capaz de hidrolizar gelatina, colágeno, caseína, hemoglobina y endotelina humana. Estudios en ratones deficientes en el gen que codifica para IL-10, mostraron que la proteína GelE, producida por cepas comensales de *E. faecalis*, contribuye al desarrollo de inflamación intestinal crónica en ratones, dañando las uniones estrechas de las células epiteliales y alterando la mucosa (139). Sumado a estos antecedentes, en nuestra red observamos que todas las especies indicadoras de EII-5 poseen correlaciones negativas con las especies indicadoras de EII-4, siendo la más importante *F. prautnizii* (OPU-290), bacteria reconocida como indicadora de individuos sanos. Estos datos apoyarían nuestro supuesto de que los individuos del grupo EII-5 son los que poseen una disbiosis más exacerbada.

Nuestros resultados también muestran de manera transversal a todos los grupos, la presencia de *Escherichia coli* (OPU-01). Estudios recientes han mostrado que las cepas *E. coli*

aisladas de pacientes con EC, poseen propiedades de adherencia e invasión asociadas al patotipo enteropatogénico denominado *E. coli* adherente invasiva (ECAI) (60, 61). Entre los factores de virulencia de estas cepas se destacan la presencia de los genes *chuA* y *airp2* involucrados en el transporte de hierro, siendo *chuA* un marcador genético relevante en cepas de *E. coli* asociadas a EC (140).

Un aspecto muy interesante asociado con la disbiosis observada en individuos con EII, es el desequilibrio característico entre anaerobios obligados y facultativos, donde el oxígeno y las especies reactivas de oxígeno jugarían un papel clave. Es sabido que en condiciones de homeostasis, predominan las bacterias anaeróbicas obligadas tales como *F. prausnitzii*, las cuales convierten la fibra dietética en productos de fermentación, incluyendo los ácidos de cadena corta como el butirato, propionato y acetato (141). El receptor activado por proliferadores de peroxisoma gamma (PPAR- γ), ubicado en el núcleo de células del colon diferenciadas, es activado por el butirato, lo que conduce al metabolismo de los ácidos grasos de cadena larga y corta a través de la β -oxidación mitocondrial, y el consumo de oxígeno a través de la fosforilación oxidativa (141, 142). Este tipo de metabolismo por parte de los colonocitos se caracteriza por un alto consumo de oxígeno, lo que da como resultado una presión parcial de oxígeno de menos de 7,6 mmHg (<1% de oxígeno), una condición conocida como hipoxia epitelial, contribuyendo así a un ambiente beneficioso para las bacterias anaerobias obligadas (142) (Figura 12A). En este sentido, la “hipótesis del oxígeno” plantea que la inflamación crónica de las paredes intestinales en individuos con EII, conduce a una mayor liberación de hemoglobina (que lleva oxígeno), y especies reactivas de oxígeno a la luz intestinal (73, 143). Este escenario, a su vez crea un microambiente que favorecería el crecimiento de anaerobios facultativos como *E.coli*, resultando en una disminución de anaerobios estrictos como *F. prausnitzii* (72, 73). Profundizando en este punto, también se postula que en condiciones de

inflamación, las señales pro-inflamatorias estimulan una polarización metabólica de los colonocitos hacia una glucólisis anaeróbica, la cual está acompañada por una elevada síntesis de iNOS y de una mayor producción de óxido nítrico. De esta forma, en la luz intestinal, el óxido nítrico es convertido en nitrato, el cual puede ser utilizado como aceptor de electrones por bacterias anaeróbicas facultativas, como *E. coli*, contribuyendo así a la disbiosis intestinal(142)(Figura 12B). Consistente con lo expuesto anteriormente, nuestra red reveló que los individuos con EII pertenecientes a los grupos EII-5, EII-2 y EII-3 presentaron una disminución en la abundancia de los OPUs asociados a bacterias anaeróbicas obligadas como *F. prausnitzii* y *B.luti*, indicadores de EII-4 (correlaciones negativas), respecto de los OPUs dominantes en estos grupos que correspondieron a bacterias anaerobias facultativas como *E.coli/S.dysenteriae*, *C. necator/R. pickettii*, *M. morgani*, *K. Oxytoca* y OPUs asociados a bacterias aerobias tales como *M. plurifarum*, *R. borbori/R. larrymoorei/R. Pusense/R. leguminosarum/R.tibeticum/R.tuboense*. En este sentido, considerando los resultados reportados por Mariana X. Byndloss y colaboradores(141), sugerimos que al disminuir las especies productoras de butirato, dominantes de EII-4 y por ende el butirato en el intestino, la vía de señalización inducida por PPAR-y es reducida, cambiando el metabolismo de los colonocitos hacia una glucólisis anaeróbica la cual no consume oxígeno, permitiendo que este difunda hacia el epitelio y favorezca el crecimiento de las especies aerobias facultativas indicadoras de los grupos EII-5, EII-2 y EII-3(142).

Estudios previos de Sansonetti y colaboradores (17, 144) demostraron la presencia del genero bacteriano aerobio *Acinetobacter* en la cripta colónica de ratón, hallazgo concordante con trabajos recientes que muestran la presencia de oxígeno en la superficie apical de las células intestinales y que coincide con el OPU-26 afiliado a las bacterias aerobias *Acinetobacter baylyi/A.gernerii A. lwoffii/A. schindleri/A. townneri/ A. ursingii* encontrado principalmente en

individuos con EII (Material suplementario Tabla 1 y 2). La presencia de bacterias aerobias en las criptas reflejaría un potencial proceso coevolutivo en condiciones selectivas (17, 144). Nuestros resultados reflejan que el grupo EII-4 presentan una reducida abundancia de OPUs afiliados a aerobios estrictos como *R. borbori/R. larrymoorei/R. pusense*, los cuales posiblemente podrían encontrarse en las criptas del colon humano. Debido a lo anterior, sugerimos que la inflamación de los individuos agrupados en EII-1, EII-2, EII-3 y EII-5 induciría un incremento en los niveles de oxígeno intestinal, y como consecuencia condicionaría un nicho para el enriquecimiento de los microorganismos anaerobios facultativos y aerobios como *R. borbori/R. larrymoorei/R. pusense* en estos grupos, excluyendo así microorganismos anaerobios estrictos indicativos de EII-4. La reprogramación metabólica de colonocitos para restaurar la hipoxia epitelial o bien la restauración de especies productoras de butirato en pacientes con EII, podría ser presentado como un nuevo enfoque terapéutico en estos pacientes.

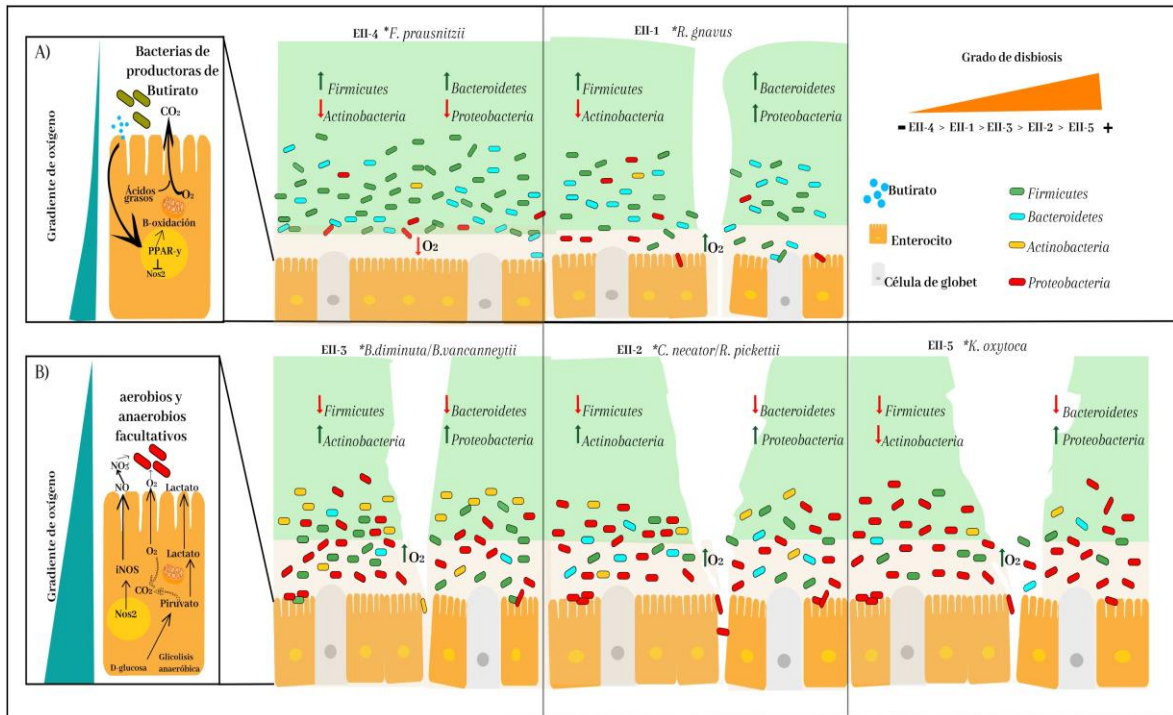


Figura 14. Esquema de disbiosis intestinal de acuerdo a cada uno de los grupos establecidos. El grupo EII-4, en el cual se encuentran todos los individuos control, presenta una abundancia de OPUs afiliados a bacterias anaerobias estrictas pertenecientes a las phyla *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, siendo dominante el OPU indicador asociado a *F. prausnitzii*, una de las bacterias relevantes asociadas a la producción de butirato. Como se ejemplifica en **A**), el butirato producido por estas bacterias induce al receptor nuclear PPAR-γ activando así el metabolismo de los ácidos grasos de cadena larga y corta, conduciendo al consumo de oxígeno a través de la fosforilación oxidativa y a una disminución de la oxigenación epitelial. De acuerdo a su composición microbiana, en un orden creciente en el grado de disbiosis los grupos se ordenan en EII-1, EII-3, EII-2 y EII-5. A diferencia del grupo EII-1, el cual presentan una microbiota similar a EII-4, los grupos EII-3, EII-2 y EII-5 se encuentran caracterizados por una abundancia de los OPUs afiliados a bacterias anaerobias facultativas y aerobias como *B. diminuta*/*B. vancouverii*, *C. necator*/*R. Pickettii* y *K. Oxytoca* pertenecientes al phylum *Proteobacterias*, y de una disminución de anaerobios estrictos pertenecientes al phylum *Firmicutes* como *F. prausnitzii*. Como se ejemplifica en **B**), en estos grupos las señales proinflamatorias estimulan la polarización de los colonocitos hacia una glicólisis anaeróbica lo que incrementa la oxigenación epitelial. El lactato producido durante la glicólisis se libera a la luz intestinal, mientras que el NO producido por iNOS es convertido en NO₃⁻, el cual es utilizado como aceptor de electrones por bacterias anaerobias facultativas. *Se enmarcar las bacterias indicadoras de cada uno de los grupos.

5. CONCLUSIONES

La hipótesis “El aumento de la población de *Proteobacteria* observado en la mucosa intestinal en los pacientes con EC con respecto a pacientes CU, se asocia con la disminución en la expresión de PAMS CAMP y hBD-2” no puede ser aceptada ni rechazada debido al bajo número de muestras donde fue posible analizar los niveles de expresión de los PAMs CAMP y hBD-2, impidiendo con ello mostrar nivel significancia en los estudios de correlación con respecto a los phylum bacterianos identificados.

A diferencia de estudios previos, en donde la microbiota de pacientes con EC y CU se comportan como clusters únicos y definidos, en nuestro estudio los individuos con EII pueden ser clasificados en 5 grupos distintos según su composición microbiológica, pero estos no se distinguen entre pacientes con EC y CU.

Las bacterias asociadas a la mucosa intestinal son representativas del microbioma endógeno, el cual coevoluciona con las condiciones de salud huésped, ya que interactuarían directamente con las células del hospedero. Considerando que estas interacciones pudiesen ser de carácter regional al interior del epitelio intestinal, claramente los estudios de microbiota asociados a biopsias tienen ventajas comparativas respecto de aquellos derivados de heces, esto hace muy importante el presente estudio. Entonces, si consideramos que las muestras de heces reflejan procesos fisiológicos de un entorno luminal muy distinto a los producidos en la mucosa intestinal, esto pudiese explicar que nuestros resultados difieran de los estudios obtenidos desde

muestras de heces, en donde se observa una mayor abundancia de *Proteobacterias* en individuos con EC con respecto a aquellos con CU.

El enriquecimiento en bacterias específicas, como *R.gnavus*, *C.necator/R. pickettii*, *B. diminuta/B. vancouveriensis* y *K. oxytoca* son indicativos de los diferentes grupos con EII, mientras que el aumento en las OPU's afiliados a *F. prausnitzii*, *E. rectale* y *B. dorei/B. vulgatus* es característico de individuos CTL.

Las correlaciones negativas dadas entre las bacterias indicadoras de individuos con EII (aerobias o anaerobias facultativas) y aquellas indicadoras de CTL (principalmente anaerobias estrictas), da cuenta de relaciones de competencia (exclusión) entre estas bacterias, lo que podría estar dado por las condiciones ambientales del intestino, es decir un incremento en los niveles de oxígeno durante el proceso inflamatorio.

Los antecedentes aquí expuestos son un aporte al conocimiento de la estructura de la microbiota de individuos sanos comparados con aquellos con EII lo cual pudiese ser utilizado con fines terapéuticos. Además demuestran que los cambios en la microbiota de CTL vs EII es algo que se da de forma gradual y no como grupos completamente distintos, especialmente en estadios tempranos de la enfermedad

6. REFERENCIAS

1. L. V. Hooper, D. R. Littman, A. J. Macpherson, Interactions between the microbiota and the immune system. *Science* **336**, 1268-1273 (2012); published online EpubJun 8 (10.1126/science.1223490).
2. S. Maccaferri, E. Biagi, P. Brigidi, Metagenomics: key to human gut microbiota. *Digestive diseases* **29**, 525-530 (2011)10.1159/000332966).
3. M. H. Fraher, P. W. O'Toole, E. M. Quigley, Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* **9**, 312-322 (2012); published online EpubMar 27 (10.1038/nrgastro.2012.44).
4. R. Rossello-Mora, R. Amann, Past and future species definitions for Bacteria and Archaea. *Systematic and applied microbiology* **38**, 209-216 (2015); published online EpubJun (10.1016/j.syapm.2015.02.001).
5. R. Rossello-Mora, R. Amann, The species concept for prokaryotes. *FEMS microbiology reviews* **25**, 39-67 (2001); published online EpubJan (
6. P. Yarza, P. Yilmaz, E. Pruesse, F. O. Glockner, W. Ludwig, K. H. Schleifer, W. B. Whitman, J. Euzéby, R. Amann, R. Rossello-Mora, Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature reviews. Microbiology* **12**, 635-645 (2014); published online EpubSep (10.1038/nrmicro3330).
7. Z. Liu, C. Lozupone, M. Hamady, F. D. Bushman, R. Knight, Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic acids research* **35**, e120 (2007)10.1093/nar/gkm541).
8. S. M. Huse, L. Dethlefsen, J. A. Huber, D. Mark Welch, D. A. Relman, M. L. Sogin, Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing. *PLoS genetics* **4**, e1000255 (2008); published online EpubNov (10.1371/journal.pgen.1000255).
9. Q. Wang, G. M. Garrity, J. M. Tiedje, J. R. Cole, Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and environmental microbiology* **73**, 5261-5267 (2007); published online EpubAug (10.1128/AEM.00062-07).
10. N. P. Nguyen, T. Warnow, M. Pop, B. White, A perspective on 16S rRNA operational taxonomic unit clustering using sequence similarity. *NPJ biofilms and microbiomes* **2**, 16004 (2016)10.1038/npjbiofilms.2016.4).
11. X. C. Morgan, C. Huttenhower, Chapter 12: Human microbiome analysis. *PLoS computational biology* **8**, e1002808 (2012)10.1371/journal.pcbi.1002808).
12. W. Ludwig, O. Strunk, R. Westram, L. Richter, H. Meier, Yadhukumar, A. Buchner, T. Lai, S. Steppi, G. Jobb, W. Forster, I. Brettske, S. Gerber, A. W. Ginhart, O. Gross, S. Grumann, S. Hermann, R. Jost, A. König, T. Liss, R. Lussmann, M. May, B. Nonhoff, B. Reichel, R. Strehlow, A. Stamatakis, N. Stuckmann, A. Vilbig, M. Lenke, T. Ludwig, A. Bode, K. H. Schleifer, ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic acids research* **32**, 1363-1371 (2004)10.1093/nar/gkh293).

13. L. Franca, A. Lopez-Lopez, R. Rossello-Mora, M. S. da Costa, Microbial diversity and dynamics of a groundwater and a still bottled natural mineral water. *Environmental microbiology* **17**, 577-593 (2015); published online EpubMar (10.1111/1462-2920.12430).
14. E. G. Zoetendal, A. von Wright, T. Vilpponen-Salmela, K. Ben-Amor, A. D. Akkermans, W. M. de Vos, Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Applied and environmental microbiology* **68**, 3401-3407 (2002); published online EpubJul (
15. P. B. Eckburg, E. M. Bik, C. N. Bernstein, E. Purdom, L. Dethlefsen, M. Sargent, S. R. Gill, K. E. Nelson, D. A. Relman, Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* **308**, 1635-1638 (2005); published online EpubJun 10 (10.1126/science.1110591).
16. A. Durban, J. J. Abellan, N. Jimenez-Hernandez, M. Ponce, J. Ponce, T. Sala, G. D'Auria, A. Latorre, A. Moya, Assessing gut microbial diversity from feces and rectal mucosa. *Microbial ecology* **61**, 123-133 (2011); published online EpubJan (10.1007/s00248-010-9738-y).
17. M. S. Tang, J. Poles, J. M. Leung, M. J. Wolff, M. Davenport, S. C. Lee, Y. A. Lim, K. H. Chua, P. Loke, I. Cho, Inferred metagenomic comparison of mucosal and fecal microbiota from individuals undergoing routine screening colonoscopy reveals similar differences observed during active inflammation. *Gut microbes* **6**, 48-56 (2015)10.1080/19490976.2014.1000080).
18. F. Araujo-Perez, A. N. McCoy, C. Okechukwu, I. M. Carroll, K. M. Smith, K. Jeremiah, R. S. Sandler, G. N. Asher, T. O. Keku, Differences in microbial signatures between rectal mucosal biopsies and rectal swabs. *Gut microbes* **3**, 530-535 (2012); published online EpubNov-Dec (10.4161/gmic.22157).
19. M. R. Ingala, N. B. Simmons, C. Wulsch, K. Krampis, K. A. Speer, S. L. Perkins, Comparing Microbiome Sampling Methods in a Wild Mammal: Fecal and Intestinal Samples Record Different Signals of Host Ecology, Evolution. *Frontiers in microbiology* **9**, 803 (2018)10.3389/fmicb.2018.00803).
20. J. Tap, M. Derrien, H. Tornblom, R. Brazeilles, S. Cools-Portier, J. Dore, S. Storsrud, B. Le Neve, L. Ohman, M. Simren, Identification of an Intestinal Microbiota Signature Associated With Severity of Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology* **152**, 111-123 e118 (2017); published online EpubJan (10.1053/j.gastro.2016.09.049).
21. T. Yatsunenko, F. E. Rey, M. J. Manary, I. Trehan, M. G. Dominguez-Bello, M. Contreras, M. Magris, G. Hidalgo, R. N. Baldassano, A. P. Anokhin, A. C. Heath, B. Warner, J. Reeder, J. Kuczynski, J. G. Caporaso, C. A. Lozupone, C. Lauber, J. C. Clemente, D. Knights, R. Knight, J. I. Gordon, Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* **486**, 222-227 (2012); published online EpubMay 9 (10.1038/nature11053).
22. M. Fallani, D. Young, J. Scott, E. Norin, S. Amarri, R. Adam, M. Aguilera, S. Khanna, A. Gil, C. A. Edwards, J. Dore, I. T. Other Members of the, Intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe: geographic influence beyond delivery mode, breast-feeding, and antibiotics. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **51**, 77-84 (2010); published online EpubJul (10.1097/MPG.0b013e3181d1b11e).
23. M. Arumugam, J. Raes, E. Pelletier, D. Le Paslier, T. Yamada, D. R. Mende, G. R. Fernandes, J. Tap, T. Bruls, J. M. Batto, M. Bertalan, N. Borrueal, F. Casellas, L. Fernandez, L. Gautier, T. Hansen, M. Hattori, T. Hayashi, M. Kleerebezem, K. Kurokawa, M. Leclerc, F. Levenez, C. Manichanh, H. B. Nielsen, T. Nielsen, N. Pons, J.

- Poulain, J. Qin, T. Sicheritz-Ponten, S. Tims, D. Torrents, E. Ugarte, E. G. Zoetendal, J. Wang, F. Guarner, O. Pedersen, W. M. de Vos, S. Brunak, J. Dore, H. I. T. C. Meta, M. Antolin, F. Artiguenave, H. M. Blottiere, M. Almeida, C. Brechot, C. Cara, C. Chervaux, A. Cultrone, C. Delorme, G. Denariáz, R. Dervyn, K. U. Foerstner, C. Friss, M. van de Guchte, E. Guedon, F. Haimet, W. Huber, J. van Hylckama-Vlieg, A. Jamet, C. Juste, G. Kaci, J. Knol, O. Lakhdari, S. Layec, K. Le Roux, E. Maguin, A. Merieux, R. Melo Minardi, C. M'Rini, J. Muller, R. Oozeer, J. Parkhill, P. Renault, M. Rescigno, N. Sanchez, S. Sunagawa, A. Torrejon, K. Turner, G. Vandemeulebrouck, E. Varela, Y. Winogradsky, G. Zeller, J. Weissenbach, S. D. Ehrlich, P. Bork, Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **473**, 174-180 (2011); published online EpubMay 12 (10.1038/nature09944).
24. M. J. Gosalbes, A. Durban, M. Pignatelli, J. J. Abellan, N. Jimenez-Hernandez, A. E. Perez-Cobas, A. Latorre, A. Moya, Metatranscriptomic approach to analyze the functional human gut microbiota. *PLoS one* **6**, e17447 (2011); published online EpubMar 8 (10.1371/journal.pone.0017447).
 25. L. A. David, C. F. Maurice, R. N. Carmody, D. B. Gootenberg, J. E. Button, B. E. Wolfe, A. V. Ling, A. S. Devlin, Y. Varma, M. A. Fischbach, S. B. Biddinger, R. J. Dutton, P. J. Turnbaugh, Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* **505**, 559-563 (2014); published online EpubJan 23 (10.1038/nature12820).
 26. M. Aguilera, M. Cerda-Cuellar, V. Martinez, Antibiotic-induced dysbiosis alters host-bacterial interactions and leads to colonic sensory and motor changes in mice. *Gut microbes* **6**, 10-23 (2015)10.4161/19490976.2014.990790).
 27. M. Serino, V. Blasco-Baque, S. Nicolas, R. Burcelin, Far from the eyes, close to the heart: dysbiosis of gut microbiota and cardiovascular consequences. *Current cardiology reports* **16**, 540 (2014); published online EpubNov (10.1007/s11886-014-0540-1).
 28. M. D. Schulz, C. Atay, J. Heringer, F. K. Romrig, S. Schwitalla, B. Aydin, P. K. Ziegler, J. Varga, W. Reindl, C. Pommerenke, G. Salinas-Riester, A. Bock, C. Alpert, M. Blaut, S. C. Polson, L. Brandl, T. Kirchner, F. R. Greten, S. W. Polson, M. C. Arkan, High-fat-diet-mediated dysbiosis promotes intestinal carcinogenesis independently of obesity. *Nature* **514**, 508-512 (2014); published online EpubOct 23 (10.1038/nature13398).
 29. K. H. Allin, T. Nielsen, O. Pedersen, Mechanisms in endocrinology: Gut microbiota in patients with type 2 diabetes mellitus. *European journal of endocrinology* **172**, R167-177 (2015); published online EpubApr (10.1530/EJE-14-0874).
 30. Y. Yang, C. Jobin, Microbial imbalance and intestinal pathologies: connections and contributions. *Disease models & mechanisms* **7**, 1131-1142 (2014); published online EpubOct (10.1242/dmm.016428).
 31. J. Li, J. Butcher, D. Mack, A. Stintzi, Functional impacts of the intestinal microbiome in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases* **21**, 139-153 (2015); published online EpubJan (10.1097/MIB.0000000000000215).
 32. M. C. Veidenheimer, Clinical differentiation between Crohn's disease of the colon and chronic ulcerative colitis. *Proceedings of the Royal Society of Medicine* **65**, 972-973 (1972); published online EpubNov (
 33. S. C. Ng, H. Y. Shi, N. Hamidi, F. E. Underwood, W. Tang, E. I. Benchimol, R. Panaccione, S. Ghosh, J. C. Y. Wu, F. K. L. Chan, J. J. Y. Sung, G. G. Kaplan, Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet* **390**, 2769-2778 (2018); published online EpubDec 23 (10.1016/S0140-6736(17)32448-0).

34. C. C. Figueroa, P. R. Quera, E. J. Valenzuela, B. C. Jensen, [Inflammatory bowel disease: experience of two Chilean centers]. *Revista medica de Chile* **133**, 1295-1304 (2005); published online EpubNov (/S0034-98872005001100004).
35. D. Simian, C. Estay, J. Lubascher, R. Acuna, U. Kronberg, C. Figueroa, J. Brahm, G. Silva, F. Lopez-Kostner, C. Wainstein, A. Larach, J. Larach, R. Quera, [Inflammatory bowel disease. Experience in 316 patients]. *Revista medica de Chile* **142**, 1006-1013 (2014); published online EpubAug (10.4067/S0034-98872014000800008).
36. C. Zallot, L. Peyrin-Biroulet, Deep remission in inflammatory bowel disease: looking beyond symptoms. *Current gastroenterology reports* **15**, 315 (2013); published online EpubMar (10.1007/s11894-013-0315-7).
37. J. Satsangi, M. S. Silverberg, S. Vermeire, J. F. Colombel, The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* **55**, 749-753 (2006); published online EpubJun (10.1136/gut.2005.082909).
38. R. B. Sartor, Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nature clinical practice. Gastroenterology & hepatology* **3**, 390-407 (2006); published online EpubJul (10.1038/ncpgasthep0528).
39. S. Ondategui-Parra, Enfermedad Inflamatoria Intestinal: situación actual y retos asistenciales. *Ernst & Young, S.L.*, 1-54 (2016).
40. Q. P. Palma CR, Enfermedad inflamatoria intestinal: Colitis ulcerosa y Enfermedad de Crohn Parte 2: Tratamiento. *Revista médica Clínica las Condes* **4**, 343-351 (2004).
41. J. Karczewski, B. Poniedzialek, P. Rzymiski, A. Rychlewska-Hanczewska, Z. Adamski, K. Wiktorowicz, The effect of cigarette smoking on the clinical course of inflammatory bowel disease. *Przegląd gastroenterologiczny* **9**, 153-159 (2014)10.5114/pg.2014.43577).
42. T. D. Martin, S. S. Chan, A. R. Hart, Environmental factors in the relapse and recurrence of inflammatory bowel disease: a review of the literature. *Digestive diseases and sciences* **60**, 1396-1405 (2015); published online EpubMay (10.1007/s10620-014-3437-3).
43. A. Kaser, S. Zeissig, R. S. Blumberg, Inflammatory bowel disease. *Annual review of immunology* **28**, 573-621 (2010)10.1146/annurev-immunol-030409-101225).
44. J. H. Cho, C. Abraham, Inflammatory bowel disease genetics: Nod2. *Annual review of medicine* **58**, 401-416 (2007)10.1146/annurev.med.58.061705.145024).
45. S. A. McCarroll, A. Huett, P. Kuballa, S. D. Chileski, A. Landry, P. Goyette, M. C. Zody, J. L. Hall, S. R. Brant, J. H. Cho, R. H. Duerr, M. S. Silverberg, K. D. Taylor, J. D. Rioux, D. Altshuler, M. J. Daly, R. J. Xavier, Deletion polymorphism upstream of IRGM associated with altered IRGM expression and Crohn's disease. *Nature genetics* **40**, 1107-1112 (2008); published online EpubSep (10.1038/ng.215).
46. M. Parkes, J. C. Barrett, N. J. Prescott, M. Tremelling, C. A. Anderson, S. A. Fisher, R. G. Roberts, E. R. Nimmo, F. R. Cummings, D. Soars, H. Drummond, C. W. Lees, S. A. Khawaja, R. Bagnall, D. A. Burke, C. E. Todhunter, T. Ahmad, C. M. Onnie, W. McArdle, D. Strachan, G. Bethel, C. Bryan, C. M. Lewis, P. Deloukas, A. Forbes, J. Sanderson, D. P. Jewell, J. Satsangi, J. C. Mansfield, C. Wellcome Trust Case Control, L. Cardon, C. G. Mathew, Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nature genetics* **39**, 830-832 (2007); published online EpubJul (10.1038/ng2061).
47. H. F. Zhang, L. X. Qiu, Y. Chen, W. L. Zhu, C. Mao, L. G. Zhu, M. H. Zheng, Y. Wang, L. Lei, J. Shi, ATG16L1 T300A polymorphism and Crohn's disease susceptibility: evidence from 13,022 cases and 17,532 controls. *Human genetics* **125**, 627-631 (2009); published online EpubJun (10.1007/s00439-009-0660-7).

48. S. A. Fisher, M. Tremelling, C. A. Anderson, R. Gwilliam, S. Bumpstead, N. J. Prescott, E. R. Nimmo, D. Massey, C. Berzuini, C. Johnson, J. C. Barrett, F. R. Cummings, H. Drummond, C. W. Lees, C. M. Onnie, C. E. Hanson, K. Blaszczyk, M. Inouye, P. Ewels, R. Ravindrarajah, A. Keniry, S. Hunt, M. Carter, N. Watkins, W. Ouwehand, C. M. Lewis, L. Cardon, C. Wellcome Trust Case Control, A. Lobo, A. Forbes, J. Sanderson, D. P. Jewell, J. C. Mansfield, P. Deloukas, C. G. Mathew, M. Parkes, J. Satsangi, Genetic determinants of ulcerative colitis include the ECM1 locus and five loci implicated in Crohn's disease. *Nature genetics* **40**, 710-712 (2008); published online EpubJun (10.1038/ng.145).
49. S. J. Brown, L. Mayer, The immune response in inflammatory bowel disease. *The American journal of gastroenterology* **102**, 2058-2069 (2007); published online EpubSep (10.1111/j.1572-0241.2007.01343.x).
50. M. F. Neurath, Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nature reviews. Immunology* **14**, 329-342 (2014); published online EpubMay (10.1038/nri3661).
51. P. Parronchi, P. Romagnani, F. Annunziato, S. Sampognaro, A. Becchio, L. Giannarini, E. Maggi, C. Pupilli, F. Tonelli, S. Romagnani, Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *The American journal of pathology* **150**, 823-832 (1997); published online EpubMar (
52. J. S. Feng, Z. Yang, Y. Z. Zhu, Z. Liu, C. C. Guo, X. B. Zheng, Serum IL-17 and IL-6 increased accompany with TGF-beta and IL-13 respectively in ulcerative colitis patients. *International journal of clinical and experimental medicine* **7**, 5498-5504 (2014).
53. S. Levenstein, C. Prantera, V. Varvo, M. L. Scribano, A. Andreoli, C. Luzi, M. Arca, E. Berto, G. Milite, A. Marcheggiano, Stress and exacerbation in ulcerative colitis: a prospective study of patients enrolled in remission. *The American journal of gastroenterology* **95**, 1213-1220 (2000); published online EpubMay (10.1111/j.1572-0241.2000.02012.x).
54. B. S. Qiu, B. A. Vallance, P. A. Blennerhassett, S. M. Collins, The role of CD4+ lymphocytes in the susceptibility of mice to stress-induced reactivation of experimental colitis. *Nature medicine* **5**, 1178-1182 (1999); published online EpubOct (10.1038/13503).
55. D. Gevers, S. Kugathasan, L. A. Denson, Y. Vazquez-Baeza, W. Van Treuren, B. Ren, E. Schwager, D. Knights, S. J. Song, M. Yassour, X. C. Morgan, A. D. Kostic, C. Luo, A. Gonzalez, D. McDonald, Y. Haberman, T. Walters, S. Baker, J. Rosh, M. Stephens, M. Heyman, J. Markowitz, R. Baldassano, A. Griffiths, F. Sylvester, D. Mack, S. Kim, W. Crandall, J. Hyams, C. Huttenhower, R. Knight, R. J. Xavier, The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell host & microbe* **15**, 382-392 (2014); published online EpubMar 12 (10.1016/j.chom.2014.02.005).
56. J. Ni, G. D. Wu, L. Albenberg, V. T. Tomov, Gut microbiota and IBD: causation or correlation? *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* **14**, 573-584 (2017); published online EpubOct (10.1038/nrgastro.2017.88).
57. M. Schaubeck, T. Clavel, J. Calasan, I. Lagkouvardos, S. B. Haange, N. Jehmlich, M. Basic, A. Dupont, M. Hornef, M. von Bergen, A. Bleich, D. Haller, Dysbiotic gut microbiota causes transmissible Crohn's disease-like ileitis independent of failure in antimicrobial defence. *Gut* **65**, 225-237 (2016); published online EpubFeb (10.1136/gutjnl-2015-309333).
58. H. Sokol, P. Seksik, J. P. Furet, O. Firmesse, I. Nion-Larmurier, L. Beaugerie, J. Cosnes, G. Corthier, P. Marteau, J. Dore, Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflammatory bowel diseases* **15**, 1183-1189 (2009); published online EpubAug (10.1002/ibd.20903).

59. K. Machiels, M. Joossens, J. Sabino, V. De Preter, I. Arijs, V. Eeckhaut, V. Ballet, K. Claes, F. Van Immerseel, K. Verbeke, M. Ferrante, J. Verhaegen, P. Rutgeerts, S. Vermeire, A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut* **63**, 1275-1283 (2014); published online EpubAug (10.1136/gutjnl-2013-304833).
60. C. L. Small, S. A. Reid-Yu, J. B. McPhee, B. K. Coombes, Persistent infection with Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* leads to chronic inflammation and intestinal fibrosis. *Nature communications* **4**, 1957 (2013)10.1038/ncomms2957).
61. A. Darfeuille-Michaud, J. Boudeau, P. Bulois, C. Neut, A. L. Glasser, N. Barnich, M. A. Bringer, A. Swidsinski, L. Beaugerie, J. F. Colombel, High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* **127**, 412-421 (2004); published online EpubAug (
62. B. P. Willing, J. Dicksved, J. Halfvarson, A. F. Andersson, M. Lucio, Z. Zheng, G. Jarnerot, C. Tysk, J. K. Jansson, L. Engstrand, A pyrosequencing study in twins shows that gastrointestinal microbial profiles vary with inflammatory bowel disease phenotypes. *Gastroenterology* **139**, 1844-1854 e1841 (2010); published online EpubDec (10.1053/j.gastro.2010.08.049).
63. L. Chen, W. Wang, R. Zhou, S. C. Ng, J. Li, M. Huang, F. Zhou, X. Wang, B. Shen, A. K. M, K. Wu, B. Xia, Characteristics of fecal and mucosa-associated microbiota in Chinese patients with inflammatory bowel disease. *Medicine* **93**, e51 (2014); published online EpubAug (10.1097/MD.0000000000000051).
64. R. Vidal, D. Ginard, S. Khorrami, M. Mora-Ruiz, R. Munoz, M. Hermoso, S. Diaz, A. Cifuentes, A. Orfila, R. Rossello-Mora, Crohn associated microbial communities associated to colonic mucosal biopsies in patients of the western Mediterranean. *Systematic and applied microbiology* **38**, 442-452 (2015); published online EpubSep (10.1016/j.syapm.2015.06.008).
65. P. Lepage, R. Hasler, M. E. Spehlmann, A. Rehman, A. Zvirbliene, A. Begun, S. Ott, L. Kupcinskis, J. Dore, A. Raedler, S. Schreiber, Twin study indicates loss of interaction between microbiota and mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* **141**, 227-236 (2011); published online EpubJul (10.1053/j.gastro.2011.04.011).
66. A. Lavelle, G. Lennon, O. O'Sullivan, N. Docherty, A. Balfe, A. Maguire, H. E. Mulcahy, G. Doherty, D. O'Donoghue, J. Hyland, R. P. Ross, J. C. Coffey, K. Sheahan, P. D. Cotter, F. Shanahan, D. C. Winter, P. R. O'Connell, Spatial variation of the colonic microbiota in patients with ulcerative colitis and control volunteers. *Gut* **64**, 1553-1561 (2015); published online EpubOct (10.1136/gutjnl-2014-307873).
67. U. Gophna, K. Sommerfeld, S. Gophna, W. F. Doolittle, S. J. Veldhuyzen van Zanten, Differences between tissue-associated intestinal microfloras of patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Journal of clinical microbiology* **44**, 4136-4141 (2006); published online EpubNov (10.1128/JCM.01004-06).
68. R. Bibiloni, M. Mangold, K. L. Madsen, R. N. Fedorak, G. W. Tannock, The bacteriology of biopsies differs between newly diagnosed, untreated, Crohn's disease and ulcerative colitis patients. *Journal of medical microbiology* **55**, 1141-1149 (2006); published online EpubAug (10.1099/jmm.0.46498-0).
69. S. Fanaro, R. Chierici, P. Guerrini, V. Vigi, Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta paediatrica* **91**, 48-55 (2003); published online EpubSep (

70. C. F. Favier, E. E. Vaughan, W. M. De Vos, A. D. Akkermans, Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Applied and environmental microbiology* **68**, 219-226 (2002); published online EpubJan (
71. C. Palmer, E. M. Bik, D. B. DiGiulio, D. A. Relman, P. O. Brown, Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS biology* **5**, e177 (2007); published online EpubJul (10.1371/journal.pbio.0050177).
72. L. Albenberg, T. V. Esipova, C. P. Judge, K. Bittinger, J. Chen, A. Laughlin, S. Grunberg, R. N. Baldassano, J. D. Lewis, H. Li, S. R. Thom, F. D. Bushman, S. A. Vinogradov, G. D. Wu, Correlation between intraluminal oxygen gradient and radial partitioning of intestinal microbiota. *Gastroenterology* **147**, 1055-1063 e1058 (2014); published online EpubNov (10.1053/j.gastro.2014.07.020).
73. L. Rigottier-Gois, Dysbiosis in inflammatory bowel diseases: the oxygen hypothesis. *The ISME journal* **7**, 1256-1261 (2013); published online EpubJul (10.1038/ismej.2013.80).
74. R. B. Canani, M. D. Costanzo, L. Leone, M. Pedata, R. Meli, A. Calignano, Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. *World journal of gastroenterology* **17**, 1519-1528 (2011); published online EpubMar 28 (10.3748/wjg.v17.i12.1519).
75. M. A. Henson, P. Phalak, Microbiota dysbiosis in inflammatory bowel diseases: in silico investigation of the oxygen hypothesis. *BMC systems biology* **11**, 145 (2017); published online EpubDec 28 (10.1186/s12918-017-0522-1).
76. M. E. Johansson, H. Sjovall, G. C. Hansson, The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* **10**, 352-361 (2013); published online EpubJun (10.1038/nrgastro.2013.35).
77. C. T. Capaldo, D. N. Powell, D. Kalman, Layered defense: how mucus and tight junctions seal the intestinal barrier. *Journal of molecular medicine* **95**, 927-934 (2017); published online EpubSep (10.1007/s00109-017-1557-x).
78. B. L. Kagan, M. E. Selsted, T. Ganz, R. I. Lehrer, Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 210-214 (1990); published online EpubJan (
79. D. A. O'Neil, E. M. Porter, D. Elewaut, G. M. Anderson, L. Eckmann, T. Ganz, M. F. Kagnoff, Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *Journal of immunology* **163**, 6718-6724 (1999); published online EpubDec 15 (
80. U. H. Durr, U. S. Sudheendra, A. Ramamoorthy, LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochimica et biophysica acta* **1758**, 1408-1425 (2006); published online EpubSep (10.1016/j.bbamem.2006.03.030).
81. O. E. Sorensen, P. Follin, A. H. Johnsen, J. Calafat, G. S. Tjabringa, P. S. Hiemstra, N. Borregaard, Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood* **97**, 3951-3959 (2001); published online EpubJun 15 (
82. D. Vandamme, B. Landuyt, W. Luyten, L. Schoofs, A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide. *Cellular immunology* **280**, 22-35 (2012); published online EpubNov (10.1016/j.cellimm.2012.11.009).
83. A. F. Gombart, N. Borregaard, H. P. Koeffler, Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *FASEB journal : official publication of the*

- Federation of American Societies for Experimental Biology* **19**, 1067-1077 (2005); published online EpubJul (10.1096/fj.04-3284com).
84. T. T. Wang, B. Dabbas, D. Laperriere, A. J. Bitton, H. Soualhine, L. E. Tavera-Mendoza, S. Dionne, M. J. Servant, A. Bitton, E. G. Seidman, S. Mader, M. A. Behr, J. H. White, Direct and indirect induction by 1,25-dihydroxyvitamin D3 of the NOD2/CARD15-defensin beta2 innate immune pathway defective in Crohn disease. *The Journal of biological chemistry* **285**, 2227-2231 (2010); published online EpubJan 22 (10.1074/jbc.C109.071225).
 85. O. Hertting, A. Holm, P. Luthje, H. Brauner, R. Dyrdak, A. F. Jonasson, P. Wiklund, M. Chromek, A. Brauner, Vitamin D induction of the human antimicrobial Peptide cathelicidin in the urinary bladder. *PloS one* **5**, e15580 (2010); published online EpubDec 14 (10.1371/journal.pone.0015580).
 86. K. Hase, L. Eckmann, J. D. Leopard, N. Varki, M. F. Kagnoff, Cell differentiation is a key determinant of cathelicidin LL-37/human cationic antimicrobial protein 18 expression by human colon epithelium. *Infection and immunity* **70**, 953-963 (2002); published online EpubFeb (
 87. J. Schaubert, C. Svanholm, S. Termen, K. Iffland, T. Menzel, W. Scheppach, R. Melcher, B. Agerberth, H. Luhrs, G. H. Gudmundsson, Expression of the cathelicidin LL-37 is modulated by short chain fatty acids in colonocytes: relevance of signalling pathways. *Gut* **52**, 735-741 (2003); published online EpubMay (
 88. M. Imura, R. L. Gallo, K. Hase, Y. Miyamoto, L. Eckmann, M. F. Kagnoff, Cathelicidin mediates innate intestinal defense against colonization with epithelial adherent bacterial pathogens. *Journal of immunology* **174**, 4901-4907 (2005); published online EpubApr 15 (
 89. G. Maisetta, G. Batoni, S. Esin, W. Florio, D. Bottai, F. Favilli, M. Campa, In vitro bactericidal activity of human beta-defensin 3 against multidrug-resistant nosocomial strains. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **50**, 806-809 (2006); published online EpubFeb (10.1128/AAC.50.2.806-809.2006).
 90. J. Schaubert, D. Rieger, F. Weiler, J. Wehkamp, M. Eck, K. Fellermann, W. Scheppach, R. L. Gallo, E. F. Stange, Heterogeneous expression of human cathelicidin hCAP18/LL-37 in inflammatory bowel diseases. *European journal of gastroenterology & hepatology* **18**, 615-621 (2006); published online EpubJun (
 91. J. Wehkamp, J. Harder, M. Weichenthal, O. Mueller, K. R. Herrlinger, K. Fellermann, J. M. Schroeder, E. F. Stange, Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflammatory bowel diseases* **9**, 215-223 (2003); published online EpubJul (
 92. M. Zilbauer, A. Jenke, G. Wenzel, J. Postberg, A. Heusch, A. D. Phillips, G. Noble-Jamieson, F. Torrente, C. Salvestrini, R. Heuschkel, S. Wirth, Expression of human beta-defensins in children with chronic inflammatory bowel disease. *PloS one* **5**, e15389 (2010); published online EpubOct 22 (10.1371/journal.pone.0015389).
 93. E. R. Cobo, K. Chadee, Antimicrobial Human beta-Defensins in the Colon and Their Role in Infectious and Non-Infectious Diseases. *Pathogens* **2**, 177-192 (2013); published online EpubMar 19 (10.3390/pathogens2010177).
 94. T. Ganz, Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature reviews. Immunology* **3**, 710-720 (2003); published online EpubSep (10.1038/nri1180).
 95. C. L. Bevins, Innate immune functions of alpha-defensins in the small intestine. *Digestive diseases* **31**, 299-304 (2013)10.1159/000354681).
 96. B. O. Schroeder, Z. Wu, S. Nuding, S. Groscurth, M. Marcinowski, J. Beisner, J. Buchner, M. Schaller, E. F. Stange, J. Wehkamp, Reduction of disulphide bonds

- unmasks potent antimicrobial activity of human beta-defensin 1. *Nature* **469**, 419-423 (2011); published online EpubJan 20 (10.1038/nature09674).
97. M. Pazgier, D. M. Hoover, D. Yang, W. Lu, J. Lubkowski, Human beta-defensins. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **63**, 1294-1313 (2006); published online EpubJun (10.1007/s00018-005-5540-2).
 98. J. Wehkamp, J. Harder, K. Wehkamp, B. Wehkamp-von Meissner, M. Schlee, C. Enders, U. Sonnenborn, S. Nuding, S. Bengmark, K. Fellermann, J. M. Schroder, E. F. Stange, NF-kappaB- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by Escherichia coli Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium. *Infection and immunity* **72**, 5750-5758 (2004); published online EpubOct (10.1128/IAI.72.10.5750-5758.2004).
 99. J. G. Routsias, P. Karagounis, G. Parvulesku, N. J. Legakis, A. Tsakris, In vitro bactericidal activity of human beta-defensin 2 against nosocomial strains. *Peptides* **31**, 1654-1660 (2010); published online EpubSep (10.1016/j.peptides.2010.06.010).
 100. H. Sahly, S. Schubert, J. Harder, P. Rautenberg, U. Ullmann, J. Schroder, R. Podschun, Burkholderia is highly resistant to human Beta-defensin 3. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **47**, 1739-1741 (2003); published online EpubMay (
 101. M. C. Aldhous, C. L. Noble, J. Satsangi, Dysregulation of human beta-defensin-2 protein in inflammatory bowel disease. *PLoS one* **4**, e6285 (2009); published online EpubJul 20 (10.1371/journal.pone.0006285).
 102. N. Yamaguchi, H. Isomoto, H. Mukae, H. Ishimoto, K. Ohnita, S. Shikuwa, Y. Mizuta, M. Nakazato, S. Kohno, Concentrations of alpha- and beta-defensins in plasma of patients with inflammatory bowel disease. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* **58**, 192-197 (2009); published online EpubApr (10.1007/s00011-008-8120-8).
 103. K. Fellermann, D. E. Stange, E. Schaeffeler, H. Schmalzl, J. Wehkamp, C. L. Bevins, W. Reinisch, A. Teml, M. Schwab, P. Lichter, B. Radlwimmer, E. F. Stange, A chromosome 8 gene-cluster polymorphism with low human beta-defensin 2 gene copy number predisposes to Crohn disease of the colon. *American journal of human genetics* **79**, 439-448 (2006); published online EpubSep (10.1086/505915).
 104. R. W. Bentley, J. Pearson, R. B. Geary, M. L. Barclay, C. McKinney, T. R. Merriman, R. L. Roberts, Association of higher DEFB4 genomic copy number with Crohn's disease. *The American journal of gastroenterology* **105**, 354-359 (2010); published online EpubFeb (10.1038/ajg.2009.582).
 105. N. H. Salzman, K. Hung, D. Haribhai, H. Chu, J. Karlsson-Sjoberg, E. Amir, P. Teggatz, M. Barman, M. Hayward, D. Eastwood, M. Stoel, Y. Zhou, E. Sodergren, G. M. Weinstock, C. L. Bevins, C. B. Williams, N. A. Bos, Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nature immunology* **11**, 76-83 (2010); published online EpubJan (10.1038/ni.1825).
 106. T. Kelder, J. H. Stroeve, S. Bijlsma, M. Radonjic, G. Roeselers, Correlation network analysis reveals relationships between diet-induced changes in human gut microbiota and metabolic health. *Nutrition & diabetes* **4**, e122 (2014); published online EpubJun 30 (10.1038/nutd.2014.18).
 107. K. Faust, J. Raes, Microbial interactions: from networks to models. *Nature reviews. Microbiology* **10**, 538-550 (2012); published online EpubJul 16 (10.1038/nrmicro2832).
 108. C. Quast, E. Pruesse, P. Yilmaz, J. Gerken, T. Schweer, P. Yarza, J. Peplies, F. O. Glockner, The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research* **41**, D590-596 (2013); published online EpubJan (10.1093/nar/gks1219).

109. D. O. Andres Baselga, Sebastien Villegier, Julien De Bortoli and Fabien Leprieur betapart: Partitioning Beta Diversity into Turnover and Nestedness Components. R package version 1.5.0. (2018).
110. F. G. B. Jari Oksanen, Michael Friendly, Roeland Kindt, Pierre, D. M. Legendre, Peter R. Minchin, R. B. O'Hara, Gavin L. Simpson, Peter, M. H. H. S. Solymos, Eduard Szoecs and Helene Wagner, vegan: Community Ecology Package. R package version 2.5-1., (2018).
111. M. De Caceres, P. Legendre, Associations between species and groups of sites: indices and statistical inference. *Ecology* **90**, 3566-3574 (2009); published online EpubDec (
112. N. Fischer, E. Sechet, R. Friedman, A. Amiot, I. Sobhani, G. Nigro, P. J. Sansonetti, B. Sperandio, Histone deacetylase inhibition enhances antimicrobial peptide but not inflammatory cytokine expression upon bacterial challenge. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**, E2993-3001 (2016); published online EpubMay 24 (10.1073/pnas.1605997113).
113. A. Fahlgren, S. Hammarstrom, A. Danielsson, M. L. Hammarstrom, beta-Defensin-3 and -4 in intestinal epithelial cells display increased mRNA expression in ulcerative colitis. *Clinical and experimental immunology* **137**, 379-385 (2004); published online EpubAug (10.1111/j.1365-2249.2004.02543.x).
114. C. A. Serrano, A. Villagran, H. Toledo, J. E. Crabtree, P. R. Harris, Iron Deficiency and IL1beta Polymorphisms in Helicobacter pylori-infected Children. *Helicobacter* **21**, 124-130 (2016); published online EpubApr (10.1111/hel.12247).
115. D. Diaz-Jimenez, L. Nunez, M. De la Fuente, K. Dubois-Camacho, H. Sepulveda, M. Montecino, A. Torres-Riquelme, P. Garcia-Gonzalez, J. Chnaiderman, A. Vossenkamper, T. T. MacDonald, D. Simian, M. J. Gonzalez, J. A. Cidlowski, R. Quera, M. A. Hermoso, A functional IL1RL1 variant regulates corticosteroid-induced sST2 expression in ulcerative colitis. *Scientific reports* **7**, 10180 (2017); published online EpubAug 31 (10.1038/s41598-017-10465-0).
116. T. W. a. V. Simko, R package "corrplot": Visualization of a Correlation Matrix (Version 0.84). (2017).
117. S. D. Cho, D. O. Herzig, M. A. Douthit, K. E. Deveney, Treatment strategies and outcomes for rectal villous adenoma from a single-center experience. *Archives of surgery* **143**, 866-870; discussion 871-862 (2008); published online EpubSep (10.1001/archsurg.143.9.866).
118. Y. Lu, J. Chen, J. Zheng, G. Hu, J. Wang, C. Huang, L. Lou, X. Wang, Y. Zeng, Mucosal adherent bacterial dysbiosis in patients with colorectal adenomas. *Scientific reports* **6**, 26337 (2016); published online EpubMay 19 (10.1038/srep26337).
119. F. M. Codoner, A. Ramirez-Bosca, E. Climent, M. Carrion-Gutierrez, M. Guerrero, J. M. Perez-Orquin, J. Horga de la Parte, S. Genoves, D. Ramon, V. Navarro-Lopez, E. Chenoll, Gut microbial composition in patients with psoriasis. *Scientific reports* **8**, 3812 (2018); published online EpubFeb 28 (10.1038/s41598-018-22125-y).
120. C. Menni, M. A. Jackson, T. Pallister, C. J. Steves, T. D. Spector, A. M. Valdes, Gut microbiome diversity and high-fibre intake are related to lower long-term weight gain. *International journal of obesity* **41**, 1099-1105 (2017); published online EpubJul (10.1038/ijo.2017.66).
121. F. Strati, D. Cavalieri, D. Albanese, C. De Felice, C. Donati, J. Hayek, O. Jousson, S. Leoncini, D. Renzi, A. Calabro, C. De Filippo, New evidences on the altered gut microbiota in autism spectrum disorders. *Microbiome* **5**, 24 (2017); published online EpubFeb 22 (10.1186/s40168-017-0242-1).

122. V. Pascal, M. Pozuelo, N. Borruel, F. Casellas, D. Campos, A. Santiago, X. Martinez, E. Varela, G. Sarrabayrouse, K. Machiels, S. Vermeire, H. Sokol, F. Guarner, C. Manichanh, A microbial signature for Crohn's disease. *Gut* **66**, 813-822 (2017); published online EpubMay (10.1136/gutjnl-2016-313235).
123. R. B. Sartor, Gut microbiota: Optimal sampling of the intestinal microbiota for research. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* **12**, 253-254 (2015); published online EpubMay (10.1038/nrgastro.2015.46).
124. P. Louis, H. J. Flint, Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS microbiology letters* **294**, 1-8 (2009); published online EpubMay (10.1111/j.1574-6968.2009.01514.x).
125. C. V. Ferreira-Halder, A. V. S. Faria, S. S. Andrade, Action and function of Faecalibacterium prausnitzii in health and disease. *Best practice & research. Clinical gastroenterology* **31**, 643-648 (2017); published online EpubDec (10.1016/j.bpg.2017.09.011).
126. J. P. Segain, D. Raingeard de la Bletiere, A. Bourreille, V. Leray, N. Gervois, C. Rosales, L. Ferrier, C. Bonnet, H. M. Blottiere, J. P. Galmiche, Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut* **47**, 397-403 (2000); published online EpubSep (
127. J. Halfvarson, C. J. Brislawn, R. Lamendella, Y. Vazquez-Baeza, W. A. Walters, L. M. Bramer, M. D'Amato, F. Bonfiglio, D. McDonald, A. Gonzalez, E. E. McClure, M. F. Dunklebarger, R. Knight, J. K. Jansson, Dynamics of the human gut microbiome in inflammatory bowel disease. *Nature microbiology* **2**, 17004 (2017); published online EpubFeb 13 (10.1038/nmicrobiol.2017.4).
128. C. W. Png, S. K. Linden, K. S. Gilshenan, E. G. Zoetendal, C. S. McSweeney, L. I. Sly, M. A. McGuckin, T. H. Florin, Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria. *The American journal of gastroenterology* **105**, 2420-2428 (2010); published online EpubNov (10.1038/ajg.2010.281).
129. V. Eeckhaut, K. Machiels, C. Perrier, C. Romero, S. Maes, B. Flahou, M. Steppe, F. Haesebrouck, B. Sas, R. Ducatelle, S. Vermeire, F. Van Immerseel, Butyricoccus pullicaecorum in inflammatory bowel disease. *Gut* **62**, 1745-1752 (2013); published online EpubDec (10.1136/gutjnl-2012-303611).
130. M. F. Bernet, D. Brassart, J. R. Neeser, A. L. Servin, Lactobacillus acidophilus LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut* **35**, 483-489 (1994); published online EpubApr (
131. J. Lee, C. S. Lee, K. M. Hugunin, C. J. Maute, R. C. Dysko, Bacteria from drinking water supply and their fate in gastrointestinal tracts of germ-free mice: a phylogenetic comparison study. *Water research* **44**, 5050-5058 (2010); published online EpubSep (10.1016/j.watres.2010.07.027).
132. T. Kendirli, E. Ciftci, E. Ince, S. Incesoy, H. Guriz, A. D. Aysev, E. Tutar, G. Yavuz, U. Dogru, Ralstonia pickettii outbreak associated with contaminated distilled water used for respiratory care in a paediatric intensive care unit. *The Journal of hospital infection* **56**, 77-78 (2004); published online EpubJan (
133. M. F. Falcone-Dias, I. Vaz-Moreira, C. M. Manaia, Bottled mineral water as a potential source of antibiotic resistant bacteria. *Water research* **46**, 3612-3622 (2012); published online EpubJul (10.1016/j.watres.2012.04.007).
134. C. Hogenauer, C. Langner, E. Beubler, I. T. Lippe, R. Schicho, G. Gorkiewicz, R. Krause, N. Gerstgrasser, G. J. Krejs, T. A. Hinterleitner, Klebsiella oxytoca as a causative organism of antibiotic-associated hemorrhagic colitis. *The New England*

- journal of medicine* **355**, 2418-2426 (2006); published online EpubDec 7 (10.1056/NEJMoa054765).
135. I. Zollner-Schwetz, K. A. Herzog, G. Feierl, E. Leitner, G. Schneditz, H. Sprenger, J. Prattes, W. Petritsch, H. Wenzl, P. Kump, G. Gorkiewicz, E. Zechner, C. Hogenauer, The Toxin-Producing Pathobiont *Klebsiella oxytoca* Is Not Associated with Flares of Inflammatory Bowel Diseases. *Digestive diseases and sciences* **60**, 3393-3398 (2015); published online EpubNov (10.1007/s10620-015-3765-y).
 136. G. Schneditz, J. Rentner, S. Roier, J. Pletz, K. A. Herzog, R. Buckner, H. Troeger, S. Schild, H. Weber, R. Breinbauer, G. Gorkiewicz, C. Hogenauer, E. L. Zechner, Enterotoxicity of a nonribosomal peptide causes antibiotic-associated colitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 13181-13186 (2014); published online EpubSep 9 (10.1073/pnas.1403274111).
 137. Y. Zhou, H. Chen, H. He, Y. Du, J. Hu, Y. Li, Y. Li, Y. Zhou, H. Wang, Y. Chen, Y. Nie, Increased *Enterococcus faecalis* infection is associated with clinically active Crohn disease. *Medicine* **95**, e5019 (2016); published online EpubSep (10.1097/MD.0000000000005019).
 138. E. Golinska, A. Tomusiak, T. Gosiewski, G. Wiecek, A. Machul, D. Mikolajczyk, M. Bulanda, P. B. Heczko, M. Strus, Virulence factors of *Enterococcus* strains isolated from patients with inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology* **19**, 3562-3572 (2013); published online EpubJun 21 (10.3748/wjg.v19.i23.3562).
 139. N. Steck, M. Hoffmann, I. G. Sava, S. C. Kim, H. Hahne, S. L. Tonkonogy, K. Mair, D. Krueger, M. Pruteanu, F. Shanahan, R. Vogelmann, M. Schemann, B. Kuster, R. B. Sartor, D. Haller, *Enterococcus faecalis* metalloprotease compromises epithelial barrier and contributes to intestinal inflammation. *Gastroenterology* **141**, 959-971 (2011); published online EpubSep (10.1053/j.gastro.2011.05.035).
 140. S. Cespedes, W. Saitz, F. Del Canto, M. De la Fuente, R. Quera, M. Hermoso, R. Munoz, D. Ginard, S. Khorrami, J. Giron, R. Assar, R. Rossello-Mora, R. M. Vidal, Genetic Diversity and Virulence Determinants of *Escherichia coli* Strains Isolated from Patients with Crohn's Disease in Spain and Chile. *Frontiers in microbiology* **8**, 639 (2017)10.3389/fmicb.2017.00639).
 141. M. X. Byndloss, E. E. Olsan, F. Rivera-Chavez, C. R. Tiffany, S. A. Cevallos, K. L. Lokken, T. P. Torres, A. J. Byndloss, F. Faber, Y. Gao, Y. Litvak, C. A. Lopez, G. Xu, E. Napoli, C. Giulivi, R. M. Tsolis, A. Revzin, C. B. Lebrilla, A. J. Baumler, Microbiota-activated PPAR-gamma signaling inhibits dysbiotic *Enterobacteriaceae* expansion. *Science* **357**, 570-575 (2017); published online EpubAug 11 (10.1126/science.aam9949).
 142. Y. Litvak, M. X. Byndloss, A. J. Baumler, Colonocyte metabolism shapes the gut microbiota. *Science* **362**, (2018); published online EpubNov 30 (10.1126/science.aat9076).
 143. H. Zhu, Y. R. Li, Oxidative stress and redox signaling mechanisms of inflammatory bowel disease: updated experimental and clinical evidence. *Experimental biology and medicine* **237**, 474-480 (2012); published online EpubMay (10.1258/ebm.2011.011358).
 144. T. Pedron, C. Mulet, C. Dauga, L. Frangeul, C. Chervaux, G. Grompone, P. J. Sansonetti, A crypt-specific core microbiota resides in the mouse colon. *mBio* **3**, (2012)10.1128/mBio.00116-12).

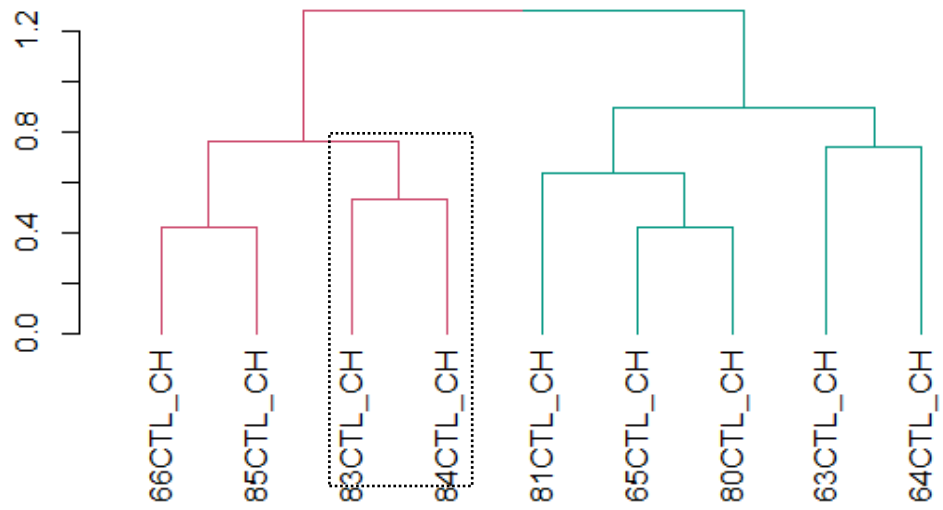
Material suplementario

Figura 1. Dendrograma muestras CTL. Las muestras encerradas en rectángulo representan a aquellas diagnosticadas con adenoma veloso

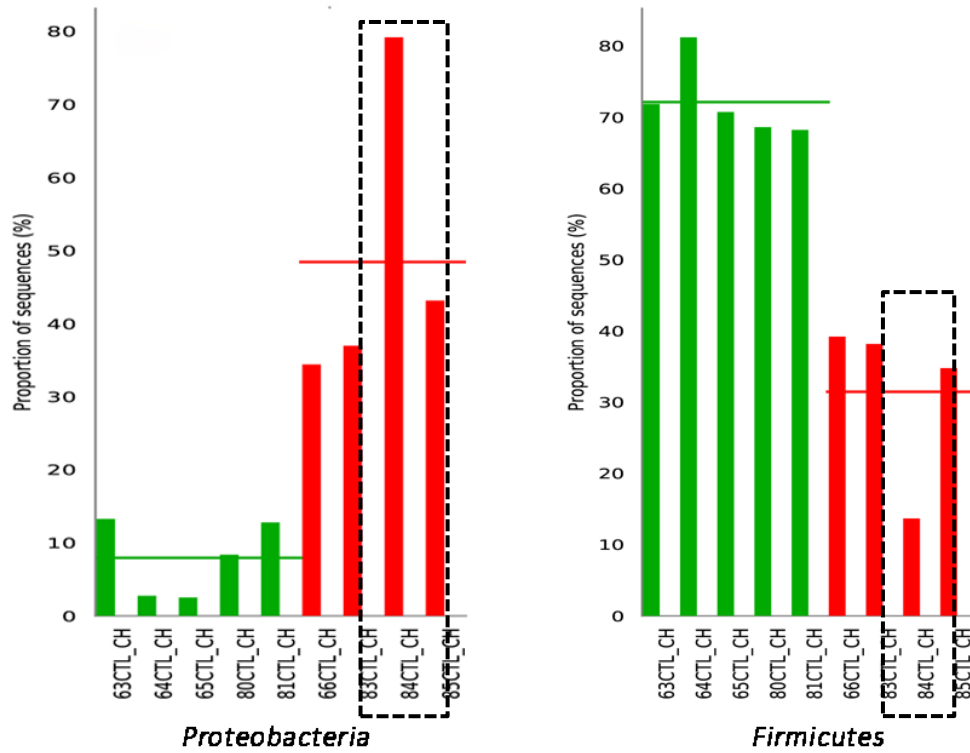


Figura 2. Abundancia relativa por muestras para los phylum *Proteobacteria* y *Firmicutes*. Las muestras encerradas en rectángulo representan a aquellas diagnosticadas con adenoma vellosos

Tabla 1. Lista de OPUs

OPU	Secuencia asociada	Clase	Familia	Phylum
OPU 1	<i>Escherichia coli</i> (X80725/Type sp.) <i>Shigella dysenteriae</i> (X96966/Type sp.)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 2	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i> (AJ251469/Type sp.) <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> (X87276/Type sp.)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 3	<i>Citrobacter amalonaticus</i> (FR870441) <i>Citrobacter farmeri</i> (AF025371)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 4	<i>Klebsiella singaporensis</i> (AF250285)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 5	<i>Enterobacter aerogenes</i> KCTC 2190 (CP002824)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 6	<i>Citrobacter freundii</i> (AB626119)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 7	uncultured bacterium (EU773762)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 8	<i>Klebsiella oxytoca</i> (AF129440)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 9	<i>Kluyvera georgiana</i> (AF047186)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 10	<i>Pseudomonas flectens</i> (AB021400)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 11	uncultured organism (HQ757307)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 12	<i>Morganella morganii</i> subsp. <i>morganii</i> (AJ301681/Type sp.)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 13	<i>Proteus vulgaris</i> (DQ885257/Type sp.)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>

OPU 14	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> (AY362908) <i>Haemophilus sputorum</i> (JF506642)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pasteurellaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 15	<i>Haemophilus paraphrohaemolyticus</i> (M75076)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pasteurellaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 16	<i>Aggregatibacter segnis</i> (M75043)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pasteurellaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 17	<i>Providencia sp.</i> enrichment culture clone SRC_NBB16 (GU374076)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 18	<i>Aeromonas fluvialis</i> (FJ230078)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Aeromonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 19	<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i> (Y17600/Type sp.)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Succinivibrionaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 20	<i>Pseudomonas japonica</i> (AB126621) <i>Pseudomonas monteilii</i> (AF064458) <i>Pseudomonas oryzae</i> <i>oryzae</i> (D84004)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 21	<i>Pseudomonas alcaliphila</i> (AB030583) <i>Pseudomonas stutzeri</i> (AF094748) <i>Pseudomonas xanthomarina</i> (AB176954)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 22	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (X06684/Type sp.) <i>Pseudomonas alcaligenes</i> (D84006)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 23	<i>Pseudomonas halophila</i> (AB021383)	<i>Gammaproteobacteria</i>		<i>Proteobacteria</i>
OPU 24	<i>Marinicella litoralis</i> (AB500095/Type sp.)	<i>Gammaproteobacteria</i>		<i>Proteobacteria</i>

OPU 25	<i>Enhydrobacter aerosaccus</i> (AJ550856/Type sp.)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 26	<i>Acinetobacter baylyi</i> (AF509820) <i>Acinetobacter gernerii</i> (AF509829) <i>Acinetobacter lwoffii</i> (X81665) <i>Acinetobacter schindleri</i> (AJ278311) <i>Acinetobacter towneri</i> (AF509823) <i>Acinetobacter ursingii</i> (AJ275038)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 27	<i>Beggiatoa alba</i> (AF110274/Type sp.)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Thiotrichaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 28	<i>Cupriavidus necator</i> (AF191737/Type sp.) <i>Ralstonia pickettii</i> (AY741342/Type sp.)	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 29	<i>Burkholderia acidopaludis</i> (AB513180) <i>Burkholderia ferrariae</i> (DQ514537) <i>Burkholderia graminis</i> (U96939) <i>Burkholderia heleaia</i> (AB495123) <i>Burkholderia kururiensis</i> (AB024310) <i>Burkholderia phenoliruptrix</i> (AY435213) <i>Burkholderia tuberum</i> (AJ302311)	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 30	<i>Bordetella hinzii</i> (AF177667)	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Alcaligenaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 31	<i>Acidovorax anthurii</i> (AJ007013) <i>Acidovorax facilis</i> (AF078765/Type sp.)	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 32	<i>Xenophilus aerolatus</i> (EF660342) <i>Xylophilus ampelinus</i>	<i>Betaproteobacteria</i>		

	(AJ420330/Type sp.)			
OPU 33	<i>Curvibacter delicatus</i> (AF078756) <i>Curvibacter fontanus</i> (AB120963) <i>Curvibacter gracilis</i> (AB109889/Type sp.)	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 34	<i>Variovorax</i> sp. <i>MLBW2</i> (AB610599)	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 35	<i>Limnohabitans australis</i> (FM178226) <i>Limnohabitans curvus</i> (AJ938026/Type sp.) <i>Limnohabitans parvus</i> (FM165536) <i>Limnohabitans planktonicus</i> (FM165535)	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 36	<i>Ramlibacter henchirensis</i> (AF439400) <i>Ramlibacter tataouinensis</i> (AF144383/Type sp.)	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 37	<i>Ottowia thiooxydans</i> (AJ537466/Type sp.)	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 38	<i>Hydrogenophaga palleronii</i> (AF078769)	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 39	<i>Comamonas composti</i> (EF015884)	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 40	<i>Comamonas denitrificans</i> (AF233877)	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 41	<i>Comamonas kerstersii</i> (AJ430347)	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Comamonadaceae</i>	
OPU 42	<i>Diaphorobacter nitroreducens</i> (AB064317/Type sp.) <i>Diaphorobacter oryzae</i> (EU342381)	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 43	<i>uncultured bacterium</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>

	(AB491412)			
OPU 44	<i>Delftia acidovorans</i> (AB021417/Type sp.) <i>Delftia lacustris</i> (EU888308) <i>Delftia tsuruhatensis</i> (AB075017)	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 45	<i>Pelomonas puraquae</i> (AM501439) <i>Pelomonas saccharophila</i> (AB021407/Type sp.)	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 046-1	<i>Sutterella stercoricanis</i> (AJ566849) <i>Sutterella wadsworthensis</i> (GU585669/Type sp.)	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Sutterellaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 046-2	<i>Sutterella wadsworthensis</i> (HM037997)	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Sutterellaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 046-3		<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Sutterellaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 47	<i>Parasutterella excrementihominis</i> (AB370250/Type sp.)	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Sutterellaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 48	<i>uncultured organism</i> (HQ760564)	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Sutterellaceae</i>	
OPU 49	<i>uncultured bacterium</i> (DQ801351)	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Sutterellaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 50	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (X07714/Type sp.) <i>Neisseria iguanae</i> (GU233442) <i>Neisseria sicca</i> ATCC 29256 (ACKO02000016)	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Neisseriaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 51	<i>Eikenella corrodens</i> (AB525415/Type sp.)	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Neisseriaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 52	<i>Sulfuritalea hydrogenivorans</i> (AB552842/Type sp.)	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Rodocyclaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>

OPU 53	<i>Hydrogenophilus hirschii</i> (FR749905) <i>Hydrogenophilus thermoluteolus</i> (AB009828/Type sp.)	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Hydrogenophilaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 54	<i>Pseudomonas beteli</i> (AB021406) <i>Stenotrophomonas chelatiphaga</i> (EU573216) <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (AB294553/Type sp.) <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> (AJ293463)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 55	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (GU945534)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 56	<i>Thermomonas brevis</i> (AJ519989) <i>Thermomonas fusca</i> (AJ519986) <i>Thermomonas haemolytica</i> (AJ300185/Type sp.) <i>Thermomonas koreensis</i> (DQ154906)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 57	<i>Dyella koreensis</i> (AY884571) <i>Dyella marensis</i> (AM939778)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 58	<i>Dyella ginsengisoli</i> (AB245367) <i>Dyella soli</i> (EU604272)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 59	<i>Dyella thiooxydans</i> (EF397574) <i>Frateuria aurantia</i> (AB091194/Type sp.)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 60	<i>Dyella terrae</i> (EU604273) <i>Fulvimonas soli</i> (AJ311653/Type sp.)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 61	<i>Rhodanobacter thiooxydans</i> (AB286179)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>

OPU 62	<i>Arhodomonas aquaeolei</i> (M26631/Type sp.)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Ectothiorhodospiraceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 63	<i>Ensifer arboris</i> (Z78204)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 64	<i>Rhizobium borbori</i> (EF125187) <i>Rhizobium larrymoorei</i> (Z30542) <i>Rhizobium pusense</i> (FJ969841)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 65	<i>Shinella granuli</i> (AB187585/Type sp.)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 66	<i>Ochrobactrum anthropi</i> (CP000758/Type sp.) <i>Ochrobactrum ciceri</i> (DQ647056) <i>Ochrobactrum pecoris</i> (FR668302)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Brucellaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 67	<i>Mesorhizobium plurifarum</i> (Y14158)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Phyllobacteriaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 68	<i>Mesorhizobium ciceri</i> (U07934) <i>Mesorhizobium loti</i> (X67229/Type sp.)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Phyllobacteriaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 69	<i>Rhizobium leguminosarum</i> (U29386/Type sp.) <i>Rhizobium tibeticum</i> (EU256404) <i>Rhizobium tubonense</i> (EU256434)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 070-2	<i>Agromonas oligotrophica</i> (D78366/Type sp.) <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (U69638/Type sp.)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Bradyrhizobiaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 070-3	<i>Afipia birgiae</i> (AF288304) <i>Afipia broomeae</i> (U87759)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Bradyrhizobiaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 070-4	uncultured <i>Bradyrhizobiaceae</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Bradyrhizobiaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>

	<i>bacterium (AM935305)</i>			
OPU 71	<i>Methylorosula polaris</i> (EU586035/Type sp.) <i>Methylovirgula ligni</i> (FM252034/Type sp.)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Beijerinckiaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 72	<i>Amorphus coralli</i> (DQ097300/Type sp.) <i>Amorphus orientalis</i> (FJ998414)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Unclassified</i> <i>Rhizobiales</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 73	<i>Oceanibaculum indicum</i> (EU656113/Type sp.) <i>Oceanibaculum</i> <i>pacificum (FJ463255)</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodospirillaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 74	<i>Kiloniella laminariae</i> (AM749667/Type sp.)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 75	<i>Sphingomonas</i> <i>aromaticivorans</i> (CP000248) <i>Sphingomonas capsulata</i> (D16147)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 76	<i>Sphingomonas leidyi</i> (AJ227812)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Caulobacteraceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 77	<i>Sphingomonas</i> <i>oligophenolica</i> (AB018439)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 78	<i>Brevundimonas nasdae</i> (AB071954) <i>Brevundimonas</i> <i>vesicularis (AJ227780)</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Caulobacteraceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 79	<i>Brevundimonas diminuta</i> (AB021415/Type sp.) <i>Brevundimonas</i> <i>vancouveritii (AJ227779)</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Caulobacteraceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 80	<i>uncultured bacterium</i> (DQ658781)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Caulobacteraceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 81	<i>uncultured bacterium</i> (DQ490042)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Caulobacteraceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 83	<i>Bosea minatitlanensis</i> (AF273081) <i>Bosea thiooxidans</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Bradyrhizobiaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>

	(AJ250796/Type sp.)			
OPU 84	<i>Acidocella</i> <i>aluminiumdurans</i> (AB362219) <i>Acidocella facilis</i> (D30774/Type sp.)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Acetobacteraceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 85	<i>Reyranella massiliensis</i> (EF394922/Type sp.)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Unclassified</i> <i>Rhodospirillales</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 86	<i>Bacteroides dorei</i> (AB242142) <i>Bacteroides massiliensis</i> (AY126616) <i>Bacteroides sartorii</i> (GQ456204) <i>Bacteroides vulgatus</i> (AJ867050)	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 87	<i>Bacteroides coprocola</i> (AB200224)	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 88	<i>Bacteroides plebeius</i> (AB200217)	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 89	<i>Bacteroides faecis</i> (GQ496624) <i>Bacteroides finegoldii</i> (AB222699) <i>Bacteroides</i> <i>thetaiotaomicron</i> (AE015928)	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 90	<i>Bacteroides ovatus</i> (AB050108) <i>Bacteroides</i> <i>xylanisolvens</i> (AM230650)	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 91	<i>Bacteroides acidifaciens</i> (AB021164) <i>Bacteroides caccae</i> (X83951)	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 92	<i>Bacteroides fragilis</i> (CR626927/Type sp.)	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 93	<i>Bacteroides</i> <i>faecichinchillae</i> (AB574480) <i>Bacteroides nordii</i> (AY608697)	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>

	<i>Bacteroides salyersiae</i> (AY608696)			
OPU 94	<i>Bacteroides cellulosilyticus</i> (AJ583243) <i>Bacteroides intestinalis</i> (AB214328)	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 95	<i>Bacteroides stercoris</i> (X83953)	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 96	<i>Bacteroides clarus</i> (AB490801)	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 97	<i>Bacteroides eggerthii</i> (AB050107)	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 98	<i>Bacteroides fluxus</i> (AB490802) <i>Bacteroides helcogenes</i> (AB200227) <i>Bacteroides rodentium</i> (AB531489) <i>Bacteroides uniformis</i> (AB050110)	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 99	<i>Bacteroides coprophilus</i> (AB260026)	<i>Bacteroidia</i>		
OPU 100	<i>Bacteroides salanitronis</i> (AB253731)	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 101	<i>Paraprevotella clara</i> (AB331896/Type sp.) <i>Paraprevotella xylaniphila</i> (AB331897)	<i>Bacteroidia</i>	<i>Prevotellaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 102	<i>Prevotella copri</i> (AB064923)	<i>Bacteroidia</i>	<i>Prevotellaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 103	<i>Prevotella fusca</i> (FJ545433) <i>Prevotella histicola</i> (EU126661) <i>Prevotella melaninogenica</i> (CP002122/Type sp.) <i>Prevotella scopos</i> (FJ545434) <i>Prevotella veroralis</i> (L16473)	<i>Bacteroidia</i>	<i>Prevotellaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>

OPU 104	<i>Hallella seregens</i> (X81877/Type sp.) <i>Prevotella bergensis</i> (AY350613) <i>Prevotella denticola</i> (AY323524)	<i>Bacteroidia</i>	<i>Prevotellaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 105	<i>Prevotella brevis</i> (AJ011682) <i>Prevotella bryantii</i> (AJ006457)	<i>Bacteroidia</i>	<i>Prevotellaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 106	<i>Prevotella stercorea</i> (AB244774)	<i>Bacteroidia</i>	<i>Prevotellaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 107	<i>Prevotella buccae</i> (L16477)	<i>Bacteroidia</i>	<i>Prevotellaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 108	<i>Prevotella tanneriae</i> (AJ005634)	<i>Bacteroidia</i>	<i>Prevotellaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 109	<i>Parabacteroides</i> <i>distasonis</i> (AB238922/Type sp.)	<i>Bacteroidia</i>	<i>Porphyromonadaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 110	<i>Parabacteroides</i> <i>johnsonii</i> (AB261128) <i>Parabacteroides merdae</i> (AB238928)	<i>Bacteroidia</i>	<i>Porphyromonadaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 111	<i>Barnesiella</i> <i>intestinihominis</i> (AB370251)	<i>Bacteroidia</i>	<i>Porphyromonadaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 112	<i>uncultured bacterium</i> (EU774794)	<i>Bacteroidia</i>	<i>Porphyromonadaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 113	<i>Butyricimonas virosa</i> (AB443949)	<i>Bacteroidia</i>	<i>Porphyromonadaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 114	<i>Odoribacter</i> <i>splanchnicus</i> (L16496/Type sp.)	<i>Bacteroidia</i>	<i>Porphyromonadaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 115	<i>uncultured organism</i> (HQ792271)	<i>Bacteroidia</i>	<i>Porphyromonadaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 116	<i>Alistipes finegoldii</i> (AY643083) <i>Alistipes onderdonkii</i> (AY974071) <i>Alistipes putredinis</i> (L16497/Type sp.)	<i>Bacteroidia</i>	<i>Rikenellaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>

	<i>Alistipes shahii</i> (AY974072)			
OPU 117	<i>Alistipes indistinctus</i> (AB490804)	<i>Bacteroidia</i>	<i>Rikenellaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 118	uncultured bacterium (FJ793177)	<i>Bacteroidia</i>	<i>Rikenellaceae</i>	
OPU 119	<i>Psychroflexus halocasei</i> (FR714910)	<i>Flavobacteria</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 120	<i>Owenweeksia hongkongensis</i> (AB125062/Type sp.)	<i>Flavobacteria</i>	<i>Cryomorphaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 121	<i>Chryseobacterium arthrophaerae</i> (FN398101) <i>Chryseobacterium vietnamense</i> (HM212415)	<i>Flavobacteria</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 122	<i>Cloacibacterium normanense</i> (AJ575430/Type sp.) <i>Cloacibacterium rupense</i> (EU581834)	<i>Flavobacteria</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 123	<i>Chryseobacterium koreense</i> (AF344179)	<i>Flavobacteria</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 124	<i>Elizabethkingia anophelis</i> (EF426425/Type sp.) <i>Elizabethkingia meningoseptica</i> (AJ704540/Type sp.) <i>Elizabethkingia miricola</i> (AB071953) <i>Soonwooa buanensis</i> (FJ713810/Type sp.)	<i>Flavobacteria</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 125	<i>Sediminibacterium salmoneum</i> (EF407879/Type sp.)	<i>Flavobacteria</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 126	<i>Hydrotalea flava</i> (FN665659/Type sp.)	<i>Flavobacteria</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 127	uncultured bacterium (AY820722)	<i>Deltaproteobacteria</i>	Uncultured <i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>

OPU 128	<i>uncultured bacterium</i> (EU803844)	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Uncultured</i> <i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 129	<i>uncultured bacterium</i> (JF800713)	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Uncultured</i> <i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 130	<i>uncultured bacterium</i> (HM126783)	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Uncultured</i> <i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 131	<i>uncultured bacterium</i> (JF833867)	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Uncultured</i> <i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 132	<i>uncultured bacterium</i> (FJ437978)	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Uncultured</i> <i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 133	<i>Elusimicrobium minutum</i> (AM490846/Type sp.)	<i>Elusimicrobia</i>	<i>Elusimicrobiaceae</i>	<i>Elusimicrobia</i>
OPU 134	<i>Schlesneria paludicola</i> (AM162407/Type sp.)	<i>Planctomycetes</i>	<i>Planctomycetaceae</i>	<i>Planctomycetes</i>
OPU 135	<i>uncultured bacterium</i> (GU553741)	<i>ODI</i>	<i>Candidate division</i> <i>ODI</i>	<i>ODI</i>
OPU 136	<i>Victivallis vadensis</i> (AY049713/Type sp.)	<i>Lentisphaeria</i>	<i>Victivallaceae</i>	<i>Lentisphaerae</i>
OPU 137	<i>Clostridium innocuum</i> (M23732)	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 138	<i>Eubacterium dolichum</i> (L34682) <i>Eubacterium tortuosum</i> (L34683)	<i>Clostridia</i>	<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 139	<i>Eubacterium bifforme</i> (M59230)	<i>Clostridia</i>	<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 140	<i>uncultured bacterium</i> (GQ492216)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 141	<i>Holdemania filiformis</i> (Y11466/Type sp.)	<i>Clostridia</i>	<i>Erysipelotrichaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 142	<i>Clostridium ramosum</i> (X73440)	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 143	<i>Clostridium</i> <i>saccharogumia</i> (DQ100445)	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 144	<i>Clostridium spiroforme</i> (X75908)	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Firmicutes</i>

OPU 145	<i>uncultured bacterium</i> (DQ806500)	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 146	<i>Catenibacterium</i> <i>mitsuokai</i> (AB030224/Type sp.)	<i>Clostridia</i>	<i>Erysipelotrichaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 146-2	<i>Catenibacterium</i> <i>mitsuokai</i> (AB030224/Type sp.)	<i>Clostridia</i>	<i>Erysipelotrichaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 147	<i>uncultured bacterium</i> (JF210269)	<i>Fusobacteria</i>	<i>Fusobacteriaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 148	<i>Fusobacterium</i> <i>canifelinum</i> (AY162221) <i>Fusobacterium</i> <i>nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> (AE009951/Type sp.) <i>Fusobacterium</i> <i>nucleatum</i> subsp. <i>polymorphum</i> (AF287812) <i>Fusobacterium</i> <i>nucleatum</i> subsp. <i>vincentii</i> (AABF01000111) <i>Fusobacterium simiae</i> (M58685)	<i>Fusobacteria</i>	<i>Fusobacteriaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 149	<i>uncultured bacterium</i> (EU773871)	<i>Fusobacteria</i>	<i>Fusobacteriaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 150	<i>Fusobacterium</i> <i>nucleatum</i> subsp. <i>animalis</i> (GQ301042)	<i>Fusobacteria</i>		
OPU 151	<i>Fusobacterium</i> <i>periodonticum</i> (X55405)	<i>Fusobacteria</i>	<i>Fusobacteriaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 152	<i>Fusobacterium ulcerans</i> (X55412) <i>Fusobacterium varium</i> (AJ867036)	<i>Fusobacteria</i>	<i>Fusobacteriaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 153	<i>Fusobacterium equinum</i> (AJ295750) <i>Fusobacterium</i> <i>gonidiaformans</i> (X55410) <i>Fusobacterium</i> <i>necrophorum</i> subsp.	<i>Fusobacteria</i>	<i>Fusobacteriaceae</i>	<i>Firmicutes</i>

	<i>funduliforme</i> (AB525413)			
OPU 154	<i>Leptotrichia sp. oral</i> clone IK040 (AY349387)	<i>Fusobacteria</i>	<i>Leptotrichiaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 155	uncultured bacterium (EU773871)	<i>Fusobacteria</i>	<i>Fusobacteriaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 156	<i>Veillonella atypica</i> (AF439641) <i>Veillonella caviae</i> (AY355140) <i>Veillonella denticariosi</i> (EF185167) <i>Veillonella dispar</i> (AF439639) <i>Veillonella montpellierensis</i> (AF473836) <i>Veillonella parvula</i> (AY995767/Type sp.)	<i>Negativicutes</i>	<i>Veillonellaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 157	uncultured bacterium (FJ365765)	<i>Negativicutes</i>	<i>Veillonellaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 158	<i>Megasphaera elsdenii</i> (U95027/Type sp.)	<i>Negativicutes</i>	<i>Veillonellaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 159	<i>Megasphaera micronuciformis</i> (AF473834)	<i>Negativicutes</i>	<i>Veillonellaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 160	<i>Allisonella histaminiformans</i> (AF548373/Type sp.) <i>Dialister pneumosintes</i> (X82500/Type sp.)	<i>Negativicutes</i>	<i>Veillonellaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 161	<i>Dialister invisus</i> (AY162469)	<i>Negativicutes</i>	<i>Veillonellaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 162	<i>Centipeda periodontii</i> (AJ010963/Type sp.) <i>Selenomonas infelix</i> (AF287802) <i>Selenomonas noxia</i> (AF287799)	<i>Negativicutes</i>	<i>Veillonellaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 163	<i>Mitsuokella jalaludinii</i> (AF479674) <i>Mitsuokella multacida</i>	<i>Negativicutes</i>	<i>Veillonellaceae</i>	<i>Firmicutes</i>

	(X81878/Type sp.)			
OPU 164	<i>Megamonas funiformis</i> (AB300988) <i>Megamonas rupellensis</i> (EU346729)	<i>Negativicutes</i>	<i>Veillonellaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 165	<i>Phascolarctobacterium succinatutens</i> (AB490811)	<i>Negativicutes</i>	<i>Acidaminococcaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 166	<i>Phascolarctobacterium faecium</i> (X72865/Type sp.)	<i>Negativicutes</i>	<i>Acidaminococcaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 167	<i>Acidaminococcus fermentans</i> (X78017/Type sp.) <i>Acidaminococcus intestini</i> (AF473835)	<i>Negativicutes</i>	<i>Acidaminococcaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 168	uncultured bacterium (HM277793)	<i>Negativicutes</i>	<i>Veillonellaceae</i>	
OPU 169	<i>Selenomonas lipolytica</i> (AF001901)	<i>Negativicutes</i>	<i>Veillonellaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 170	uncultured bacterium (AY916294)	<i>Negativicutes</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 172	uncultured bacterium (AJ583204)	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 173	<i>Daucus carota</i> (carrot) (X73670)	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Chloroplast</i>	<i>Cyanobacteria</i>
OPU 174	uncultured organism (JN486390)	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Uncultured Cyanobacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>
OPU 175	uncultured bacterium (EU768575)	<i>Uncultured Gammaproteobacteria</i>	<i>Uncultured Gammaproteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 176	uncultured bacterium (HM445484)	<i>Uncultured actinobacteria</i>	<i>uncultured</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 177	<i>Halanaerobaculum tunisiense</i> (EU327343)		<i>Halobacteroidaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 178	<i>Dietzia actinobacteria</i> (GC368824)	<i>Actinobacteria</i>	<i>dietziaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 179	<i>Corynebacterium macginleyi</i> (AJ439345)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>

	<i>Corynebacterium tuberculostearicum</i> (AJ438050)			
OPU 180	<i>uncultured bacterium</i> (HM445560)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 181	<i>Actinomyces odontolyticus</i> (AJ234040)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 182	<i>Brevibacterium picturae</i> (AJ620364) <i>Brevibacterium sandarakinum</i> (FN293377)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Brevibacteraceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 183	<i>Micrococcus luteus</i> (AJ536198/Type sp.) <i>Micrococcus lylae</i> (X80750)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 184	<i>Janibacter limosus</i> (Y08539/Type sp.)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Intrasporangiaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 185	<i>Janibacter limosus</i> (Y08539/Type sp.)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Intrasporangiaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 186	<i>uncultured compost bacterium</i> (FN667026)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 187	<i>Leucobacter alluvii</i> (AM072820) <i>Leucobacter komagatae</i> (D45063/Type sp.)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 188	<i>Leucobacter alluvii</i> (AM072820)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 190	<i>Propionibacterium acnes</i> (AB042288)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 191	<i>Propionibacterium granulosum</i> (AJ003057)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 192	<i>Tessaracoccus bendigoensis</i> (AF038504/Type sp.) <i>Tessaracoccus oleiagri</i> (GU111566)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 193	<i>Eggerthella sinensis</i> (AY321958)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Coriobacteriaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>

	<i>Gordonibacter pamelaee</i> (AM886059/Type sp.) <i>Paraeggerthella hongkongensis</i> (AY288517/Type sp.)			
OPU 194	<i>Eggerthella lenta</i> (AF292375/Type sp.)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Coriobacteriaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 195	<i>Adlercreutzia equolifaciens</i> (AB306661/Type sp.) <i>Enterorhabdus mucosicola</i> (AM747811/Type sp.)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Coriobacteriaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 196	<i>Collinsella aerofaciens</i> (AB011816/Type sp.)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Coriobacteriaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 196-2	<i>Collinsella aerofaciens</i> (AB011816/Type sp.)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Coriobacteriaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 197	<i>Atopobium parvulum</i> (CP001721) <i>Atopobium rimae</i> (AF292371)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Coriobacteriaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 198	<i>Ruminococcus faecis</i> (FJ611794)	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 199	<i>Ruminococcus lactaris</i> (L76602)	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 200	uncultured bacterium (FJ509801)	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 201	<i>Coprococcus comes</i> (EF031542)	<i>Clostridia</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 202	<i>Clostridium glycyrrhizinilyticum</i> (AB233029)	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 203	<i>Ruminococcus torques</i> (L76604)	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 204	uncultured bacterium (DQ824050)	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 205	<i>Clostridium nexile</i> (X73443)	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Firmicutes</i>

OPU 206	<i>Ruminococcus gnavus</i> (X94967)	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 207	<i>Dorea longicatena</i> (AJ132842)	<i>Clostridia</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 208	uncultured bacterium (EU775530)	<i>Clostridia</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 209	<i>Dorea formicigenerans</i> (L34619/Type sp.)	<i>Clostridia</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 210	uncultured bacterium (DQ794633)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 211	<i>Clostridium scindens</i> (AF262238)	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 212	uncultured bacterium (DQ795704)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 213	uncultured bacterium (DQ800695)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 215	<i>Blautia wexlerae</i> (EF036467)	<i>Clostridia</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 216	uncultured bacterium (AY982765)	<i>Clostridia</i>	<i>Unclassified Clostridiales</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 217	<i>Blautia glucerasea</i> (AB439724)	<i>Clostridia</i>	<i>Unclassified Clostridiales</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 218	uncultured bacterium (EU778842)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 219	<i>Ruminococcus obeum</i> (X85101)	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 220	<i>Blautia luti</i> (AJ133124)	<i>Clostridia</i>	<i>Unclassified Clostridiales</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 221	<i>Blautia coccoides</i> (AB571656) <i>Blautia hansenii</i> (AB534168) <i>Blautia producta</i> (L76595) <i>Blautia stercoris</i> (HM626177)	<i>Clostridia</i>	<i>Unclassified Clostridiales</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 222	uncultured bacterium (DQ802533)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>

OPU 223	<i>uncultured bacterium</i> (DQ071475)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 224	<i>Lactonifactor longoviformis</i> (DQ100449/Type sp.) <i>Ruminococcus gauvreauii</i> (EF529620)	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 225	<i>Clostridium clostridioforme</i> (M59089)	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 226	<i>Clostridium citroniae</i> (DQ279737)	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 227	<i>Clostridium sp.</i> (AJ002591)	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 228	<i>Clostridium bolteae</i> (AJ508452) <i>Clostridium lavalense</i> (EF564277)	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 229	<i>uncultured bacterium</i> (EU510219)	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 230	<i>Clostridium aldenense</i> (DQ279736)	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 231	<i>Clostridium symbiosum</i> (M59112)	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 232	<i>uncultured bacterium</i> (EU531926)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 233	<i>uncultured bacterium</i> (GQ491418)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 234	<i>uncultured bacterium</i> (AY982766)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 235	<i>uncultured bacterium</i> (DQ795209)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 236	<i>uncultured organism</i> (HQ791041)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 237	<i>uncultured bacterium</i> (FJ504169)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 238	<i>uncultured bacterium</i> (DQ823771)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>

OPU 240	<i>uncultured bacterium</i> (EU767878)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 241	<i>Clostridium hathewayi</i> (AJ311620)	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 242	<i>Marvinbryantia</i> <i>formatexigens</i> (AJ505973/Type sp.)	<i>Clostridia</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 242-2	<i>Marvinbryantia</i> <i>formatexigens</i> (AJ505973/Type sp.)	<i>Clostridia</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 243	<i>uncultured bacterium</i> (EU765024)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 244	<i>Coprococcus catus</i> (AB038359)	<i>Clostridia</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 245	<i>Acetivibrio</i> <i>ethanolgignens</i> (FR749897)	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 246	<i>Eubacterium hadrum</i> (FR749932)	<i>Clostridia</i>	<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 247	<i>Anaerostipes caccae</i> (AJ270487/Type sp.)	<i>Clostridia</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 248	<i>Eubacterium hallii</i> (L34621)	<i>Clostridia</i>	<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 249	<i>Roseburia faecis</i> (AY305310) <i>Roseburia hominis</i> (AJ270482) <i>Roseburia intestinalis</i> (AJ312385)	<i>Clostridia</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 250	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> (AY169412)	<i>Clostridia</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	
OPU 251	<i>uncultured bacterium</i> (EU462328)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 252	<i>Roseburia inulinivorans</i> (AJ270473)	<i>Clostridia</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 253	<i>Eubacterium rectale</i> (L34627)	<i>Clostridia</i>	<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 254	<i>uncultured bacterium</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>

	(DQ793364)			
OPU 255	<i>uncultured bacterium</i> (DQ793889)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 256	<i>Bacteroides galacturonicus</i> (DQ497994) <i>Lactobacillus rogosae</i> (GU269544)	<i>Clostridia</i>	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 257	<i>Eubacterium eligens</i> (L34420)	<i>Clostridia</i>	<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 258	<i>uncultured bacterium</i> (DQ824130)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 259	<i>Eubacterium ventriosum</i> (L34421)	<i>Clostridia</i>	<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 260	<i>uncultured bacterium</i> (GQ898730)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 261	<i>uncultured bacterium</i> (DQ797221)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 262	<i>uncultured bacterium</i> (DQ824050)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 263	<i>uncultured bacterium</i> (DQ799863)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 264	<i>uncultured bacterium</i> (EU469607)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 265	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> (U41172/Type sp.) <i>Butyrivibrio proteoclasticus</i> (U37378)	<i>Clostridia</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 265-2	<i>Oribacterium sinus</i> (AY323228/Type sp.) <i>Oribacterium asaccharolyticum</i> (HM120211)	<i>Clostridia</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 266	<i>uncultured bacterium</i> (AY980384)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 267	<i>Eubacterium saburreum</i> (AB525414)	<i>Clostridia</i>	<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Firmicutes</i>

OPU 268	<i>uncultured bacterium</i> (EU469425)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 269	<i>Eubacterium ruminantium</i> (AB008552)	<i>Clostridia</i>	<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 270	<i>Eubacterium xylanophilum</i> (L34628)	<i>Clostridia</i>	<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 271	<i>uncultured bacterium</i> (EU766736)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 272	<i>Howardella ureilytica</i> (DQ925472/Type sp.)	<i>Clostridia</i>	<i>Unclassified Clostridiales</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 273	<i>uncultured bacterium</i> (DQ797026)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 274	<i>Clostridium aminophilum</i> (L04165)	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 275	<i>uncultured bacterium</i> W028 (AF125202)	<i>Clostridia</i>		
OPU 276	<i>Cellulosilyticum lentocellum</i> (X71851) <i>Cellulosilyticum ruminicola</i> (EF382648)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 277	<i>Clostridium lactatifermentans</i> (AY033434) <i>Clostridium neopropionicum</i> (X76746) <i>Clostridium propionicum</i> (X77841)	<i>Clostridia</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 278	<i>Clostridium bartlettii</i> (AY438672)	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 279	<i>Clostridium lituseburense</i> (M59107)	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 280	<i>Clostridium glycolicum</i> (X76750) <i>Clostridium mayombeii</i> (FR733682)	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 281	<i>Clostridium difficile</i> (AB075770)	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Firmicutes</i>

OPU 282	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> (AY326462/Type sp.) <i>Peptostreptococcus stomatis</i> (DQ160208)	<i>Clostridia</i>	<i>Peptostreptococcaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 283	<i>Eubacterium brachy</i> (Z36272)	<i>Clostridia</i>	<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 284	<i>Anaerovorax odorimutans</i> (AJ251215/Type sp.)	<i>Clostridia</i>	<i>Unclassified Clostridiales</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 285	<i>Eubacterium infirmum</i> (U13039) <i>Eubacterium sulci</i> (AJ006963)	<i>Clostridia</i>	<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 286	<i>Peptoniphilus gorbachii</i> (DQ911241) <i>Peptoniphilus harei</i> (Y07839) <i>Peptoniphilus olsenii</i> (DQ911242)	<i>Clostridia</i>	<i>Unclassified Clostridiales</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 287	<i>Anaerococcus octavius</i> (Y07841)	<i>Clostridia</i>	<i>Unclassified Clostridiales</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 288	<i>uncultured Clostridiales bacterium</i> (EF419367)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 289	<i>Parvimonas micra</i> (AY323523/Type sp.)	<i>Clostridia</i>	<i>Unclassified Clostridiales</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 290	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> (AJ413954/Type sp.)	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 291	<i>Gemmiger formicilis</i> (GU562446/Type sp.) <i>Subdoligranulum variabile</i> (AJ518869/Type sp.)	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 292	<i>uncultured bacterium</i> (EU475053)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 293	<i>uncultured bacterium</i> (DQ810046)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 294	<i>uncultured bacterium</i> (FJ511830)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>

OPU 295	<i>Eubacterium siraeum</i> (L34625)	<i>Clostridia</i>	<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 296	<i>Clostridium leptum</i> (AJ305238) <i>Clostridium</i> <i>sporosphaeroides</i> (X66002)	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 297	<i>Ruminococcus bromii</i> (L76600)	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 298	<i>Eubacterium</i> <i>coprostanoligenes</i> (HM037995)	<i>Clostridia</i>	<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 299	<i>Ruminococcus albus</i> (L76598) <i>Ruminococcus callidus</i> (L76596) <i>Ruminococcus</i> <i>champanellensis</i> (AJ515913) <i>Ruminococcus</i> <i>flavefaciens</i> (L76603/Type sp.)	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 300	<i>Anaerotruncus</i> <i>colihominis</i> (AJ315980/Type sp.)	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 301	<i>Clostridium cellulosi</i> (L09177) <i>Ethanoligenens</i> <i>harbinense</i> (AY295777/Type sp.)	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 302	<i>uncultured bacterium</i> (EF404944)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 303	<i>Flavonifractor plautii</i> (AY724678/Type sp.)	<i>Clostridia</i>	<i>Unclassified</i> <i>Clostridiales</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 304	<i>uncultured bacterium</i> (DQ796985)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 305	<i>uncultured bacterium</i> (EU462423)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 305-2	<i>uncultured bacterium</i> (EU462423)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>

OPU 306	<i>Oscillibacter valericigenes</i> (AB238598/Type sp.)	<i>Clostridia</i>	<i>Oscillospiraceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 307	uncultured bacterium (DQ797232)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 308	uncultured bacterium (DQ793223)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 309	uncultured organism (HQ759228)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 310	uncultured organism (HQ759228)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 311	uncultured bacterium (FJ366843)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 312	uncultured bacterium (FJ363126)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 313	uncultured bacterium (GQ897604)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 314	<i>Butyricoccus pullicaecorum</i> (EU410376/Type sp.) <i>Eubacterium desmolans</i> (L34618)	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 315	uncultured <i>Clostridiales</i> bacterium (AM420036)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 316	uncultured bacterium (EF403120)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 317	uncultured bacterium (DQ797210)	<i>Clostridia</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 318	<i>Clostridium celatum</i> (X77844) <i>Clostridium disporicum</i> (Y18176) <i>Clostridium quinii</i> (X76745)	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 319	<i>Clostridium paraputrificum</i> (X75907) <i>Clostridium vincentii</i> (X97432)	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Firmicutes</i>

OPU 320	<i>Clostridium perfringens</i> (CP000246)	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 321	<i>Mahella australiensis</i> (AY331143/Type sp.)	<i>Clostridia</i>	<i>Thermoanaerobacterales</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 322	<i>Christensenella minuta</i> (AB490809/Type sp.)	<i>Clostridia</i>	<i>Christensenellaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 323	<i>Bacillus muralis</i> (AJ316309) <i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i> (AB021195)	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 324	<i>Bacillus cereus</i> (AE016877) <i>Bacillus thuringiensis</i> (D16281)	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 325	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (L36472/Type sp.) <i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i> (L37599)	<i>Bacilli</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 326	<i>Streptococcus infantis</i> (AY485603)	<i>Bacilli</i>	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 327	<i>Streptococcus lactarius</i> (GU045364) <i>Streptococcus peroris</i> (AB008314)	<i>Bacilli</i>	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 328	<i>Streptococcus sanguinis</i> (AF003928)	<i>Bacilli</i>	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 329	<i>Streptococcus parasanguinis</i> (AF003933)	<i>Bacilli</i>	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 330	uncultured bacterium (FJ558307)	<i>Bacilli</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 331	<i>Streptococcus gordonii</i> (AF003931)	<i>Bacilli</i>	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 332	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i> (AY188352) <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Firmicutes</i>

	(AY188354)			
OPU 333	<i>uncultured bacterium</i> (EU473173)	<i>Bacilli</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 334	<i>Streptococcus anginosus</i> (AF104678) <i>Streptococcus massiliensis</i> (AY769997)	<i>Bacilli</i>	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 335	<i>Streptococcus mutans</i> (AY188348)	<i>Bacilli</i>	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 336	<i>Enterococcus faecalis</i> (AB012212/Type sp.) <i>Vagococcus fluvialis</i> (Y18098/Type sp.)	<i>Bacilli</i>	<i>Enterococcaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 337	<i>Granulicatella adiacens</i> (D50540/Type sp.) <i>Granulicatella balaenopterae</i> (Y16547) <i>Granulicatella elegans</i> (AF016390)	<i>Bacilli</i>	<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 338	<i>Abiotrophia defectiva</i> (D50541/Type sp.)	<i>Bacilli</i>	<i>Aerococcaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 339	<i>Gemella haemolysans</i> (L14326/Type sp.) <i>Gemella morbillorum</i> (L14327)	<i>Bacilli</i>	<i>Unclassified Bacillales</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 340	<i>Eubacterium fissicatena</i> (FR749936)	<i>Clostridia II</i>	<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 341	<i>Uncultured Bacterium</i> (EF405397)	<i>Clostridia II</i>	<i>Unclassified Lachnospiraceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 342	<i>Uncultured Bacterium</i> (EF405398)	<i>Clostridia II</i>	<i>Unclassified Lachnospiraceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 343	<i>Clostridium hylemonae</i> (AB023973)	<i>Clostridia II</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 344	<i>Blautia schinkii</i> (X94965)	<i>Clostridia II</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 345	<i>Uncultured Bacterium</i> (HQ807840)	<i>Clostridia II</i>	<i>Unclassified Lachnospiraceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 346	<i>Uncultured</i>	<i>Clostridia II</i>	<i>Unclassified</i>	<i>Firmicutes</i>

	<i>Bacterium</i> (KC245425)		<i>Lachnospiraceae</i>	
OPU 347	<i>Uncultured Bacterium</i> (CQ492655)	<i>Clostridia II</i>	<i>Unclassified Lachnospiraceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 348	<i>Uncultured Bacterium</i> (HQ762822)	<i>Clostridia II</i>	<i>Unclassified Lachnospiraceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 349	<i>Uncultured Bacterium</i> (EU777899)	<i>Clostridia II</i>	<i>Unclassified Lachnospiraceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 350	<i>Uncultured Bacterium</i> (EF404620)	<i>Clostridia II</i>	<i>Unclassified Lachnospiraceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 351	<i>Uncultured Bacterium</i> (FJ512204)	<i>Clostridia II</i>	<i>Unclassified Lachnospiraceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 352	<i>Clostridium fimetarium</i> (AF126687)	<i>Clostridia II</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 353	<i>unclassified Uncultured Bacterium</i> (AJ270491)	<i>Clostridia II</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 354	<i>Coprococcus eutactus</i> (EF031543)	<i>Clostridia II</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 355	<i>Uncultured bacteria</i> (DQ795863)	<i>Clostridia II</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 366	<i>Butyvirbio crossotus</i> (U37378)	<i>Clostridia II</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 367	<i>Uncultured bacteria</i> (HQ791355)	<i>Clostridia II</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 368	<i>Acetatifactor muris</i> type sp(HM989805)	<i>Clostridia II</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 369	<i>Uncultured bacteria</i> (DQ456398)	<i>Clostridia II</i>	<i>Unclassified Lachnospiraceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 370	<i>Clostridium colinum</i> (X76748)	<i>Clostridia II</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 371	<i>Clostridium sordellii</i> (AB075771) <i>Clostridium ghonii</i> (AB542933)	<i>Clostridia II</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 372	<i>Peptostreptococcus russellii</i> (AY167952)	<i>Clostridia II</i>	<i>Peptostreptococcaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 373	<i>Aminicella lysinilytica</i> (AB298740)	<i>Clostridia II</i>	<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Firmicutes</i>

OPU 374	<i>Mogibacterium timidum</i> (Z36296) <i>Mogibacterium neglectum</i> (AB037875) <i>Mogibacterium pumilum</i> (AB021701)	<i>Clostridia II</i>	Unclassified <i>Clostridiales</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 375	Uncultured bacteria Family XIII <i>Mogibacterium</i> (JQ185572)	<i>Clostridia II</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 376	Uncultured Bacteria Family XIII <i>Mogibacterium</i> (DQ797998)	<i>Clostridia II</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 377	<i>Anaerococcus prevotii</i> (AF542232)	<i>Clostridia II</i>	Unclassified <i>Clostridiales</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 378	<i>Anaerococcus hydrogenalis</i> (ABXA01000039) <i>Anaerococcus vaginalis</i> (AF542229)	<i>Clostridia II</i>	Unclassified <i>Clostridiales</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 379	<i>Murdochiella asaccharolytica</i> (EU483153) <i>Murdochiella Finegoldia</i> (EU483153) <i>Murdochiella magna</i> (EU483153)	<i>Clostridia II</i>	Unclassified <i>Clostridiales</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 380	<i>Anaerofilum pentosovorans</i> (X97852)	<i>Clostridia II</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 381	Uncultured <i>Ruminococcaceae</i> <i>Clostridia</i> (HQ740050)	<i>Clostridia II</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 382	Uncultured Unclassified <i>Erysipelotrichaceae</i> (EU344733)	<i>Clostridia II</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 383	<i>Clostridium methylpentosum</i> (Y18181)	<i>Clostridia II</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 384	<i>Acetanaerobacterium elongatum</i> (AY487928/Type. sp) <i>Hydrogenoanaerobacterium saccharovorans</i>	<i>Clostridia II</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Firmicutes</i>

	(EU158190)			
OPU 385	<i>Uncultured Bacteriua Ruminococcaceae Clostridia (HQ785763)</i>	<i>Clostridia II</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 386	<i>Eubacterium moniliforme (AB540985)</i>	<i>Clostridia II</i>	<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 387	<i>Clostridium sulfidigenes(AF116920)</i> <i>Clostridium subterminalis(AF241844)</i> <i>Clostridium thiosulfatireducens(AY024332)</i>	<i>Clostridia II</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 388	<i>Eubacterium limosum(M59120)</i>	<i>Clostridia II</i>	<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 389	<i>Uncultured bacteria (AM691886)</i>	<i>Clostridia II</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 390	<i>Actinomyces oris (AB545935)</i> <i>Actinomyces viscosus (X82453)</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 391	<i>Flaviflexus huanghaiensis (JN815236)</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 392	<i>Gerogenia satyanarayanai (AJ299402)</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Deferribacteraceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 393	<i>Branchybacterium squillarum (AB520822)</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Dermacoccaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 394	<i>Arthrobacter flavus (AB537168)</i> <i>Arthrobacter agilis (X80748)</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 395	<i>Arthrobacter sp (EF660748)</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 396	<i>Arthrobacter protophormia(X80741)</i> <i>Arthrobacter mysorensis(AJ617482)</i> <i>Arthrobacter ardleyensis(AJ551163)</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>

	<i>Arthrobacter nicotianae</i> (X80739)			
OPU 397	<i>Micrococcus lactis</i> (FN673681) <i>Micrococcus zhihengliuella</i> (FJ214355) <i>Micrococcus aestuarii</i> (AJ717388)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 398	<i>Kocuria rosea</i> (X87756)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
opu 399	<i>Kocuria flava</i> (EF602041)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 400	<i>Rothia mucilaginosa</i> (X87758)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 401	<i>Kocuria</i> sp (GQ352404)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 402	<i>Xylanimicrobium ulmi</i> (AF105422) <i>Xylanimicrobium pachnoda</i> (AY273185)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Promicromonosporaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 403	<i>Ornithinimicrobium humiphilum</i> type sp (AJ277650)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Intrasporangiaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 404	<i>Ornithinimicrobium tianjinense</i> (JQ948045)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Intrasporangiaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 405	<i>Arsenicococcus bolidensis</i> (AJ558133)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Intrasporangiaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 406	<i>Aquipuribacter hungaricus</i> (FM179321)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Intrasporangiaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 407	<i>Sanguibacter marinus</i> (AJ783958) <i>Sanguibacter soli</i> (EF547937)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Sanguibacteraceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 408	<i>Microbacterium mitrae</i> (GQ351351)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 409	<i>Microbacterium oleivorans</i> (AJ698725) <i>Microbacterium laevaniformans</i> (Y17234)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 410	<i>Microbacterium</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>

	<i>hatanonis</i> (AB274908)			
OPU 411	<i>Microbacterium shaanxiense</i> (KJ735510) <i>Microbacterium murale</i> (HE585693) <i>Microbacterium invictum</i> (AM949677)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 412	<i>Microbacterium aurum</i> (Y17229)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 413	<i>Agrococcus citreus</i> (AB279547) <i>Agrococcus jensis</i> (X92492)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 414	<i>Naasia aerilata</i> type sp (JQ639051)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 415	<i>Yonghaparkia alkaliphila</i> type sp (DQ256087)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 416	<i>Quadrisphaera granulorum</i> type sp (AY831385)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Kineosporiaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 417	<i>Streptomyces flaveolus</i> (AB184764) <i>Streptomyces phaeoluteichromatis</i> (AJ391813) <i>Streptomyces misionensis</i> (EF178678)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Streptomycetaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 418	<i>Corynebacterium coyleae</i> (X96497) <i>Corynebacterium imitans</i> (Y09044)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 419	<i>Uncultured bacteria</i> (CQ092935)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 420	<i>Corynebacterium kroppenstedtii</i> (Y10077)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 421	<i>Rhodococcus yunnanensis</i> (AY602219)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Nocardiaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 422	<i>Nocardia coeliaca</i> (FR733721) <i>Nocardia Rhodococcus</i> (EF418604) <i>Nocardia erythropolis</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Nocardiaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>

	(HM153801)			
OPU 423	<i>Mycobacterium phocaicum</i> (AY859682) <i>Mycobacterium mucogenicum</i> (AY457074)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Mycobacteriaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 424	<i>Propionibacterium cyclohexanicum</i> (D82046)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 425	<i>Luteococcus sediminum</i> (KC986353)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 426	<i>Propioniciclava tarda</i> type sp (AB298731)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 427	<i>Friedmanniella spumicola okinawensis</i> (AF062535)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 428	<i>Microclunatus phosphovor</i> us type sp (Z78207)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 429	<i>Nocardiodis exalbidus</i> (AB092561) <i>Nocardiodis furvisabuli</i> (AB092561) <i>Nocardiodis alpinus</i> (AB092561) <i>Nocardiodis sediminis</i> (AB092561)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Nocardiaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 430	<i>Marmoricola scoriae</i> (FN386750)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Nocardiodaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 431	<i>Marmoricola bigeumensis</i> (EF466120)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Nocardiodaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 432	<i>Aeromicrobium fastidiosum ponti</i> (AF005022)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Nocardiodaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 434	<i>Pseudonocardia petroleophila</i> (AF325725) <i>Pseudonocardia seranimata</i> (AF325725)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 435	<i>Pseudonocardia yuanmonensis</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>

	(JN656709)			
OPU 436	<i>Lentzea waywayandensis</i> (AB020029)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 437	<i>Blastococcus aggregatus</i> (L40614) <i>Blastococcus</i> <i>endophyticus</i> (GQ494034)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Geodermatophilaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 438	<i>Modestobacter</i> <i>multiseptatus</i> (Y18646) <i>M</i> <i>odestobacter</i> <i>marinus</i> (EU181225)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Geodermatophilaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 439	<i>Geodermatophilus</i> <i>obscurus</i> <i>sp</i> (X92356) <i>Geodermatop</i> <i>hilus</i> <i>africanus</i> (HE654550) <i>Ge</i> <i>odermatophilus</i> <i>siccatus</i> (HE654548)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Geodermatophilaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 440	<i>Uncultured Bacteria</i> (KC554514)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 441	<i>Uncultured Bacteria</i> (AM935704)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 443	<i>Aquihabitans</i> <i>daechungensis</i> (JN033775)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Iamiaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 444	<i>Aquihabitans</i> <i>daechungensis</i> (JN033775)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Iamiaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 445	<i>Uncultured</i> <i>bacteria</i> (CQ263145)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 446	<i>Uncultured</i> <i>bacteria</i> (CQ422741)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 447	<i>Slackia piriformis</i> (AB490806)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Eggerthellaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 447-2	<i>Slackia piriformis</i> (AB490806)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Eggerthellaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 448	<i>Uncultured</i> <i>bacteria</i> (AM406065)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>

OPU 449	<i>Uncultured bacteria</i> (KF101363)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 450	<i>Uncultured bacteria</i> (AM4046445)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 451	<i>Olsenella scatoligenes</i> (JX905358)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Atopobacteriaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 452	<i>Olsenella sp</i> (AB739700)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Atopobacteriaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 453	<i>Olsenella profusa</i> (AF292374)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Atopobacteriaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 454	<i>Olsenella umbonata</i> (FN178463)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Atopobacteriaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 455	<i>Uncultured Bacteria</i> (FJ369490)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 456	<i>Solirubrobacter ginsenosidimitans</i> (EU332825)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Solirubrobacteraceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 457	<i>Thermoleophilum album</i> (AJ458462)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Thermoleophilaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 458	<i>Streptococcus mitis</i> (AF003929) <i>Streptococcus</i> <i>oralis</i> (AY485602)	<i>Bacilli</i>	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 459	<i>Streptococcus tigurinus</i> (JN004270)	<i>Bacilli</i>	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 460	<i>Streptococcus lutetiensis</i> (AJ297215) <i>Streptococcus</i> <i>equinus</i> (AJ301607)	<i>Bacilli</i>	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 461	<i>Streptococcus sinensis</i> (AF432856) <i>Streptococcus</i> <i>oligofermentans</i> (AY099095)	<i>Bacilli</i>	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 462	<i>Streptococcus sobrinus</i> (AY188349)	<i>Bacilli</i>	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 463	<i>Lactococcus lactis</i> (AB598994)	<i>Bacilli</i>	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 464	<i>Carnobacterium jeotgali</i> (EU817500) <i>Carnobacterium viridans</i> (AF425608)	<i>Bacilli</i>	<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Firmicutes</i>

	<i>Carnobacterium inhibens</i> (HE583595)			
OPU 465	<i>Desemzia incerta</i> (Y17300)	<i>Bacilli</i>	<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 466	<i>Aerococcus viridans</i> (ADNT01000041) <i>Aerococcus urinaeequi</i> (D87677)	<i>Bacilli</i>	<i>Aerococcaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 467	<i>Facklamia tabacinasalis</i> (Y17820)	<i>Bacilli</i>	<i>Aerococcaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 468	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp type sp(AB023968)	<i>Bacilli</i>	<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 469	<i>Weissella hellenica</i> (S67831)	<i>Bacilli</i>	<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 470	<i>Weissella fabalis</i> (CP002455) <i>Weissella ghanensis</i> (CP002455)	<i>Bacilli</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 471	<i>Lactobacillus antri</i> (AY253659) <i>Lactobacillus oris</i> (X94229) <i>Lactobacillus panis</i> (X94230) <i>Lactobacillus vaginalis</i> (AF243177)	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 472	<i>Lactobacillus mucosae</i> (AF126738)	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 473	<i>Lactobacillus fermentum</i> (ACGI01000130)	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 474	<i>Lactobacillus sakei</i> (AY255802)	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 475	<i>Lactobacillus pentosus</i> (D79211) <i>Lactobacillus plantarum</i> subsp <i>argenteratensis</i> (Y19167) <i>Lactobacillus plantarum</i> subsp <i>plantarum</i> (Y19167)	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 476	<i>lactobacillus rhamnsus</i> (D16552)	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Firmicutes</i>

OPU 478	<i>Lactobacillus faecis</i> (AJ632157)	Bacilli	Lactobacillaceae	Firmicutes
OPU 479	<i>lactobacillus saerimmeri</i> (AY255802)	Bacilli	Lactobacillaceae	Firmicutes
OPU 480	<i>Lactobacillus salivarius</i> (AF089108)	Bacilli	Lactobacillaceae	Firmicutes
OPU 481	<i>Lactobacillus ruminis</i> (AB326354)	Bacilli	Lactobacillaceae	Firmicutes
OPU 482	<i>Lactobacillus jhonsonii</i> (AF243176) <i>Lactobacillus taiwanensis</i> (EU487512) <i>Lactobacillus gasseri</i> (AF519171)	Bacilli	Lactobacillaceae	Firmicutes
OPU 483	<i>Lactobacillus iners</i> (Y16329)	Bacilli	Lactobacillaceae	Firmicutes
OPU 484	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (AY773947)	Bacilli	Lactobacillaceae	Firmicutes
OPU 485	<i>Lactobacillus equicursoris</i> (AB290830)	Bacilli	Lactobacillaceae	Firmicutes
OPU 486	<i>Atopostipes suicloacalis</i> (AF445248)	Bacilli	Carnobacteriaceae	Firmicutes
OPU 487	<i>Dolosigranulum pigrum</i> (X70907)	Bacilli	Carnobacteriaceae	Firmicutes
OPU 489	<i>Turicibacter sanguinis</i> (AF349724)	Bacilli	Erysipelotrichaceae	Firmicutes
OPU 490	<i>Bacillus qingshengii</i> (JX293295)	Bacilli	Bacillaceae	Firmicutes
OPU 491	<i>Bacillus horikoshii</i> (AB043865)	Bacilli	Bacillaceae	Firmicutes
OPU 492	<i>Salinicoccus sp</i> (AB258358)	Bacilli	Staphylococcaceae	Firmicutes
OPU 494	unclassified (DQ057480)	Clostridia I	Erysipelotrichaceae	Firmicutes
OPU 495	<i>Faecalicoccus pleomorphus</i> (M23730)	Clostridia I	Streptococcaceae	Firmicutes
OPU 496	<i>Faecalitalea cylindroides</i> (L34617)	Clostridia I	Eubacteriaceae	Firmicutes

OPU 497	<i>Uncultured bacteria</i> (CQ175443)	<i>Clostridia I</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 498	<i>Erysipelothrix inopinata</i> (AJ550617)	<i>Clostridia I</i>	<i>Erysipelotrichaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 499	<i>Acholeplasma pleciae</i> (AY257486) <i>Acholeplasm ao granularum</i> (AY538166)	<i>Mollicutes</i>	<i>Acholeplasmataceae</i>	<i>Terricutes</i>
OPU 500	<i>Asteroleplasma anaerobium</i> (M22351)	<i>Mollicutes</i>	<i>Anaeroplasmataceae</i>	<i>Terricutes</i>
OPU 501	<i>Uncultured Unclassified Lanchnospiraceae</i> (CQ358274)		<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 502	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i> (AB07318 9) <i>Paenibacillus purispatii</i> (EU888513)	<i>Bacilli</i>	<i>Paenibacillaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 503	<i>Paenibacillus dongdonensis</i> (KF425513)	<i>Bacilli</i>	<i>Paenibacillaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 504	<i>Fusobacterium nucleatum subsp animalis</i> (AJ867039)	<i>Fusobacteria</i>	<i>Fusobacteriaceae</i>	<i>Fusobacteria</i>
OPU 505	<i>Uncultured Bacteria</i> (HM253732)	<i>Fusobacteria</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Fusobacteria</i>
OPU 506	<i>Dialister succinatiphilus</i> (AB370249)	<i>Negativicutes</i>	<i>Veillonellaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 507	<i>Dialister propionicifaciens</i> (AY850119)	<i>Negativicutes</i>	<i>Veillonellaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 508	<i>Peptococcus niger</i> (X55797)	<i>Negativicutes</i>	<i>Peptococcaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 509	<i>Uncultured bacteria</i> (FJ512259)	<i>Negativicutes</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Firmicutes</i>
OPU 510	<i>Iphinoe spelaeobios type sp</i> (HM748317)		<i>Stigonematales</i>	<i>Cyanobacteria</i>
OPU 511	<i>Salmonella bongori</i> (AF029227)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>

OPU 512	<i>Enterobacter massiliensis</i> (JN657217)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 513	<i>Enterobacter</i> sp.(GU814270) <i>Escherichia vulneris</i> (AF530476)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 514	<i>Citrobacter gillenii</i> (AF025367)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 515	<i>Raoultella planticola</i> (AF129443)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 516	<i>Raoultella terrigena</i> (Y17658)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 517	<i>Hafnia alvei</i> (M59155) <i>Hafnia paralvei</i> (FM179943) <i>Obesumbacterium proteus</i> (AJ233422)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 518	<i>Serratia myotis</i> (KJ739884) <i>Serratia quinivorans</i> (AJ233435)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 519	<i>Rahnella aquatilis</i> (AJ233426)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 520	<i>Serratia ureilytica</i> (AJ854062)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 521	<i>Erwinia tasmaniensis</i> (AM055716)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 522	<i>Proteus hauseri</i> (FR733709) <i>Cosezaea myxofaciens</i> (DQ885259)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 523	<i>Providencia rustigianii</i> (AM040489)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 524	Uncultured bacteria (HQ807329)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 525	<i>Shewanella Sohaensis</i> (GU944672) <i>Shewanella pacifica</i> (AF500075); <i>Shewanella putrefaciens</i> (X81623)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Shewanellaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>

OPU 526	<i>Unclassified Mesorhizobium sp (GU726974)Pseudomonas seleniipraecipitans (FJ422810)</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 527	<i>Pseudomonas benzenivorans (FM208263)</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 528	<i>Pseudomonas argentinensis (AY691188)</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 529	<i>Pseudomonas bazanensis (GQ161991)Pseudomonas xiamenensis (DQ088664)</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 530	<i>Pseudomonas matsuisoli (KJ720680)</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 531	<i>Pseudomonas psychrotolerans (AJ575816)</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 532	<i>Halomonas magadiensis (X92150)Halomonas stevensii (AM941388)Halomonas jhonsoniae (EU909458)</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Halomonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 533	<i>Uncultured bacteria(KF911178)</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 534	<i>Legionella longbeachae (AY444740)</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Legionellaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 535	<i>Uncultured Bacteria(KC502878)</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 536	<i>Psychrobacter alimentarius (AY513645)</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 537	<i>Nevskia soli (EF178286)</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Nevskiaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 538	<i>Limmobacter thiooxidans (AJ289885)</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 539	<i>Massilia suwonensis (FJ969487)</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Oxalobacteraceae</i>	<i>Proteobacteria</i>

OPU 540	<i>Massilia lutea</i> (AY966001) <i>Massilia</i> <i>dura</i> (AY965998)	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Oxalobacteraceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 541	<i>Unidibacterium</i> <i>oligocarboniphil</i> (JQ417431)	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Oxalobacteraceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 542	<i>Herbaspirillum huttiense</i> (DQ150563)	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Oxalobacteraceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 543	<i>Oxalicibacterium</i> <i>solurbis</i> (AB008503)	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Oxalobacteraceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 544	<i>Lautropia mirabilis</i> (AEQP01000026)	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 545	<i>Comamonas testosteroni</i> (M11224) <i>Comamonas</i> <i>thiooxydans</i> (DQ322069)	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 546	<i>Tepidimonas fonticaldi</i> (JN713899)	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Unclassified</i> <i>Burkholderiales</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 547	<i>Schlegelella aquatica</i> (DQ417336)	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 548	<i>Azohydromonas</i> <i>australis</i> (AB188124)	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Alcaligenaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 549	<i>Aquabacterium parvum</i> (AF035052)	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Unclassified</i> <i>Burkholderiales</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 550	<i>Uncultured</i> <i>Alcalinenaceae</i> <i>Sutterella</i> (EF405056)	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 551	<i>Parasutterella secunda</i> (AB491209)	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Sutterellaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 552	<i>Snodgrassella alvi</i> (JQ746651)	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Neisseriaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 553	<i>Methyloversatilis</i> <i>universalis</i> (DQ442273)	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 554	<i>Methylotenera mobilis</i> <i>type sp</i> (DQ287786)	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Methylophilaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 555	<i>Lysobacter mobilis</i> (JQ608331) <i>Lysobacter</i> <i>xinjigensis</i> (EU833988)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Lysobacteraceae</i>	<i>Proteobacteria</i>

OPU 556	<i>Vulcaniibacterium thermophilum</i> (JQ746036)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Lysobacteraceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 557	<i>Lysobacter bugurensis</i> (EU780693)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Lysobacteraceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 558	<i>Lysobacter soli</i> (EF623862)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Lysobacteraceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 559	<i>Ancylobacter defluvii</i> (KC243678)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Xanthobacteraceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 560	<i>Azorhizobium doebereineriae</i> (AF391130)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Xanthobacteraceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 561	uncultured <i>Unclassified</i> (JX534175)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 562	<i>Aquamicrobium lusatiense</i> (AJ132378)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Phyllobacteriaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 563	Uncultured <i>Unclassified</i> (AB257631)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 564	<i>Phyllobacterium mysinacearum</i> (AY785315)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Phyllobacteriaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 565	<i>Hyphomicrobium facile</i> subsp (CP002083)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Hyphomicrobiaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 566	<i>Kaistia defluvii</i> (AM409365)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 567	<i>Methylopila hananensis</i> (AF004844) <i>Methylopila juangsuensis</i> (FJ502233) <i>Methylopila musalis</i> (JQ173144) <i>Paracoccus carotinifaciens</i> (AB006899)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Methylocystaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 568	<i>Paracoccus carotinifaciens</i> (AB006899) <i>Paracoccus marcusii</i> (Y12703) <i>Paracoccus tibetensis</i> (DQ108402)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Proteobacteria</i>

OPU 569	<i>Paracoccus pacificus</i> (KF924610)	Alphaproteobacteria	Rhodobacteraceae	Proteobacteria
OPU 570	<i>Paracoccus sediminis</i> (JX126474)	Alphaproteobacteria	Rhodobacteraceae	Proteobacteria
OPU 571	<i>Paracoccus yeei</i> (AY014173)	Alphaproteobacteria	Rhodobacteraceae	Proteobacteria
OPU 572	<i>Paracoccus panacisoli</i> (KJ653224)	Alphaproteobacteria	Rhodobacteraceae	Proteobacteria
OPU 573	<i>Paracoccus solventivorans</i> (AY014175)	Alphaproteobacteria	Rhodobacteraceae	Proteobacteria
OPU 574	<i>Gemmobacter megaterium</i> (JN620361)	Alphaproteobacteria	Rhodobacteraceae	Proteobacteria
OPU 575	<i>Rubellimicrobium aerolatum</i> (EU338486)	Alphaproteobacteria	Rhodobacteraceae	Proteobacteria
OPU 576	<i>Amaricoccus kaplicensis</i> (U88041)	Alphaproteobacteria	Rhodobacteraceae	Proteobacteria
OPU 577	Uncultured <i>Caulobacteraceae</i> (HQ845885)	Alphaproteobacteria	Pseudonocardiaceae	Proteobacteria
OPU 578	<i>Methylobacterium tardum</i> (AB175647) <i>Methylobacterium persicinum</i> (AB175647)	Alphaproteobacteria	Methylobacteriaceae	Proteobacteria
OPU 579	<i>Methylobacterium populi</i> (AY251818) <i>Methylobacterium rhodesianum</i> (AB175642)	Alphaproteobacteria	Methylobacteriaceae	Proteobacteria
OPU 580	<i>Methylobacterium jeotgali</i> (DQ471331)	Alphaproteobacteria	Methylobacteriaceae	Proteobacteria
OPU 581	<i>Methylobacterium geosingense</i> (AJ250801)	Alphaproteobacteria	Methylobacteriaceae	Proteobacteria
OPU 582	<i>Psychroglaciecola arctica</i> (KC511070/Type sp.)	Alphaproteobacteria	Methylobacteriaceae	Proteobacteria
OPU 583	<i>Microvirga vignae</i> (JX504804)	Alphaproteobacteria	Methylobacteriaceae	Proteobacteria
OPU 584	<i>Chelatococcus</i>	Alphaproteobacteria	Beijerinckiaceae	Proteobacteria

	<i>sambhunathii</i> (DQ322070) <i>Chelatococcus daeguensis</i> (EF584507)			
OPU 585	<i>Sphingomonas koreensis</i> (AF131296)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 586	<i>Sphingomonas japonica</i> (AB428568) <i>Sphingomonas xinjiangensis</i> (FJ754464)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 587	<i>Sphingomonas aerophila</i> (AY894691)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 588	<i>Sphingomonas gei</i> (KF551181) <i>Sphingomonas naasensis</i> (KC735149)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 589	<i>Sphingomonas yantingensis</i> (JX566547)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 590	<i>Sphingomonas jinjuensis</i> (EU707561) <i>Sphingomonas kyungheensis</i> (JN196137)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 591	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> (U37337) <i>Sphingomonas sanguinis</i> (D84529)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 592	<i>Sphingomonas panni</i> (AJ575818)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 593	<i>Sphingobium yanoikuyae</i> (D13728) <i>Sphingobium scionense</i> (EU009209)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 594	<i>Sphingobium xenophagum</i> (X94098)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 595	<i>Sphingobium limneticum</i> (JN591313)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 596	<i>Novosphingobium lindaniclasticum</i> (AJ303009) <i>Novosphingobium resinovorum</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>

	(EF029110)			
OPU 597	<i>Unclassified Novosphingobium sp</i> (JF58134)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 598	<i>Alterythrobacter atlanticus</i> (DQ836765) <i>Alterythrobacter xinjiangensis</i> (DQ836765)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Alteromonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 599	<i>Alterythrobacter dongtanensis</i> (DQ836765) <i>Alterythrobacter troitsensis</i> (DQ836765)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Alteromonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 600	<i>Sphingopyxis chulensis</i> (AF367204) <i>Sphingopyxis panaciterrae</i> (AB245353)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 601	<i>Polymorphobacter multimanifer</i> (AB649056)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 602	<i>Acidisoma tundrae</i> (AM947652) <i>Acidisoma sibiricum</i> (AM947653)	<i>Alphaproteobacteria</i>	#N/A	<i>Proteobacteria</i>
OPU 603	<i>Roseomonas aestuariri</i> (FM244739) <i>Roseomonas rhizosphaerae</i> (KC904962)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Acetobacteraceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 604	<i>Geminicoccus roseus</i> (AM403172)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Unclassified Alphaproteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 605	<i>Uncultured Organims</i> (HQ810970)	<i>Bacteroides</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 606	<i>Uncultured Unclassified</i> (EU762233)	<i>Bacteroides</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 607	<i>Uncultured Unclassified</i> (HM124005)	<i>Bacteroides</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 608	<i>Prevotella intermedia</i> (AB547686)	<i>Bacteroides</i>	<i>Prevotellaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 609	<i>Prevotella bivia</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Prevotellaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>

	(L16475)			
OPU 610	<i>Prevotella enoeca</i> (AJ005635) <i>Prevotella pleuritidis</i> (AB278593)	<i>Bacteroides</i>	<i>Prevotellaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 611	Uncultured <i>Prevotellaceae</i> (HQ7886662)	<i>Bacteroides</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 612	<i>Porphyromonas gingivales</i> (AY253728) <i>Porphyromonas gulae</i> (AF208290) <i>Porphyromonas catoniae</i> (X82823)	<i>Bacteroides</i>	<i>Porphyromonadaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 613	<i>Parabacteroides goldsteinii</i> (AY974070) <i>Porphyromonas endodontalis</i> (AY253728)	<i>Bacteroides</i>	<i>Porphyromonadaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 613-2	<i>Porphyromonas bennonis</i> (EU414673) <i>Porphyromonas endodontalis</i> (AY253728)	<i>Bacteroides</i>	<i>Porphyromonadaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 614	<i>Dysgonomonas capnocytophagoides</i> (U41355) <i>Dysgonomonas macrotermitis</i> (HG315620)	<i>Bacteroides</i>	<i>Porphyromonadaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 615	Uncultured unclassified (DQ794885)	<i>Bacteroides</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 616	<i>Alistipes sp</i> (AY974072)	<i>Bacteroides</i>	<i>Rikenellaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 618	Uncultured <i>Bacteria</i> (DQ404664)	<i>Bacteroides</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 619	<i>Sphingobacterium anhuiense</i> (EU364817) <i>Sphingobacterium kitahiroshimense</i> (AB361248) <i>Sphingobacterium faecium</i> (AJ438176)	<i>Bacteroides</i>	<i>Sphingobacteriaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 620	<i>Sphingonacterium spiritivorum</i> type sp	<i>Bacteroides</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>

	(AY894691)			
OPU 621	<i>Sphingobacterium kyonggiense</i> (GU358699)	<i>Bacteroides</i>	<i>Sphingobacteriaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 622	<i>Pseudosphingobacterium domesticum</i> (AM407725/Type sp.)	<i>Bacteroides</i>	<i>Sphingobacteriaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 623	<i>Pedobacter oryzae</i> (EU109726) <i>Pedobacter huanghensis</i> (KC569794)	<i>Bacteroides</i>	<i>Sphingobacteriaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 624	<i>Riemerella columbipharyngis</i> (HQ286278)	<i>Bacteroides</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 625	<i>Flavobacterium aquaticum</i> (HE995762)	<i>Bacteroides</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 626	<i>Capnocytophaga gingivalis</i> (X67608)	<i>Bacteroides</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 627	<i>Rufibacter immobilis</i> (HG316123)	<i>Bacteroides</i>	<i>Cytophagaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 628	<i>Hymenobacter rigui</i> (DQ089669)	<i>Bacteroides</i>	<i>Cytophagaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 629	<i>Hymenobacter roseus</i> (HG965772)	<i>Bacteroides</i>	<i>Cytophagaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 630	<i>Pontibacter indicus</i> (KC469980)	<i>Bacteroides</i>	<i>Cytophagaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 631	<i>Adhaeribacter aerolatus</i> (CQ421846)	<i>Bacteroides</i>	<i>Cytophagaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 632	<i>Parasetibacter luojiensis</i> (EU877263) <i>Parasetibacter flavitalea</i> (D89331) <i>Parasetibacter populi</i> (EU877263)	<i>Bacteroides</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 633	<i>Taibaiella smilacinae</i> (KC571459) <i>Taibaiella aibaiella koreensis</i> (KC252613)	<i>Bacteroides</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>

OPU 634	<i>Chryseolinea serpens</i> (FR774778)	<i>Bacteroides</i>	<i>Cytophagaceae</i>	<i>Bacteroidetes</i>
OPU 635	<i>Thermoanaerobaculum aquaticum</i> (JX420244)	<i>Thermoanaerobaculum</i>	<i>Unclassified Bacteria</i>	<i>Acidobacteria</i>
OPU 636	<i>Geothrix fermentans</i> (U41563) <i>Geothrix holophaga</i> (U41563) <i>Geothrix foetida</i> (U41563)	<i>Holophagae</i>	<i>Holophagaceae</i>	<i>Acidobacteria</i>
OPU 638	<i>Stigmatella aurantiaca</i> (DQ768127/Type.sp)	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Cystobacteraceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 639	<i>Sandaracinus amylolyticus</i> (HQ540311)	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Sandaracinaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 640	<i>Desulfovibrio piger</i> (AF192152) <i>Desulfovibrio bilophila</i> (LM999902) <i>Desulfovibrio wadsworthia</i> (AF418179)	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Desulfovibrionaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 641	<i>Oligoflexus tumisiensis</i> (AB540021)	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Oligoflexaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 642	<i>Gemmatimonas aurantiaca</i> (AB072735)	<i>Gemmatimonadetes</i>	<i>Gemmatimonadaceae</i>	<i>Gemmatimonadetes</i>
OPU 643	<i>Campylobacter concisus</i> (DQ174166) <i>Campylobacter curvus</i> (DQ174165)	<i>Epsilonproteobacteria</i>	<i>Campylobacteraceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 644	<i>Campylobacter rectus</i> (DQ174169)	<i>Epsilonproteobacteria</i>	<i>Campylobacteraceae</i>	<i>Proteobacteria</i>
OPU 645	<i>Blastopirellula marina</i> (X62912)	<i>Planctomycetacia</i>	<i>Planctomycetaceae</i>	<i>Planctomycetes</i>
OPU 647	<i>Aquisphaera giovannonii</i> (DQ986200)	<i>Planctomycetacia</i>	<i>Planctomycetaceae</i>	<i>Planctomycetes</i>
OPU 648	<i>Cloacibacillus evryensis</i> (CU463952/Type sp.) <i>Cloacibacillus porcorum</i> (JQ809697)	<i>Synergistia</i>	<i>Synergistaceae</i>	<i>Synergistetes</i>
OPU 649	<i>Akkermansia muciniphila</i> (AY271254)	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Akkermansiaceae</i>	<i>Verrucomicrobia</i>

OPU 650	<i>Thermomicrobium roseum</i> (M34115/Type sp)	<i>Thermomicrobia</i>	<i>Thermomicrobiaceae</i>	<i>Cloroflexi</i>
OPU 651	<i>Actinomyces graevenitzi</i> (AJ540309)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Actinobacteria</i>
OPU 656	<i>Massilia namucunensis</i> (JF799985)	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Oxalobacteraceae</i>	<i>Proteobacteria</i>