

# Análisis de la diversidad bentónica marina en el Puerto de Palma y en otras zonas de la Bahía

Comparación de análisis morfológicos y de metabarcoding

Informe final - octubre 2018



 **IMEDEA**  
Institut Mediterrani d'Estudis Avançats

 **Universitat**  
de les Illes Balears

 **CSIC**  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

  
**Ports de Balears**  
Autoritat Portuària de Balears

 **NTNU**  
Norwegian University of  
Science and Technology

María Capa & Joan Pons

16.10.2018

## Resumen

---

La calidad de los fondos marinos no tan sólo depende de las características físico-químicas del agua o sedimentos, sino que ésta también obedece a la biodiversidad biológica que alberga. El presente proyecto trata de evaluar la eficiencia y precisión de técnicas genéticas basadas en el ADN para el monitoreo ambiental y la caracterización de las comunidades de especies marinas bentónicas.

Estudios previos han demostrado que los anélidos poliquetos son unos excelentes indicadores de la biodiversidad global y de calidad ambiental de las comunidades bentónicas. Por lo tanto, este proyecto se va a concentrar en estos organismos, como representante de la comunidad. Además, son un óptimo indicador de la presencia de especies invasoras en las áreas portuarias con varias especies consideradas como introducidas o invasoras en las aguas españolas.

Los resultados genéticos obtenidos mediante las nuevas tecnologías de secuenciación masiva de ADN se van a comparar con aquellos conseguidos con las herramientas tradicionales de identificación de especies mediante análisis morfológicos. Para poder comparar el impacto de la antropización sobre la biodiversidad, se va a estudiar áreas de diferente impacto humano (p.ej. Portixol y Reserva Marina de la Bahía de Palma). Entre estos factores incluimos el tráfico de mercancías y pasajeros, el grado de transporte involuntario de especies bentónicas (ya sea en el agua de lastre o en la superficie de los cascos de las embarcaciones) y la existencia de especies indicadoras de determinadas condiciones ambientales. Los datos genéticos obtenidos (secuencias de ADN que son códigos de barras identificadores de todas las especies encontradas) se depositarán en bases públicas como GenBank – que serán de gran utilidad en futuros proyectos de monitoreo ambiental tanto del Puerto de Palma como de otras zonas litorales.

## Introducción

El mantenimiento de la biodiversidad es esencial para la conservación de los ecosistemas de nuestro planeta. El conocimiento de la composición de las comunidades, la abundancia y distribución de especies es fundamental para los esfuerzos de conservación de la biodiversidad, la gestión y la formulación de políticas, y es de vital importancia en un mundo cambiante afectado por el cambio climático, la pérdida de hábitats y las especies invasoras que amenazan nuestra bioseguridad (Unión Europea, 2011). La protección de la diversidad pues, mantendrá la capacidad de la naturaleza para entregar los bienes y servicios que necesitamos, mientras que su pérdida tiene un alto coste (Mills et al. 1993). Sin embargo, en la actualidad todavía desconocemos la mayoría de las especies que conforman las comunidades que nos rodean y esta falta de conocimiento es más acuciado en el medio marino, para el que se calcula que solo se conoce el 1% de los organismos que habitan en él (Blaxter, 2003). Sin el conocimiento previo de la biodiversidad en zonas con bajo o nulo impacto humano es imposible determinar el estado de salud de un área o ecosistema y establecer los protocolos de gestión o restauración.

Los programas de monitoreo ambiental producen datos y evidencia para el manejo efectivo de los hábitats y comunidades bentónicas marinas y permiten extraer conclusiones sobre la causa y la dirección del cambio natural y antropogénico. Las medidas de gestión generalmente se basan en los resultados de estas conclusiones, por lo tanto, es fundamental que los programas de monitoreo ambiental estén bien diseñados y sean estadísticamente sólidos, para evitar daños en las comunidades bentónicas o la exclusión innecesaria de determinadas actividades en áreas colindantes (Noble-James et al. 2017).

Uno de los estadios más delicados en el proceso de monitoreo de ambientes bentónicos marinos es la identificación de los organismos que los componen y en lo que se basan las conclusiones de los análisis. Este proceso de identificación requiere de expertos taxónomos que conozcan la fauna local, de bibliografía actualizada y en muchos casos de laboratorio dotados de equipamiento óptico adecuado que permita el estudio de estructuras morfológicas de tamaño microscópico. Es además una labor costosa en tiempo ya que en la mayoría de los casos cada ejemplare ha de ser examinado al detalle.



Fig. 1. Simplificación del proceso de separación de muestras e identificación de ejemplares con datos morfológicos.

Los taxónomos han trabajado durante más de 250 años en la identificación y caracterización de especies para conocer la biodiversidad de la Tierra. Los métodos empleados para delimitar las especies se han basado en la comparación de datos morfológicos y fisiológicos. En la última década, el desarrollo de técnicas biomoleculares, especialmente en lo referente a la secuenciación de ADN se han ido incorporando a la taxonomía clásica, con el objetivo de acelerar la identificación y proporcionar una precisión para la delimitación de las especies (Wiens & Penkrot 2002, Hebert et al. 2003, Sites & Marshall 2003, Sogin et al. 2006, Pons et al. 2006, Bourlat et al. 2013, Aylagas et al. 2014, Hirai et al. 2014).



Fig. 2. Simplificación del proceso de identificación de ejemplares con métodos moleculares.

Los gusanos marinos o anélidos, es un grupo diverso (con alrededor de 15.000 especies descritas) y abundante (siendo uno de los más numerosos en las comunidades bentónicas) de invertebrados que habitan en los sustratos marinos. Representan un grupo de organismos modelo ideal para esta investigación, ya que actúan como representantes de del conjunto comunidades bentónicas marinas y uno de los mejores indicadores de perturbación ambiental (Pocklington & Wells 1992; Hutchings 1998; Sparks-McConkey 2001; Olsgard 2003, Dean 2008). Además, es uno de los grupos de invertebrados marinos que ha experimentado un rango de expansión de distribución como consecuencia de las actividades humanas recientes, por ejemplo, transporte pasivo en cascos de barcos o el agua de lastre, utilizando canales artificiales, o asociación con especies de maricultura, con más 300 especies consideradas como invasoras (Carlton 1985, Capa et al. 2013, Çinar 2013).

Este proyecto, que se enmarca dentro del Convenio ya existente entre Autoridad Portuaria de Baleares y el IMEDEA, aprovecha el enorme potencial de nuevas metodologías de secuenciación de ADN (gran precisión de resultados, alta rapidez en la obtención de los mismos y bajo coste) en combinación con la métodos de taxonomía clásica (identificación de especies a través de caracteres morfológicas) para la realización de inventarios de especies en comunidades marinas concretas, análisis de los índices de diversidad para conocer su estado de conservación, y comprobar de forma fehaciente si existen especies invasoras y su grado de invasividad.

Se empleará la diversidad y abundancia de gusanos marinos o poliquetos como representantes de las comunidades bentónicas marinas e indicadores de perturbación ambiental. Asimismo, se estudia la posible existencia de especies invasoras.

Las preguntas principales que este proyecto persigue responder son:

- 1 ¿Es la metodología basada en el análisis del ADN de los organismos precisa y rentable para la caracterización y monitoreo de las comunidades marinas?
- 2 ¿Cuáles son las diferencias en biodiversidad entre las comunidades bentónicas litorales marinos prístinos y ambientes antropizados?
- 3 ¿Existen especies invasoras en la Bahía de Palma, son estas detectables, están establecidas en las zonas portuarias o han llegado a colonizar ambientes naturales?

## Área de estudio

En la propuesta del proyecto se propuso muestrear diferentes comunidades bentónicas en un gradiente de perturbación ambiental (por tráfico marítimo, contaminación de agua y sedimento derivada del mismo o por descarga de rieras). Se eligieron como objetivo el Puerto de Palma, considerado uno de los más importantes de todo el Mediterráneo en relación al tráfico de cruceros, el Portixol y de la Reserva Marina de la de la Bahía de Palma (cerca de Cala Blava). Se ha ampliado el área de estudio hacia el suroeste, para incluir la isla de la Porrassa, con unos fondos diferentes a los encontrados en la Reserva Marina de la Bahía de Palma.

Dentro de cada zona se han elegido distintos puntos de muestreo con la finalidad de que estén representadas las distintas condiciones ambientales y hábitats presentes en el mismo, debido al distinto uso que tienen las mismas. Así, por ejemplo dentro del Puerto de Palma se han tomado muestras en las cuatro zonas bien diferenciadas como son los muelles comerciales, muelles de Poniente, las dársenas deportivas y el dique del Oeste.

Fig. 3. Localización de las zonas de muestreo en la Bahía de Palma

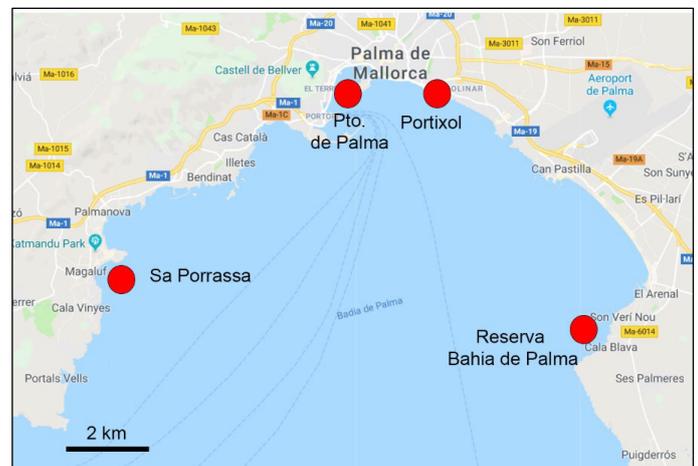
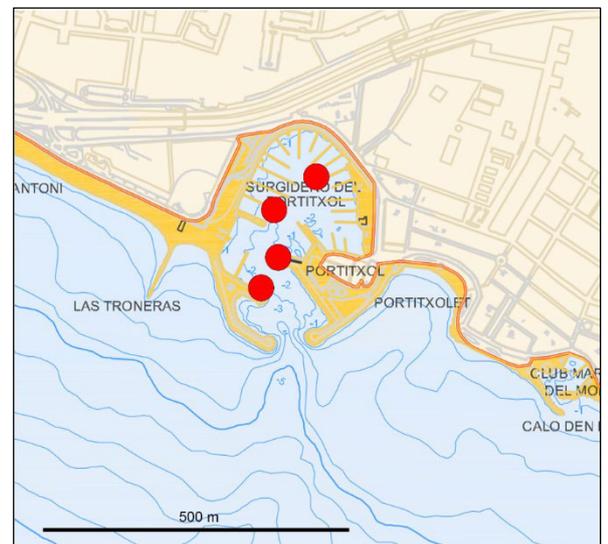


Fig. 4. Localización de las seis estaciones de muestreo (círculos rojos) dentro del Puerto de Palma.



Fig. 5. Localización de las cuatro estaciones de muestreo (círculos rojos) dentro del Portixol.



## Metodología

### Toma de muestras

Se tomaron muestras semi-cuantitativas en las cuatro localidades indicadas (Puerto de Palma, Portixol, Reserva Marina de Bahía de Palma – Cala Blava e Isla de la Porrassa) el 24- 25 de julio y el 29 de noviembre de 2017, representando las estaciones de verano e invierno, respectivamente.

Las muestras incluyen:

- Raspados de 30 x 30 cm en superficies duras (naturales y artificiales) a entre 0,5 m y 7 m de profundidad. En las zonas portuarias se han elegido superficies diversas incluyendo paredes de hormigón, pontones flotantes de metal, defensas de protección en la zona de amarre de ferris. En las zonas naturales se raspado superficies de roca o de mata muerta de *Posidonia oceanica*.
- Muestras de 3-5 litros de sedimento con una draga.
- Baldosas de 30 x 30 cm y ladrillos de arcilla, unidos de tres en tres en una línea vertical (baldosa, baldos y ladrillo) y colocados entre 0-5 y 5 m de profundidad en muros y pontones del Puerto de Palma y el Portixol. Las estructuras artificiales se colocaron en julio y se dejaron sumergidos por un periodo de 6 meses.

	VERANO				INVIERNO	
	Pto Palma	Portixol	Cala Blava	Sa Porrassa	Pto Palma	Portixol
Raspados	6	4	3	3	6	4
Dragas	6	4	3	3	6	4
Baldosas	-	-	-	-	5	3

Tabla 1. Muestras tomadas en cada localidad (Puerto de Palma, Portixol, Cala Blava y Sa Porrassa) y estación (verano e invierno).

Las muestras se tomaron con la embarcación del IMEDEA (Rodman 11.20). Se contó con la ayuda de buzos profesionales para el trabajo dentro de los puertos, como indica la normativa.

Se solicitaron los permisos necesarios para muestrear en las zonas portuarias (Autoridad Portuaria, OCAE Baleares) y en la Reserva Marina de la Bahía de Palma (Direcció General de Pesca i Medi Marí, Conselleria de Medi Ambient, Agricultura i Pesca).

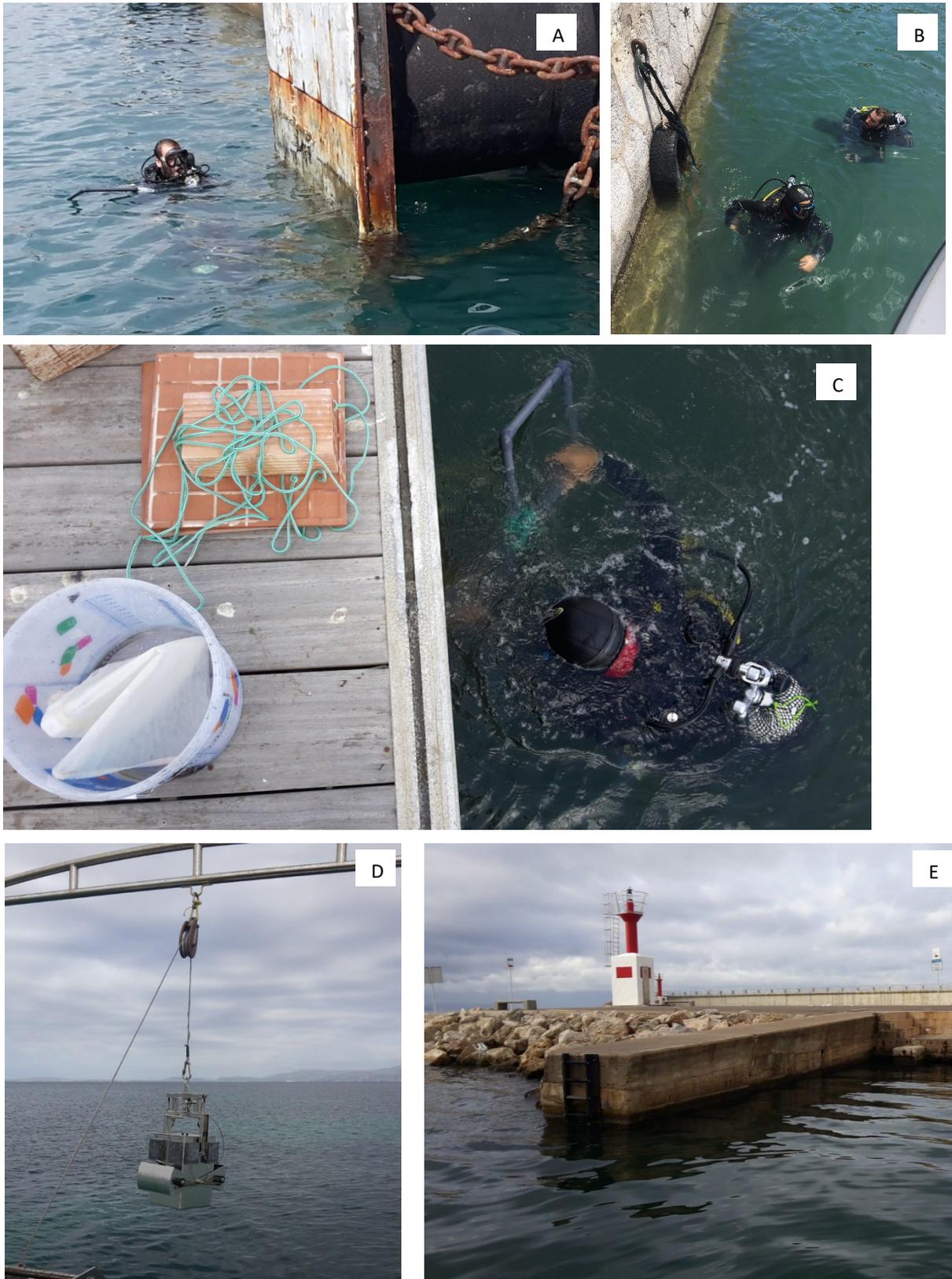


Fig. 6. A. Fotografías del muestro de verano (25 y 26 de julio 2017) Estación de muestreo PA6 (muelle de Poniente sur, Puerto de Palma). B. Buceadores en estación PA1 (escalera de la reina, Pto.Palma). C. Buceadores haciendo los raspados del muelle en Portixol y colocando las baldosas. D. Lanzamiento de la draga en Cala Blava. E. Estación de muestro PO1 (Portixol).



Fig. 7. Fotografías del muestro de invierno (25 y 26 de julio 2017) A. Buceadores recogiendo las baldosas en el Puerto de Palma. B. Toma de las muestras de bio-fouling en el barco. C. Detalle de los organismos sobre las superficies de los ladrillos. D. Baldosas cubiertas en distinto grado por organismos. E. Detalle de los tubos de serpúlidos (Annelida), y esponjas sobre la superficie de una baldosa.

## Tratamiento de las muestras

En la embarcación, las muestras se guardaron en bolsas de plástico debidamente etiquetadas se mantuvieron refrigeradas en neveras portátiles para mantener la fauna con vida hasta su procesamiento en el laboratorio (IMEDEA). Una vez allí, los gusanos marinos se separan del resto de la muestra en función del tipo de muestra. Las muestras de raspados se separaron directamente bajo la lupa, guardando todos los ejemplares en un mismo bote. Los organismos que habitan en sedimentos se separan por decantación del sedimento y tamizado, y luego bajo la lupa. Tras el procesamiento de las muestras, estas se conservan en alcohol 100% en la nevera (4-6 °C).

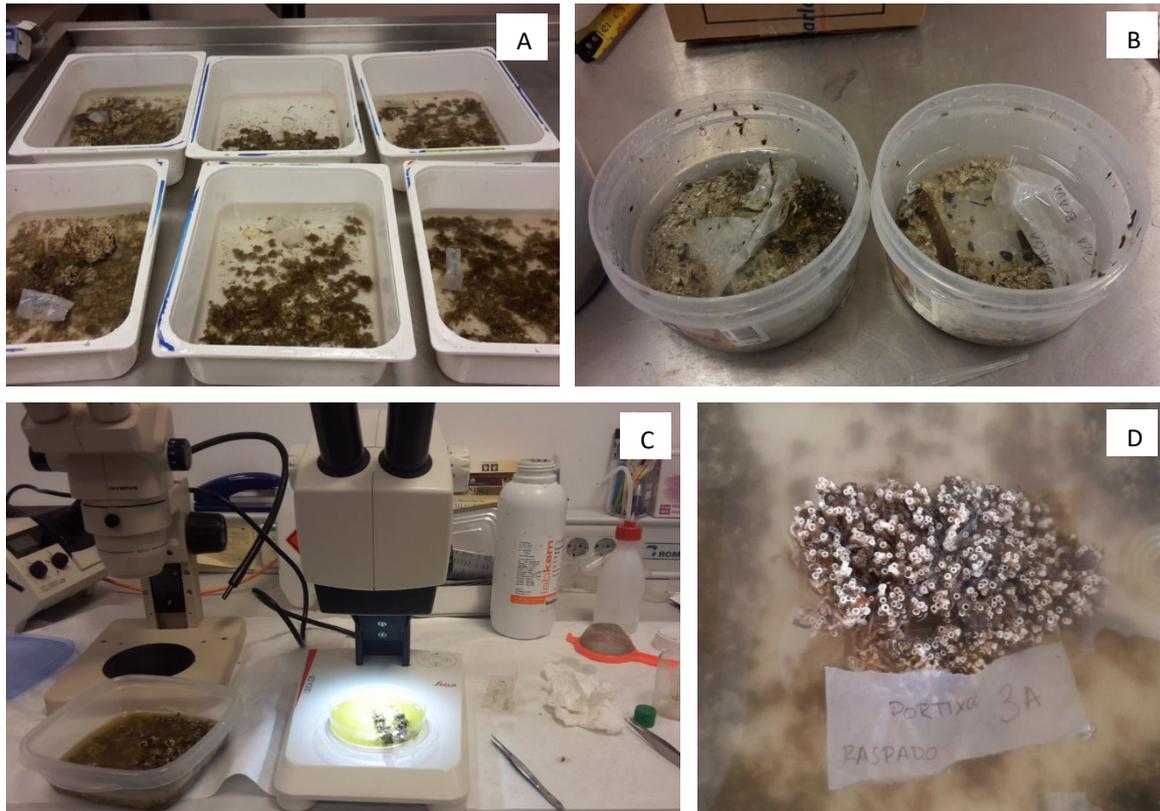


Fig. 8. A. Muestras en el laboratorio, antes de ser procesadas. B. Muestras procesadas en alcohol. C. Lupas para la separación e identificación de ejemplares. D. Tubos del serpúlido *Ficopomatus enigmaticus*, procedentes de una muestra de raspado del muelle del Portixol.

## Identificación de especies y selección de ejemplares para secuenciación

Para identificar los ejemplares de anélidos hasta especie es necesario estudiar algunos detalles morfológicos microscópicos y por lo tanto se precisa el empleo de lupa y microscopio. En algunos casos hay que diseccionar algunas estructuras de los ejemplares para poder identificar hasta género o especie. Hay que trabajar con claves dicotómicas y literatura donde se describan las especies ibéricas. No hay muchos trabajos de anélidos poliquetos en las baleares, así que nos hemos guiado por trabajos de revisión como son los volúmenes de Fauna Ibérica (p. ej. San Martín 2003, Viéitez et al. 2004, Parapar et al. 2012, Parapar et al. 2015) o de citas y descripciones en otras áreas del Mediterráneo occidental o Atlántico Noreste (Gil 2011). Para la revisión de algunos grupos taxonómicos se ha contado con la colaboración del Dr. Daniel Martín, Investigador científico del CSIC adscrito al Departamento de Ecología Marina del Centro de Estudios Avanzados de Blanes (CEAB).

Al menos un ejemplar de cada una de las especies identificadas se separó para ser secuenciado.

### Barcoding – secuenciación de ejemplares con método Sanger

La secuenciación del ADN es un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en el ADN de un organismo. La secuencia de ADN constituye la información genética heredable e informan de la identidad, relaciones de parentesco y funciones específicas o programas de desarrollo de los seres vivos. En este proyecto concreto se quiere secuenciar la información contenida en un gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI), ampliamente empleado para la identificación de especies y comúnmente conocido como gen de código de barras (Herbert 2003). En el presente trabajo lo que se pretende es generar una librería o diccionario de morfoespecies con sus correspondientes secuencias de COI y la publicación de dicho diccionario en bases de datos públicas.

Los “primers” (una cadena de ácido nucleico o de una molécula relacionada que sirve como punto de partida para la replicación del ADN) empleados para secuenciar el fragmento de código de barras de COI son diversos y la mayor parte de los investigadores suelen emplear primers universales, como los diseñados por Folmer et al. (1994) para invertebrados marinos. Estos primers permiten secuenciar un fragmento de unos 650 pares de bases. En cualquier caso, hay algunos grupos taxonómicos que, probablemente debido a la variación de la secuencia de ADN en la región del cebador, o primer resultan en un la adquisición de un 50-60% de resultados satisfactorios tras la amplificación y secuenciación.

Un reciente estudio (Elbrecht & Leese, en prensa) concluye que existen otros primers más efectivos para secuenciar la región COI en anélidos, por ejemplo ArF5 y ArR5, el inconveniente que presentan es que el fragmento secuenciado es de 310 pares de bases. Se ha optado por el uso de este set de primers, priorizando la adquisición de un número elevado de secuencias para completar la librería de COI para las especies presentes en la Bahía de Palma, confiando que la variabilidad genética encontrada en este fragmento sea suficiente para poder discernir entre especies y poblaciones.

Se ha completado la librería de “barcodes” - en aquellos casos donde los primers ArD5 y ArR5 no ha funcionado – con otros set de primers como aquellos diseñados por Folmer et al. (1994), Geller et al. (2013) y Sun et al. (2018).

Primers	Secuencia	Referencia
ArF5	5'GCICIGAYATRCITYCCICG-3'	Gibson et al. 2014
ArR5	5'GTRATIGCICIGCIARIACIGG-3'	Gibson et al. 2014
LCO1490	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'	Folmer et al. 1994
HC02198	5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3'	Folmer et al. 1994
jgHC02198	5'-TAIACYCIGGRTGICRAARAAYCA-3'	Geller et al. 2013
jgLCO1490	5'-TITCIACIAAYCAYAARGAYATTGG-3'	Geller et al. 2013
HyCOF190:	5'-TCNRTNTTKACDGTKACATGCTA-3'	Sun et al. 2018
HyCOR886	5'-ACCCYATYATHCCRATAGARCACAT-3'	Sun et al. 2018

Tabla 2. Primers (junto con secuencia nucleotídica y autores y año de su publicación) empleados en este estudio.



Fig. 9. Parte del equipamiento del laboratorio de Sistemática Molecular del IMEDEA. A. Centrifugas. B. Termociclador o máquina de PCR

Para la obtención de las secuencias, se han contratado los servicios del Parc de Reserca Biomedica de Barcelona.

```
>Nephtys hombergii
AAGGGATAAAAGCAGAAGAATAGCAGTGATCTTANCGGCCACACAAATAAAGGAACACG
TTCTAATCGTAGTCCTTTTCATCGTATATTTATAACCGTAGTAATGAAATTTAGTGCCCC
TAAAATTGAAGAGGCTCCAGCTAAGTGAAGAGAAAAAATAGCTAGGTCAACTCTTGCTCC
GGCATGAGCAATGTTTCTAGATAGGGGAGGGTAAACGGTTCAACCGTTCCGACTCCTTT
TTCTACAGTGC GGATATAACAAGAAGAATTAAGAAGGGGGAAGGAGTCAGAAAGATAT
ATTATTTAAA
```

Fig. 7. Ejemplo de una de las secuencias de ADN (310 pares de bases pertenecientes a un fragmento del gen citocromo oxidasa I – COI)

La calidad de las secuencias recibidas fueron comprobada y se descartaron posibles fallos o contaminaciones. Una vez depurado los datos, estos son susceptibles de análisis y de comprobación de la identificación preliminar. Tras un primer análisis comparativo con las secuencias ya publicadas en la base de datos publica GenBank, comprobamos la identificación de algunas de las especies identificadas a través de la morfología. Así mismo, se evidencia la falta de datos para varias de las especies y la relevancia del presente proyecto para completarla.

### Secuenciación masiva de última generación

La elevada demanda de secuenciación de bajo costo ha dado lugar a las distintas tecnologías de secuenciación de alto rendimiento que son capaces de paralelizar muchas operaciones de secuenciación, produciendo miles o millones a la vez, reduciendo los costos gracias a ello. Son las llamadas también secuenciación de nueva generación o "**next-generation sequencing**". De este modo, y para este proyecto en concreto, se pretenden secuenciarlos organismos de muestras completas de una sola vez.

Una representación de la diversidad de especies hallada en la muestra (ejemplares de todas las morfoespecies encontradas) se depositó en un tubo para hacer un "batido de gusanos marinos". En el caso de ejemplares grandes, se empleó solo un pedazo de tejido, y así evitar que la ampliación de su ADN enmascare la presencia de especies/ejemplares de menor tamaño. Aquellos fragmentos no identificables en la muestra, o juveniles también se seleccionaron para el "batido". Se incluyeron varios ejemplares/fragmentos de tejido (5-10) de aquellas especies muy abundantes en la muestra.

Cuando el número de ejemplares presentes en la muestra no superaba el de 20 y la relación de morfoespecies encontrada no superaba el de 6 no se ha realizado el batido. Se han completado el procesado de las muestras tomadas en verano, extrayendo así el ADN del ‘batido’ de un total de 48 muestras.

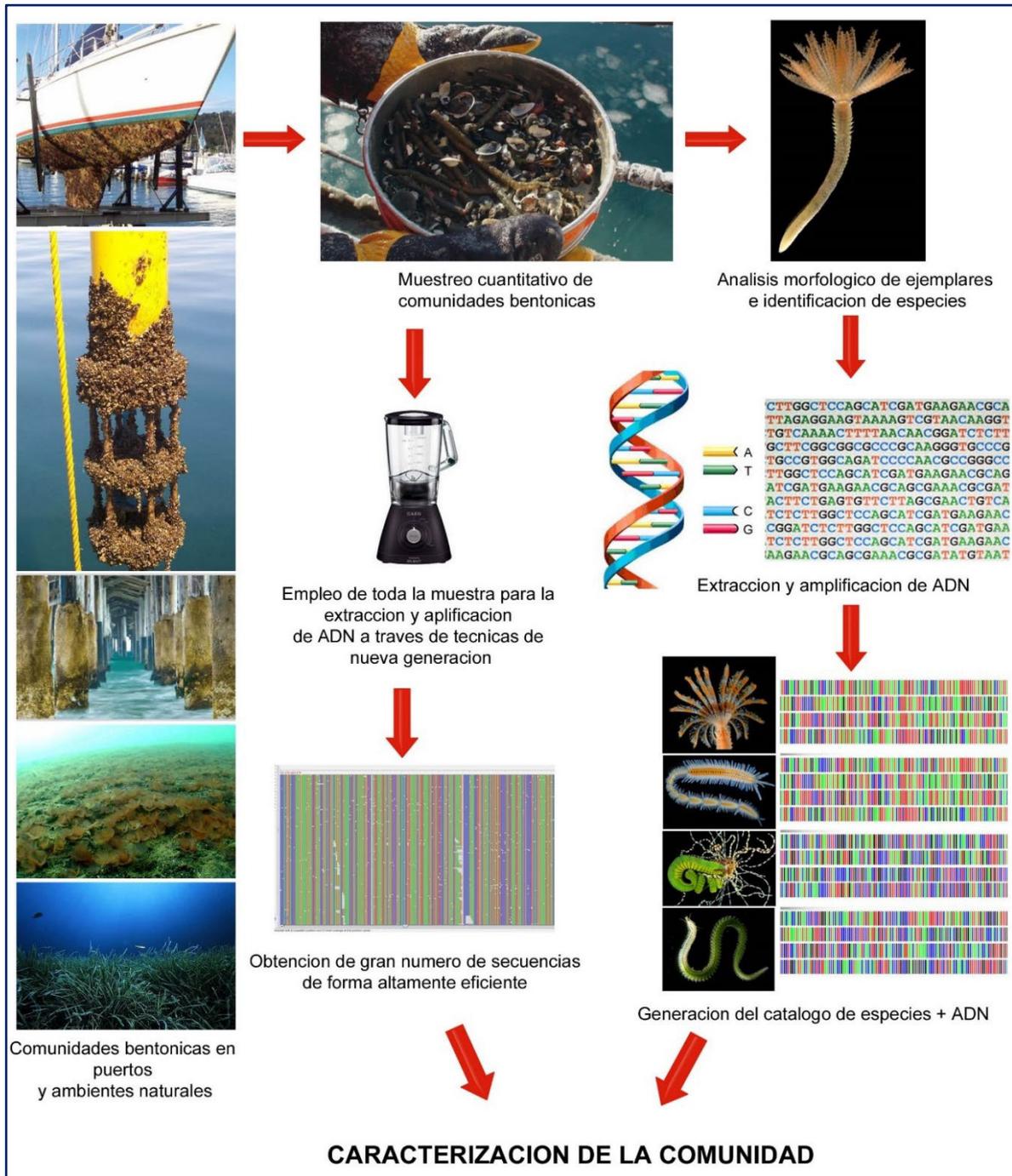


Fig. 10. Protocolo de actuación para la elaboración de catálogos de especies y su respectivo ADN y secuenciación masiva de miembros de la comunidad.

La extracción de ADN de estos ‘batidos’ se ha realizado con el kit de aislamiento de ADN de tejidos de la marca Qiagen. El ADN genómico purificado de cada una de las 48 localidades se cuantificó en un Nanodrop y 50 microlitros de una concentración 50 ng/ul se enviaron a amplificar en un sistema de microfluídica Fluidigm con los primers Ar5F-Ar5R y los productos de PCR se secuenciaron en ambas

direcciones en un sistema de secuenciación de nueva generación ILLUMINA de la plataforma Miseq. Durante el proceso de generación de las librerías de cada localidad los productos de PCR se marcaron con una secuencia de 10 pb que es específica para cada localidad. Las lecturas de la secuenciación se separaron por localidades (con tratamientos bioinformáticos) según la secuencia específica de 10 pb añadidas. Después las secuencias de los primer Ar5F y Ar5R se eliminaron de cada lectura con el programa TRIMOMATIC así como las bases de mala calidad. Finalmente, las cadenas 5'-3' (*forward*) y 3'-5' (*reverse*) se combinaron en una secuencia consenso. Las secuencias consenso se consideraron pertenecer a un mismo haplotipo (cluster de secuencias muy similares o únicas) si su divergencia era menor al 1,5% asegurándonos que no se introduce ningún haplotipo artificial creado por los errores introducidos por la polimerasa durante la PCR (quimeras). Los clusters se realizaron con el software MICCA. El análisis de los diferentes haplotipos se realizó en el programa de R PHYLOSEQ y los árboles filogenéticos se construyeron usando los programas IQTREE y BEAST. La identificación de especies basada solamente con secuencias de ADN tanto de 'DNA barcoding' como de metabarcoding se implementaron con el programa de R SPLITS. Este programa usa el algoritmo GMYC (General Mixed Coalescent Model) que delimita en un árbol ultramétrico (ramas de igual longitud debido a uso del reloj molecular) la transición entre ramas con muchas mutaciones relacionadas con la especiación con las ramas con pocas mutaciones relacionadas con la coalescencia a nivel poblacional.

## Resultados

### Objetivo 1 – Desarrollo de una metodología efectiva, precisa y rentable para la caracterización y monitoreo de las comunidades bentónicas

#### Identificación de especies con métodos de taxonomía clásica (morfología)

Se han identificado 169 especies, la gran mayoría nominales, y otros ejemplares han sido identificados hasta el nivel de género o familia debido a su estado (estadios juveniles, fragmentos sin caracteres diagnósticos a nivel de especie...). El total de taxa hallados en los ambientes bentónicos de la Bahía de Palma, incluyendo los encontrados en los fondos duros y sedimentos del puerto de Palma, Portixol, La Reserva Marina de Palma y Sa Porrassa, tanto en los muestreos de verano como de invierno suman 203. El listado de las especies ordenadas alfabéticamente y las familias a las que corresponden se detallan el Anexo I. El listado de las especies contabilizadas en cada una de las muestras puede verse en el Anexo 2 de esta memoria.

El resumen de los resultados se presenta a continuación.

En las muestras tomadas en los ambientes portuarios en verano (el día 24 de julio de 2018) se contabilizado un total de 2408 anélidos, 294 en las ocho muestras cogidas en el Portixol y 2114 en las 12 muestras cogidas en el Puerto de Palma (Tablas 3 y 4). En el Portixol se identificaron 36 especies diferentes, mientras que en el Puerto de Palma, 85.

	PORTIXOL VERANO										
	RASPADO				total	DRAGA				total	TOTAL PORTIXOL
	POR-01	POR-02	POR-03	POR-04		POD-01	POD-02	POD-03	POD-04		
# INDIVIDUOS	15	25	96	120	256	10	14	2	12	38	294
# ESPECIES	12	10	7	14	29	5	5	1	3	12	36

Tabla 3. Número de ejemplares y especies en las muestras de raspados y sedimento colectadas el 24 de julio de 2017 en el Portixol.

	PTO PALMA														
	RASPADO						total	DRAGA						total	TOTAL PTO.PALMA
	PAR-01	PAR-02	PAR-03	PAR-04	PAR-05	PAR-06		PAD-01	PAD-02	PAD-03	PAD-04	PAD-05	PAD-06		
# INDIVIDUOS	385	98	836	465	107	172	2063	2	17	9	11	9	3	51	2114
# ESPECIES	15	15	22	24	12	23	67	2	12	5	8	6	1	27	85

Tabla 4. Número de ejemplares y especies en las muestras de raspados y sedimento colectadas el 24 de julio de 2017 en el Puerto de Palma.

Los resultados, tras comparar exclusivamente la ausencia y presencia de especies de las muestras colectadas en verano en el Portixol y el Puerto de Palma, indican que el Puerto de Palma contiene



	CALA BLAVA VERANO								TOTAL CALA BLAVA
	RASPADO			total	DRAGA			total	
	CBR-01	CBR-02	CBR-03		CBD-01	CBD-02	CBD-03		
# INDIVIDUOS	164	131	107	402	35	32	45	112	<b>514</b>
# ESPECIES	41	28	19	57	12	10	6	19	<b>70</b>

Tabla 5. Número de ejemplares y especies en las muestras de raspados y sedimento colectadas el 25 de julio de 2017 en el Cala Blava.

	SA PORRASSA VERANO								TOTAL SA PORRASSA
	RASPADO			total	DRAGA			total	
	SPR-04	SPR-05	SPR-06		SPD-04	SPD-05	SPD-06	SUMA	
# INDIVIDUOS	201	144	124	469	41	54	41	136	<b>605</b>
# ESPECIES	40	31	11	52	14	27	15	41	<b>79</b>

Tabla 6. Número de ejemplares y especies en las muestras de raspados y sedimento colectadas el 25 de julio de 2017 en Sa Porrassa.

Las muestras tomadas en ambientes prístinos son, en general, más diversas aquellas que los ambientes portuarios. Así las muestras de raspados en ambientes portuarios, como se ha indicado con anterioridad presentan 12-23 especies en el Puerto de Palma y 7-14 en el Portixol mientras que en las muestras de fondos rocosos y mata de *Posidonia* en ambientes naturales se encontraron 19-41 especies en Cala Blava y 11-40 especies en Sa Porrassa. Un patrón similar se ha hallado en las muestras de sedimento, con 1-12 especies en las muestras de dragas tomadas en el Puerto de Palma, 1-5 especies en el Portixol, 6-12 en Cala Blava y 14-27 Sa Porrassa. Estos resultados coinciden con lo esperado, debido a que los ambientes naturales por regla general suelen albergar una mayor diversidad de fauna que los ambientes antropizados.

Sin embargo, comparando la diversidad de especies global, en cada localidad (puerto o espacio natural), la diversidad mayor se encuentra en el Puerto de Palma (Pto Palma= 85 especies, Portixol= 36, Cala Blava= 70, Sa Porrassa=79). Las posibles explicaciones de estos resultados son: 1) que las muestras tomadas no sean representativas de la diversidad global en cada localidad o 2) que el Puerto de Palma aúne una gran diversidad de micro hábitats con amplios rangos de características ambientales (hidrodinamismo, turbidez del agua, contenido de partículas orgánicas, contaminación) que se ve reflejada en la diversidad de especies asociadas a cada uno de estos ambientes.

Del total de especies presentes en ambientes portuarios, aproximadamente la mitad se encuentran también en los ambientes naturales, lo que indica probablemente que las especies tengan una capacidad de adaptación a las condiciones más antropizadas, o que los ambientes portuarios (especialmente los sustratos duros) no presentes unas condiciones físico-químicas muy diferentes a las de fuera de los puertos.

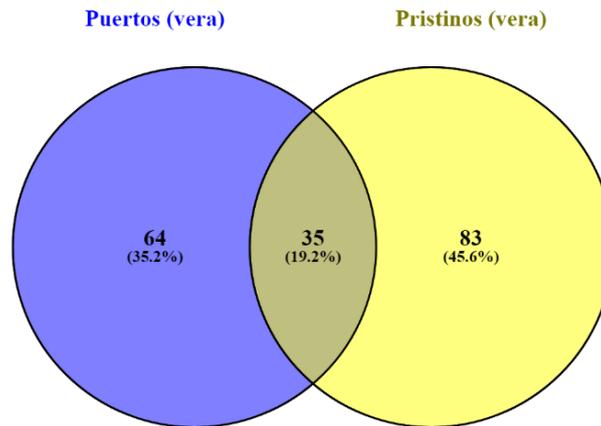


Fig. 13. Diagrama de Venn con especies exclusivas y compartidas de los ambientes portuarios y naturales de la Bahía de Palma.

Cabe destacar que las muestras con una mayor abundancia de ejemplares son los raspados de paredes y superficies artificiales dentro del puerto de Palma (con un promedio de 325 ejemplares por muestra- en comparación con 61 ejemplares en los raspados del Portixol y entre 125 y 131 en las estaciones fuera de las zonas portuarias). En cambio, las muestras de raspados de rocas y hábitats naturales en la Isla de Sa Porrassa y Cala Blava son las muestras con una mayor diversidad de especies, con un promedio de 20 especies por muestra, mientras que en las áreas portuarias la media es entre 15 y 8 especies en Palma y el Portixol respectivamente (Tabla 3). Las muestras de sedimentos, a pesar de ser más voluminosas contienen en todos los casos un menor número de especies y abundancia de las mismas, pero es en las zonas de la bahía no sometidas a impactos ambientales, en especial en los sedimentos gruesos de la isla de la Porrassa donde la diversidad y abundancia de anélidos es mayor (Tabla 3).

El análisis de las muestras colectadas en noviembre muestra una disminución generalizada en el número de ejemplares y diversidad respecto a las muestras colectadas en verano, representada en menos de la mitad de especies.

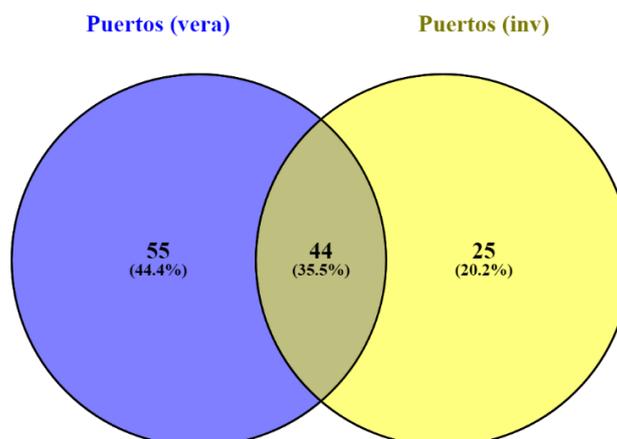


Fig. 14. Comparación de las especies halladas en ambientes portuarios en verano e invierno.

La diversidad específica y la abundancia de individuos en los ambientes duros, se mantiene más elevada que en los fondos blandos y el Puerto de Palma conserva unos valores de diversidad y abundancia más altas que el Portixol en el periodo invernal.

	PORTIXOL INVIERNO										TOTAL PORTIXOL
	RASPADO				total	DRAGA				total	
	POR-11	POR-12	POR-13	POR-14		POD-11	POD-12	POD-13	POD-14		
# INDIVIDUOS	54	68	240	385	747	1	9	2	23	35	<b>782</b>
# ESPECIES	11	7	11	12	24	1	6	1	8	13	<b>34</b>

Tabla 7. Número de ejemplares y especies en las muestras de raspados y sedimento colectadas en noviembre de 2017 en el Portixol

	PALMA INVIERNO													total	TOTAL
	RASPADO						total	DRAGA							
	PAR-11	PAR-12	PAR-13	PAR-14	PAR-15	PAR-16		PAD-11	PAD-12	PAD-13	PAD-14	PAD-15	PAD-16		
# INDIVIDUOS	22	210	106	603	117	77	1135	1	1	6	0	4	7	19	<b>1154</b>
# ESPECIES	6	13	10	15	12	19	46	1	1	4	0	3	4	10	<b>54</b>

Tabla 8. Número de ejemplares y especies en las muestras de raspados y sedimento colectadas en noviembre de 2017 en el Puerto de Palma.

Al igual que las muestras cogidas en verano, la mayor parte de las especies son exclusivas de cada ambiente (fondos blandos y duros) y puerto (Portixol o Palma), con una excepción. Los raspados en Palma y Portixol contienen un número elevado de especies comunes (Figs. 15 y 16).

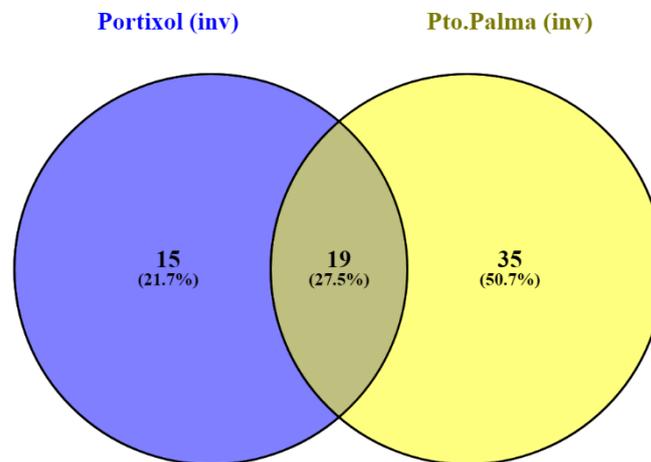


Fig. 15. Diagrama de Venn mostrando el número de especies presentes en las muestras de invierno exclusivas del Portixol, del Puerto de Palma y aquellas compartidas entre ambos puertos.

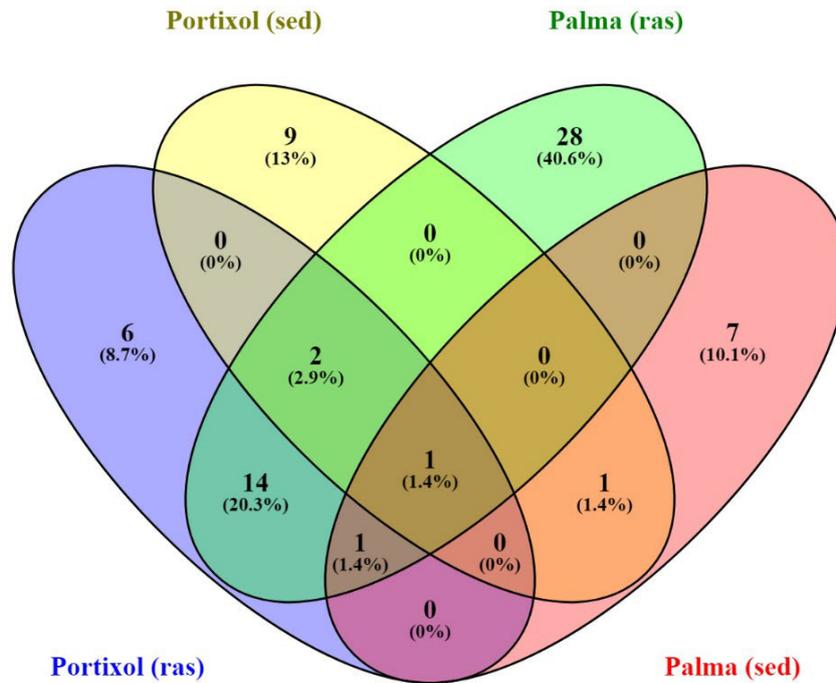


Fig. 16. Número de especies exclusivas y compartidas entre los distintos ambientes portuario, en las muestras de invierno.

Los resultados de diversidad y abundancia en las baldosas, colgadas desde julio hasta noviembre (cuatro meses) ofrecen información valiosa respecto a los patrones de colonización de sustratos duros. Así, se comprueba que en el puerto de Palma hay una colonización más efectiva y abundante, al menos en las baldosas que no están colocadas justo en la desembocadura del torrente (PABA-12). El Muelle de Poniente Sur es la localidad con mayor diversidad y abundancia de ejemplares (PABA-16).

	PORTIXOL					PALMA						
	BALDOSAS				total	BALDOSAS					total	
	PORBA-11	PORBA-12	PORBA-13	PORBA-14		PABA-11	PABA-12	PABA-13	PABA-14	PABA-15		PABA-16
# INDIVIDUOS	37	0	0	7	44	93	0	82	134	159	239	707
# ESPECIES	8	0	0	2		11	0	13	9	9	14	

Tabla 9. Número de ejemplares y especies en las baldosas colocadas por cuatro meses (julio-noviembre).

Cabe resaltar que en las baldosas aparecen especies que no se han encontrado en otras muestras de ambientes portuarios, lo que puede indicar que por alguna razón desaparecen en etapas posteriores de la sucesión, o una vez más que el muestreo no es completamente representativo y exhaustivo.

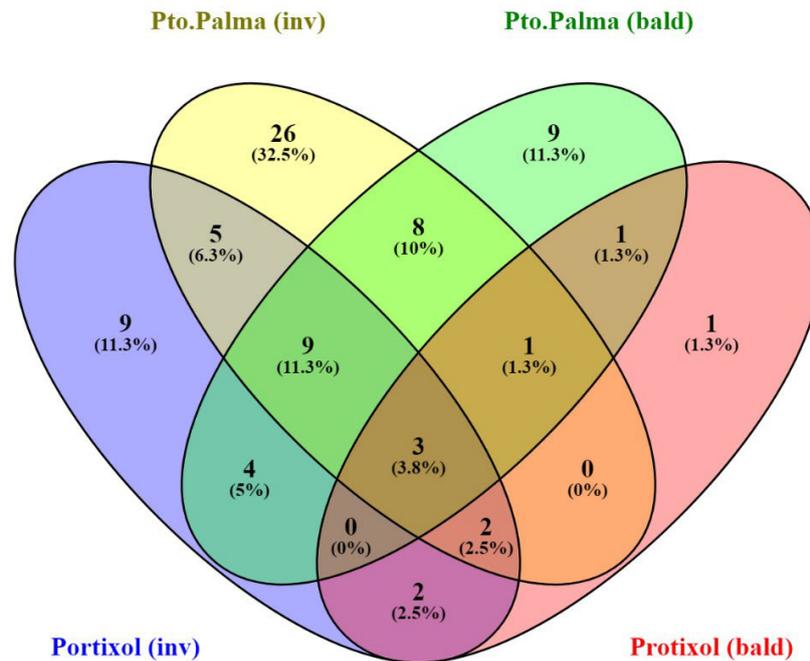


Fig. 17. Número de especies exclusivas y compartidas entre los raspados en ambientes portuario, y las baldosas colocadas durante cuatro meses.

### Amplificación del gen COI (código de barras genético)

De las 203 especies (o taxa) identificados, se ha extraído el ADN de 158 (más de 200 ejemplares) y se ha amplificado el ADN de 114 especies (165 ejemplares) para la generación de la base de datos especies-código de barras. El número de ejemplares a los que se ha extraído ADN y el número de ejemplares para los que se ha conseguido amplificar el ADN (secuencia de ADN verificada) se encuentra en el Anexo 3.

Los resultados confirman que la secuenciación del gen COI es complicado en anélidos, muy probablemente por la variabilidad genética en la región del cebador. El uso de cuatro pares de primers no ha conseguido los objetivos deseados, que era generar una base de datos completa, sino solamente el 56% de las especies identificadas con datos morfológicos.

De las especies secuenciadas, 68 ya tenían un fragmento homólogo publicado en GenBank, pero 46 representan secuencias nuevas para GenBank, lo que supone un aumento considerable de "barcodes" – con posibles futuros fines de identificación de especies y monitoreo ambiental.

Este diccionario de especies identificadas con medios morfológicos y su correspondiente código de barras genético aporta una gran valía al trabajo, ya que:

- Ayuda a comprobar las identificaciones realizadas por nosotros mismos, y también las de otros colegas que han publicado secuencias con anterioridad en GenBank.
- Permite la identificación de secuencias con especies nominales en el presente y futuros trabajos.
- Contribuye a la generación de códigos de barras para todos los organismos vivos.

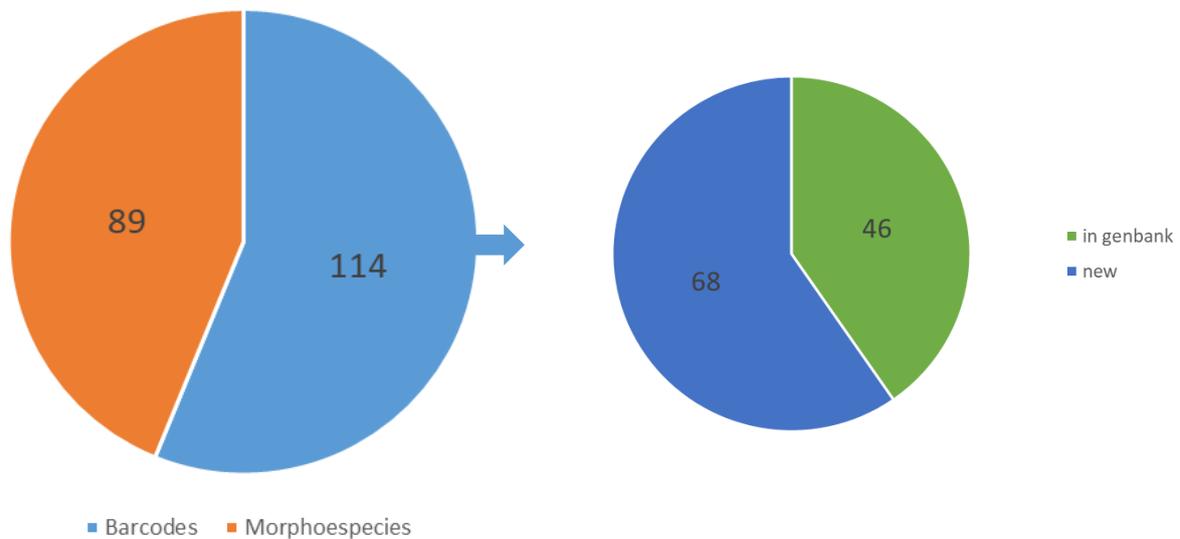


Fig. 18. Se han conseguido identificar 203 morfotipos. De estos se han conseguido amplificar secuencias de COI (barcodes) de 114 especies (el 56% de las morfoespecies), 68 de los cuales coinciden con secuencias existentes en GenBank y 46 son nuevas en esta base de datos pública.

### Secuenciación masiva de última generación (Metabarcoding)

En las 48 'batidos' de anélidos cuyo ADN se ha analizado con técnicas de secuenciación masiva se han encontrado un total de 243 secuencias diferentes (tras realizar la limpieza y filtrado de aquellas secuencias disimilares en más de un 1.5%). Estas junto con las secuencias de las morfoespecies, suman un total de 410. El árbol filogenético resultante, enraizando el árbol con Oweniidae se presenta en la Fig. 19 y el Anexo 5.

Se realizaron análisis de delimitación de especies en árbol con reloj molecular calculado en BEAST donde se estimaron un total de 175 Unidades Taxonómicas Operativas Moleculares (MOTUs) o entidades equivalentes al concepto filogenético de especies, tras aplicarle metodológicas es delimitación de especies (GMYC). Algunas de estas entidades o especies (60) no habían sido encontradas con métodos morfológicos, probablemente porque eran fragmentos no identificables, juveniles o incluso quizá especies crípticas y por tanto no identificables a simple vista (Fig. 19, ver ampliado en Anexo 6).

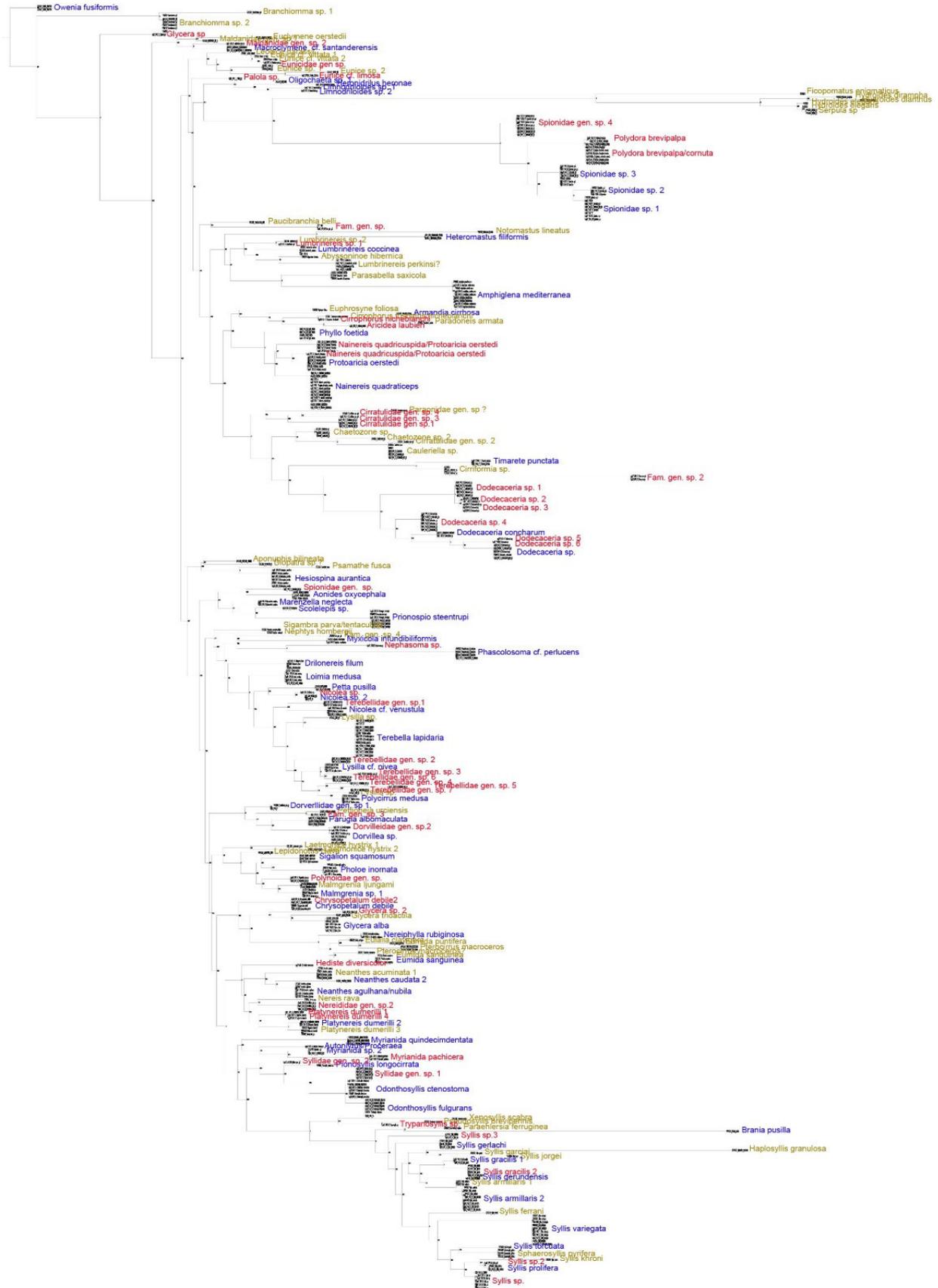


Fig. 19. Árbol filogenético (tras análisis de máxima verosimilitud, con el programa IQ) con las 419 secuencias totales.

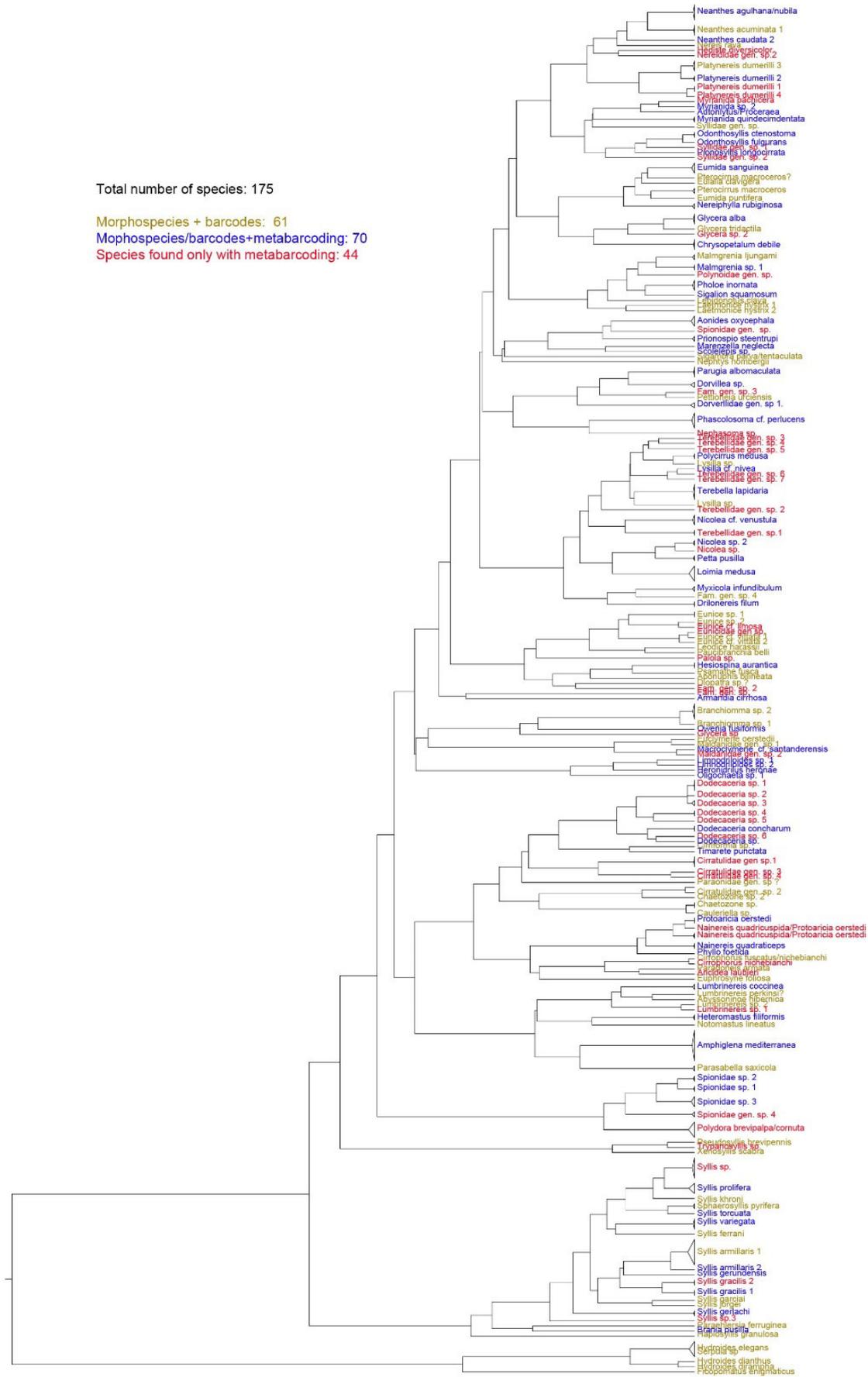


Fig. 20. Árbol filogenético (BEAST) con secuencias de individuos agrupadas en clusters representando especies (GMYC)

Algunas de las especies identificadas originalmente tras los estudios morfológicos han sido subdivididas después de aplicar métodos de delimitación de especies debido a la diversidad genética encontrada entre los distintos haplotipos, por lo que las 203 morfoespecies identificadas con anterioridad han aumentado ahora a 209. Esto sugiere que podrían tratarse de complejos de especies crípticas.

Debido a que los batidos se realizaron con fragmentos de ejemplares seleccionados y no con la muestra completa, no se puede estimar la abundancia de biomasa o ejemplares en la muestra sino solamente la diversidad específica.

## Comparación de resultados

El resultado más llamativo de este estudio procede de la comparación general de la diversidad de especies a partir de las diferentes metodologías empleadas (Fig. 21).

- El número total de especies (aquellas identificadas con métodos morfológicos y moleculares dentro de la bahía de Palma es de 269.
- Las especies identificadas con métodos tradicionales, empleando únicamente datos morfológicos, consiguieron reconocer 203 morfoespecies. Los datos puramente moleculares, a partir de la secuenciación masiva de los “batidos” consiguen hallar 122 especies, un 40% menos.
- Hay un cierto solapamiento en las especies encontradas con ambos métodos (24%)
- Los métodos morfológicos identifican un 30% de especies que no han conseguido ser secuenciadas, probablemente por discordancia de las secuencias y los primers empleados.
- Los métodos moleculares reconocen un 22% de especies que no han sido encontradas con los métodos clásicos.
- Se revela que ambas metodologías (taxonomía clásica y metabarcoding) son complementarias y que en combinación permiten determinar un mayor porcentaje de especies en las muestras que de otra forma no serían tenidas en cuenta.
- La metodología empleada para la preparación de los batidos de anélidos no refleja la proporción de individuos o biomasa de las muestras por lo tanto los resultados de metabarcoding no pueden emplearse con fines cuantitativos.

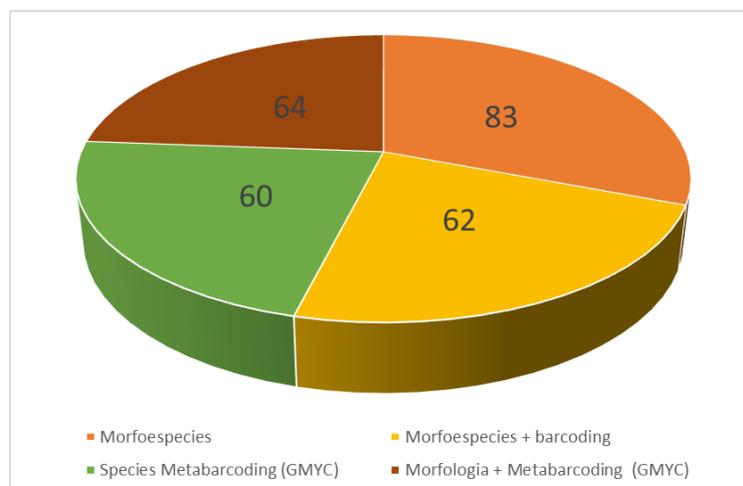


Fig. 21. Especies identificadas con distintos métodos: más de las tres cuartas partes de ejemplares se han identificado con métodos morfológicos, algo menos de la mitad con metabarcoding, y solamente un cuarto de las especies solapan entre los dos métodos.

Si comparamos la diversidad de especies en cada una de las muestras encontradas aplicando los dos métodos y agrupando a las distintas especies por familias, se observa que hay una cierta concordancia entre la riqueza e especies y composición de las comunidades (Figs 22 y 23).

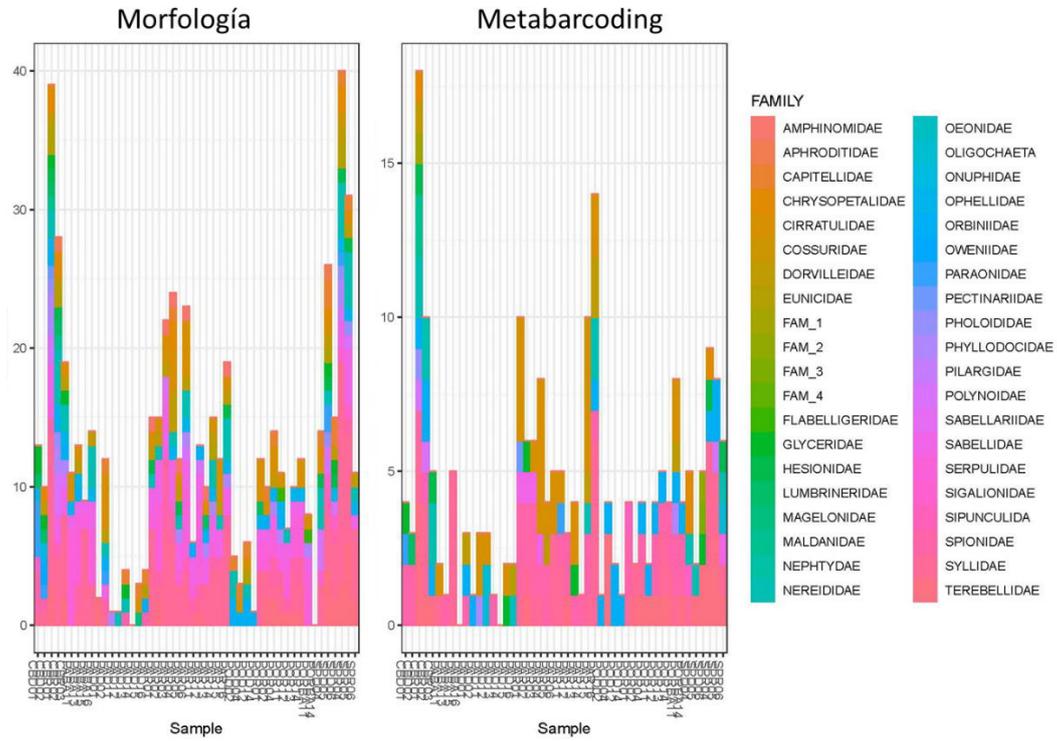


Fig. 22. Riqueza específica en las 48 muestras, empleando métodos excesivamente morfológicos (izquierda) y métodos moleculares (derecha). Las especies se han agrupado por familias, cada una con un código de color determinado.

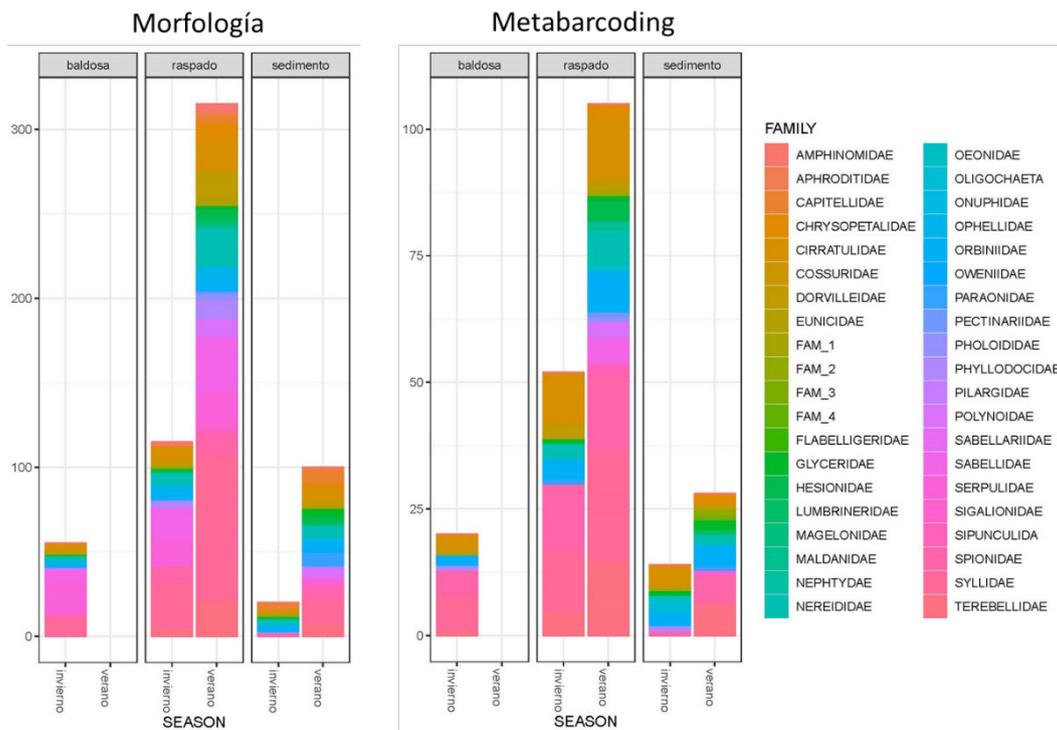


Fig. 23. Riqueza específica en las 48 muestras, empleando métodos excesivamente morfológicos (izquierda) y métodos moleculares (derecha). Las especies se han agrupado por familias, cada una con un código de color determinado.

Un factor a tener en cuenta al comparar la efectividad de ambas metodologías aplicadas para evaluar el estado de conservación y la diversidad de los ambientes portuarios de la bahía de Palma es la economía.

El trabajo de coleccionar las muestras y separar los anélidos no se ha contabilizado, dado que es igualmente necesaria para ambas metodologías. Se comienza a contabilizar el tiempo invertido en cada uno de los métodos desde que se comienzan a identificar las colecciones de anélidos con fines de identificación o los procesos de extracción de extirpación de tejido para la extracción de ADN. Así,

Para la identificación de los individuos hasta el nivel de especie se han dedicado unas 300 horas de un taxónomo cualificado y con más de 15 años de experiencia, por lo que se calcula que la remuneración es de 21,3 euros por hora. El total de la identificación de muestras es de 6.390 euros.

Se ha calculado que se ha invertido unas 41 horas en preparar las muestras (batidos) de gusanos, en extraer el ADN y en realizar el filtrado de muestras, análisis de calidad, etc. Teniendo en cuenta que ha sido un científico titulado con más de 20 años de experiencia en estos trabajos, se ha calculado que la hora de trabajo tiene que ser remunerada a 21,3 euros, por lo que el coste de este trabajo es de 873. La secuenciación de ADN se ha externalizado, pagando a Fluidigm 5000 euros por ello, lo que suma un total de 5.873 euros.

De esto se concluye que quizá, puestos a elegir entre ambas metodológicas, los métodos moleculares son ligeramente más económicos que los morfológicos. Esto es si damos por hecho que se tiene la infraestructura mínima para poder llevar a cabo las tareas necesarias, medios humanos y que el número de muestras es el considerado aquí. No se ha tenido en cuenta el coste de generación de la librería o diccionario de especies-barcodes.

## Objetivo 2 - Diferencias en biodiversidad entre las comunidades bentónicas litorales marinos prístinos y ambientes antropizados

Se espera que los ambientes naturales sean más diversos (en cuanto a número de especies) que los ambientes degradados, debido a que, por lo general, presentan las características ideales para que los organismos se desarrollen además de una mayor complejidad de microambientes y relaciones biológicas. Los ambientes degradados, sufren en cambio una pérdida de diversidad, aunque pueden proliferar las especies oportunistas y aparecen en grandes abundancias.

En la Bahía de Palma, los ambientes considerados como prístinos o naturales por ser parte de reservas marinas, están afectados por una presión turística en alza. Las aguas más o menos tratadas procedentes de los emisarios y torrentes próximos y la actividad turística costera, afectan a la calidad de las aguas y a las comunidades biológicas de la zona. Por lo tanto, es interesante evaluar su estado actual, a través de la composición de sus comunidades bentónicas.

Las zonas portuarias de Palma (el Puerto de Palma y el Portixol, se consideran un puerto de mediano y pequeño tamaño, respectivamente) pero dónde se producen o pueden producir alteraciones en el medio, como consecuencias directas o indirectas de las actividades que en ellos se lleva a cabo. Entre estas alteraciones se incluyen las producidas en el agua (derrames y descargas de petróleo, liberación de contaminantes, cambios en la composición química y circulación del agua), la alteración de los fondos (construcción de estructuras artificiales, operaciones de dragado y eliminación de materiales, etc.), alteraciones en el medio terrestre y otros impactos adicionales la descargas sistemas de tratamiento de agua residual de efluentes industriales, efluentes domésticos, o aguas de escorrentía, o la introducción y establecimiento de especies exóticas.

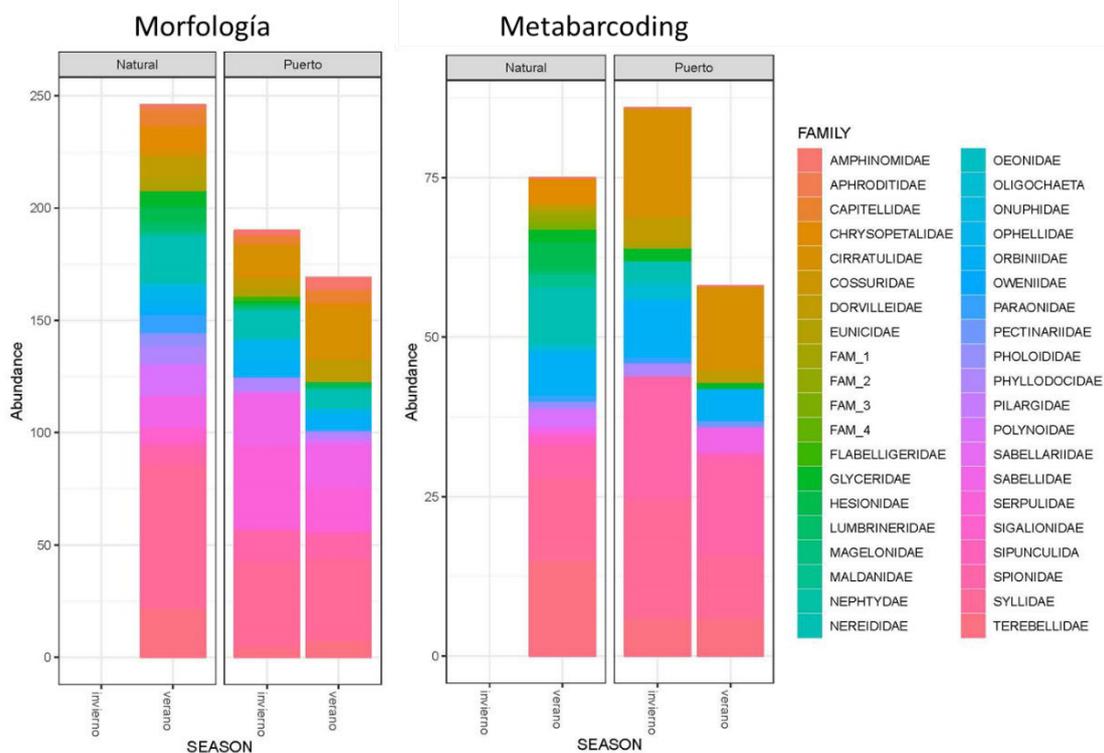


Fig. 24. Diversidad específica en las muestras tomadas en ambientes naturales y portuarios, en los meses de julio y noviembre de 2017 y analizados con métodos morfológicos (izquierda) y moleculares (derecha).

Los primeros resultados absolutos y comparativos, tras la identificación de especies con métodos morfológicos y cuantificación de su abundancia en cada una de las muestras tomadas en Cala Blava, Sa Porrassa, Puerto de Palma y el Portixol se han presentado con anterioridad.

En resumen, de las 182 especies identificadas en el muestreo realizado en el verano, el 65% fueron halladas en ambientes naturales, 54% en ambientes portuarios, siendo un 35% del total las compartidas en ambos ambientes.

Los resultados comparando la composición específica de las comunidades dentro y fuera de los puertos, por estaciones y en función de las dos metodologías empleadas (morfológica y métodos moleculares) se presentan a continuación.

En este caso no hay una correlación entre la diversidad encontrada con métodos morfológicos y moleculares. La diversidad no solo es mayor en el primer caso, sino que además es mayor en las muestras colectadas en invierno, según los datos recabados con metabarcoding, mientras que los métodos de taxonomía clásica apuntan a que son los ambientes naturales lo que poseen una diversidad mayor, proporcionalmente (Fig. 24).

Con el fin de comparar los ambientes sometidos a distinto grado de perturbación en la Bahía de Palma, se ha calculado un indicador biótico que mide el estado ecológico de los fondos marinos submareales (AMBI, Borja et al 2000). Este indicador se basa en la composición específica de las comunidades bentónicas marinas y en la abundancia relativa de las especies, la cual responde a los cambios en las ecológicos, del I al V, que representan diferentes grados de tolerancia a la alteración del medio, desde más sensibles a la alteración a oportunistas. AMBI es aparentemente insensible a la variabilidad estacional (en ausencia de impactos externos) e independiente del tamaño de muestra.

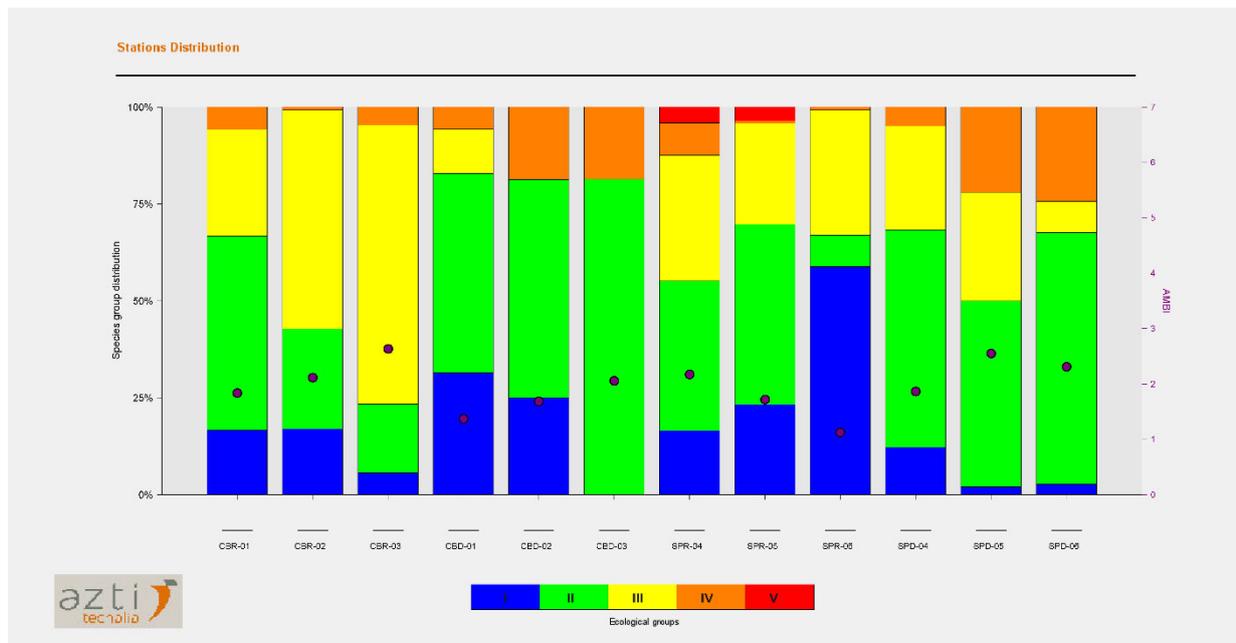


Fig. 25 Resultados del cálculo del índice biótico AMBI en las muestras colectadas fuera de los ambientes portuarios: en Cala Blava (CB) y Sa Porrassa (SP). La última letra en el nombre de las muestras corresponde a el sustrato donde fueron colectadas (D- draga y R-raspado)

Los resultados del índice biótico AMBI revelan que en general, las muestras colectadas en ambientes naturales están ligeramente alteradas, con la excepción de SPR06 que no está alterada. El índice de diversidad de estas muestras (índice de Shannon) varían desde 1.2 hasta 4.43. Recalculando los índices con un análisis multivariante y se llega a un resultado diferente, donde el estado las comunidades ‘naturales’ varían desde buenas (en los raspados CBR-02 y CBR- 03 en Cala Blava, o los sedimentos SPD-04, 05 y 06 de Sa Porrassa) hasta pobres en CBD-03 (Cala Blava).

MUESTRA	AMBI	DIVERSIDAD	RIQUEZA	M-AMBI	STATUS
CBR-01	1.813	4.43	40	0.9214	High
CBR-02	2.1169	3.56	27	0.71094	Good
CBR-03	2.636	2.717	19	0.54403	Good
CBD-01	1.371	2.722	12	0.52864	Moderate
CBD-02	1.734	2.91	10	0.50686	Moderate
CBD-03	2.0455	1.219	6	0.32438	Poor
SPR-04	2.1727	4.1721	40	0.88639	High
SPR-05	1.722	3.89	31	0.79367	High
SPR-06	1.125	2.1298	11	0.48401	Moderate
SPD-04	1.866	3.44	14	0.58194	Good
SPD-05	2.588	4.0671	25	0.70952	Good
SPD-06	2.311	3.32	15	0.56374	Good

Tabla 10. Resultados de los cálculos de la diversidad, riqueza y los índices AMBI y M-AMBI en las muestras colectadas en Cala Blava y Sa Porrassa.

Las muestras tomadas en ambientes portuarios reflejan, aparentemente, un estado de conservación mejor al esperado. El índice AMBI en el Portixol indica que las comunidades de fondos duros (POR) no están alteradas o lo están mínimamente, mientras que los sedimentos están por lo general más alterados, especialmente la localidad 3 y 4.

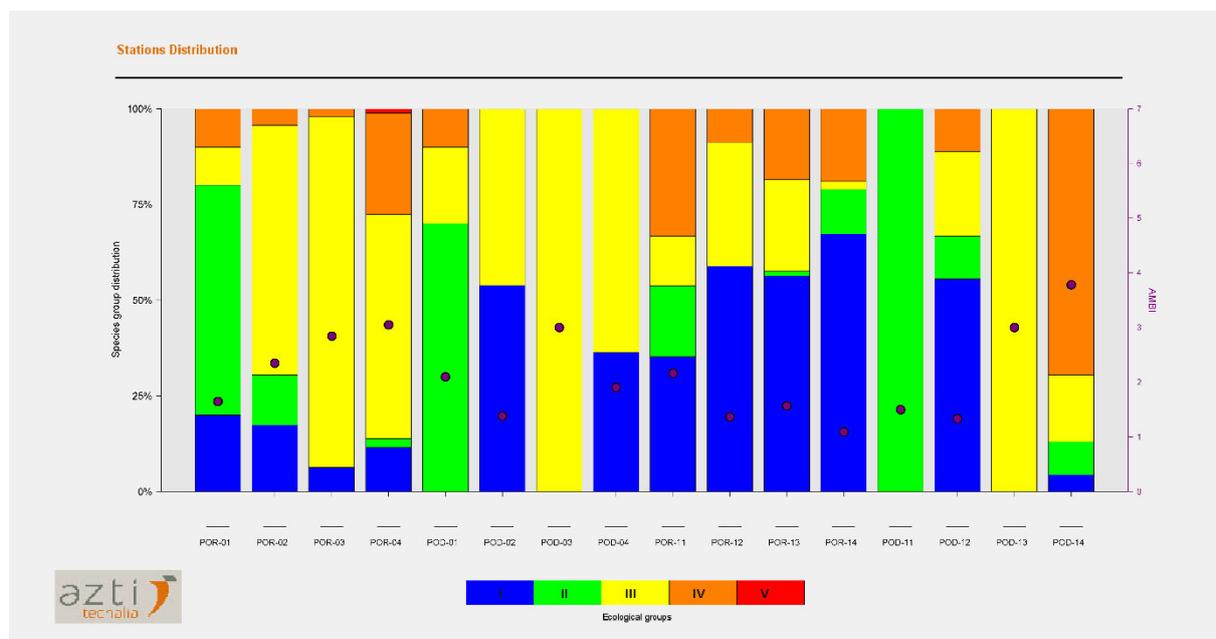


Fig. 26 Resultados del cálculo del índice biótico AMBI en las muestras portuarias del Portixol. La ultima letra en el nombre de las muestras corresponde a el sustrato donde fueron colectadas (D- draga y R-raspado)

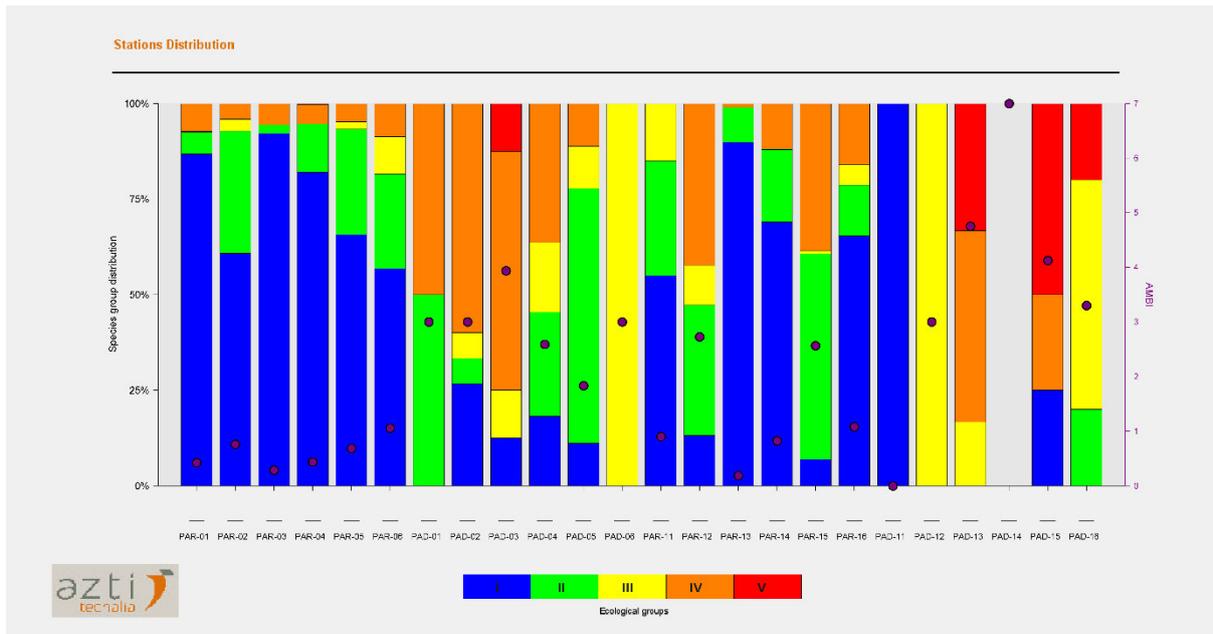


Fig. 27. Resultados del cálculo del índice biótico AMBI en las muestras tomadas en el Puerto de Palma. La ultima letra en el nombre de las muestras corresponde a el sustrato donde fueron colectadas (D- draga y R-raspado)

En las muestras colectadas dentro del Puerto de Palma se pone de manifiesto que el estado de conservación de los sustratos duros es mejor que los sedimentos, que se encuentran en algunos cados moderadamente o extremadamente alterados (p. ej. PAD-02, PAD-03, PAD-06, PAD-12, PAD-13, PAD-14, PAD-15 y PAD-16).

El cálculo de M-AMBI, permite afinar más en el conocimiento del estado de conservación de las comunidades y clasifica como bueno o moderada el estado de conservación de las comunidades de fondos duros del puerto de Palma. Los sustratos duros en el Portixol se encuentran en un estado algo más deteriorado, con la mayoría de las muestras consideradas como en estado moderado. Las muestras de sedimento tienen un estado moderado, pobre o bajo.

MUESTRA	AMBI	DIVERSIDAD	RIQUEZA	M-AMBI	STATUS
POR-01	2.1429	3.46	12	0.55139	Good
POR-02	2.348	2.60	10	0.45724	Moderate
POR-03	2.84	0.89	7	0.27455	Poor
POR-04	3.25	3.10	14	0.49652	Moderate
POR-11	2.1667	2.72	11	0.48433	Moderate
POR-12	1.36	2.1351	7	0.43369	Moderate
POR-13	1.56	2.28	10	0.4659	Moderate
POR-14	1.0909	1.78	12	0.46861	Moderate
POD-01	2.10	1.961	5	0.36862	Poor
POD-02	1.38	1.87	5	0.39262	Moderate
POD-03	3	0	1	0.13974	Bad
POD-04	2.125	1.28	3	0.29547	Poor
POD-11	1.50	0	1	0.20457	Poor
POD-12	1.33	2.281	6	0.43626	Moderate
POD-13	3.00	0	1	0.13974	Bad
POD-14	3.78	2.27	8	0.34986	Poor

PAR-01	0.42049	1.73	15	0.52386	Moderate
PAR-02	0.75773	2.80	15	0.59124	Good
PAR-03	0.28652	1.39	22	0.57425	Good
PAR-04	0.43722	1.85	24	0.62306	Good
PAR-05	0.68571	1.80	12	0.48819	Moderate
PAR-06	1.0901	3.326	23	0.69757	Good
PAR-11	0.81818	2.27	6	0.45735	Moderate
PAR-12	636651	1320749	13	0.48277	Moderate
PAR-13	0.19697	1687788	10	0.47759	Moderate
PAR-14	0.82338	2.22	15	0.54447	Good
PAR-15	2.36	2.55	12	0.45228	Moderate
PAR-16	0.82	3.1241	19	0.64236	Good
PAD-01	3.00	1.00	2	0.22616	Poor
PAD-02	3.00	3.45	12	0.51421	Moderate
PAD-03	3.93	1.88	5	0.28301	Poor
PAD-04	2.59	2.85	8	0.44511	Moderate
PAD-05	1.83	2.281	6	0.41465	Moderate
PAD-06	3.00	0.00	1	0.13974	Bad
PAD-11	0	0	1	0.26941	Poor
PAD-12	3	0	1	0.13974	Bad
PAD-13	4.75	1.92	4	0.24076	Poor
PAD-14	7	0	0	0.043226	Bad
PAD-15	4.125	1.50	3	0.22577	Poor
PAD-16	3.30	1.50	4	0.29764	Poor

Tabla 11. Resultados de los cálculos de la diversidad, riqueza y los índices AMBI y M-AMBI en las muestras colectadas en el Portixol y el Puerto de Palma.

La representación gráfica del índice M-AMBI para la totalidad de las muestras puede verse en la Fig. 28, representado los valores de la tabla 11. Las tres muestras que reflejan un elevado grado de conservación fueron tomadas en Sa Porrassa y Cala Blava (en azul). Las muestras con un grado de conservación bueno son el resto de las muestras colectadas en ambientes naturales (menos una), y en los raspados de las zonas más abiertas y expuestas de los puertos, incluso en los muelles donde atracan los ferris (muestras PAR-06 y PAR-16).

Las muestras que muestran una degradación sustancial en la comunidad biológica son aquellas tomadas en los sedimentos de los puertos, con algunas excepciones. Las alteraciones más graves se han medido cerca de la desembocadura de los torrentes y en las zonas más protegidas.

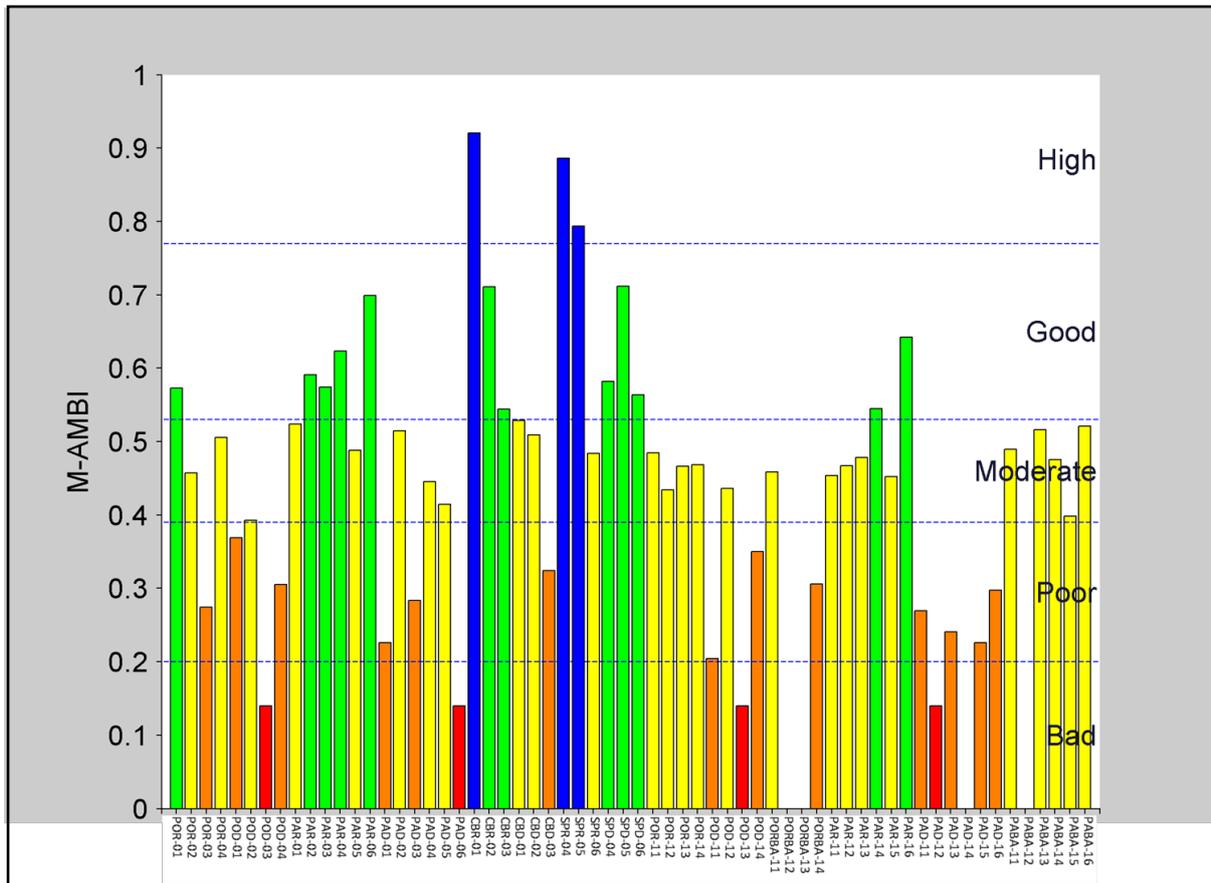


Fig. 28. Cálculo del índice M-AMBI para todas las muestras tomadas en este estudio.

### Objetivo 3 – Detección de especies invasoras en la Bahía de Palma y evaluación de su impacto

Las especies introducidas son aquellas que habitan fuera de su rango de distribución nativo y que han sido translocadas intencionada o no intencionadamente en relación a actividades humanas y no por causas de dispersión natural (Olenin et al. 2010). Las especies introducidas pueden convertirse en invasoras en la nueva localidad y ambiente y de esta manera podrían desplazar especies nativas y reducir la biodiversidad, modificando así la estructura de la comunidad, las propiedades físicas del hábitat, las redes alimentarias y la función del ecosistema. En casos extremos, este proceso puede dar lugar a pérdidas financieras debido a la disminución de la pesca y daños irreversibles a los buques, tuberías de agua, muelles y otras infraestructuras portuarias y de canalización debido a la obstrucción que pueden ocasionar en ellas algunos de estos organismos (Molnar et al. 200, Byers et al. 2012).

Una de las principales causas de la pérdida de la biodiversidad en el mundo son las especies invasoras y suponen la primera amenaza para la biodiversidad en territorios insulares y la segunda en territorios continentales.

En el Catálogo de Especies Españolas Invasoras hay solo un anélido marino, *Ficopomatus enigmaticus*, especie de origen incierto pero introducido en diferentes lugares del mundo. En España está citado en las aguas del Atlántico y también en Cataluña y Andalucía. En el Catàleg d'espècies exòtiques invasores de Balears aparece como potencialmente invasora.

A lo largo del presente proyecto se ha encontrado esta especie, *Ficopomatus enigmaticus*, en tres de los sitios de muestreo del Portixol y en uno del Puerto de Palma. En estas cuatro localidades la presencia ha sido verificada en las muestras tomadas en verano e invierno, en sustratos duros, incluidas algunas de las baldosas que se colocaron durante cuatro meses. Esta especie aparece en abundancias de hasta 83 ejemplares por muestra y en la muestra de baldosas donde han aparecido, el número de individuos contabilizado es de 25.



Fig. 29. *Ficopomatus enigmaticus*, una especie citada como invasora en los catálogos europeos, español y de las islas Baleares y presente en el Portixol y el Puerto de Palma.

Además de esta especie, hay otras especies emparentadas, de las familias de los serpúlidos (provistas de un tubo calcáreo donde se protegen) que aunque no estén dentro del Catálogo de Especies Españolas Invasoras han sido consideradas como invasoras en otros lugares europeos. Estas son las especies pertenecientes al género *Hydroides*, como *H. dianthus*, *H. dirampha* y *H. elegans*. Estas especies son comunes y abundantes en las muestras de raspados, especialmente en el Puerto de Palma.

Existen otras especies no citadas en el Catálogo Español de Especies Invasoras que deberían de ser estudiadas en detalle para comprobar si están presentes en nuestras costas y si realmente suponen una amenaza para las comunidades nativas, ya que ya han sido sugeridas como especies introducidas o criptogénicas en aguas europeas o porque se sospecha que puede tratarse de especies translocadas. Este es el caso de *Branchiomma luctuosum*, *Polidora cornuta* y *Pseudopolydora paucibranchiata*, especies que parece haber sido halladas (hay que comprobar en detalle dicha identificación) en este estudio dentro de los ambientes portuarios de Palma y el Portixol.

## Conclusiones

---

Este proyecto representa el primer estudio en Baleares y el levante español que evalúa la precisión, y efectividad de la diversidad y composición de especies entre métodos de secuenciación masiva (metabarcoding) en comparación con la identificación de especies de manera tradicional (empleando datos morfológicos) en comunidades bentónicas marinas.

El proyecto se planteó como un estudio piloto, de un año de duración. El diseño de muestreo no se considera exhaustivo (se muestreo un único día de verano y de invierno, no se tomaron replicas y el número de muestras quizá no es representativo de la diversidad de comunidades presentes en los ambientes portuarios ni es sus inmediaciones). Pese a estas limitaciones, los resultados presentan un interés excepcional desde distintos puntos de vista:

- **Metodológico:** Pone a prueba una metodología de reciente implementación, metabarcoding, que apunta con gran potencial para el monitoreo de comunidades acuáticas.
- **Aportación de herramientas de libre acceso:** Se incrementa considerablemente, el número de secuencias de COI en bases de datos públicas (GenBank). Todos los ejemplares identificados en el proyecto se depositan en el Museu Balear de Ciències Naturals de Sóller, disponibles para investigadores presentes y futuros.
- **Faunística:** Se han encontrado especies que representan nuevas citas para las aguas de Baleares o el levante Español.
- **Taxonómica:** Se revela que hay taxa que realmente representan un complejo de especies y otras que requieren un estudio minucioso para resolver su verdadera identidad
- **Ecológico:** Se comparan los ambientes portuarios con otros considerados como naturales, fuera de los puertos, que incluyen la reserva marina de la Bahía de Palma. Se investiga la presencia de especies introducidas o invasoras.

En cuanto a los objetivos concretos del proyecto:

### 1 ¿Es la metodología basada en el análisis del ADN de los organismos precisa y rentable para la caracterización y monitoreo de las comunidades marinas?

- La identificación con medios tradicionales, es una técnica efectiva y precisa para evaluar la diversidad de anélidos bentónicos. Se han identificado de esta forma el 77% del total de las especies de este proyecto. Aquellas no identificadas pueden responder a fragmentos, juveniles o especies crípticas.
- Los métodos de secuenciación masiva (metabarcoding) permitieron identificar el 46% del total de especies. Para poder secuenciar el ADN que aquellas no identificadas con este medio es necesario encontrar primers adecuados y probablemente específicos de distintos grupos taxonómicos.
- Se evidencia que la identificación de la fauna de anélidos con medios tradicionales (morfología) requiere un conocimiento taxonómico especializado y una gran dedicación (unas de 300 horas de trabajo para la identificación de 62 muestras).
- Se pone de manifiesto, así mismo, que la secuenciación masiva requiere un conocimiento de las técnicas genéticas y de los análisis bioinformáticas posteriores para la obtención

de resultados de buena calidad. Así mismo demanda de la existencia de una librería que permita la asignación de los códigos de barras genéticos con especies nominales. La dedicación en tiempo de laboratorio (son tener en cuenta la generación de la librería de barcoding) fue de unas 40 horas pero el coste de la secuenciación (externa) es costosa por lo que las diferencias económicas entre ambas metodologías no son elevadas, siento algo más barato el metabarcoding.

- La secuenciación del fragmento de ADN mitocondrial COI con método Sanger (barcoding) resulta ser más complicada de lo anticipado en este grupo. Se han obtenido con éxito 'barcodes' para el 57% de las especies. El 30% de estos son nuevas secuencias en GenBank, lo que supone un incremento considerable de especies en esta base de datos pública.

## 2 ¿Cuáles son las diferencias en biodiversidad entre las comunidades bentónicas litorales marinos prístinos y ambientes antropizados?

- Teniendo en cuenta que es presente trabajo se trata de un estudio piloto con un muestreo no exhaustivo, llama la atención la diversidad de anélidos encontradas en la Bahía de Palma, incluyendo los ambientes portuarios – un total de 269 especies.
- Los resultados obtenidos según las diferentes metodologías no son congruentes a la hora de determinar cuáles son las comunidades más ricas es especies. Métodos morfológicos encuentran que los ambientes naturales son mas diversos mientras que los métodos moleculares indican que son los sustratos duros en puertos, y en invierno las muestras con una mayor riqueza específica. Se interpretan os resultados morfológicos como los más plausibles.
- Los sustratos duros portuarios, albergan una mayor diversidad de especies y abundancia de individuos que los sustratos blandos. La razón es que los sedimentos pueden estar más degradados y contaminados que el agua.
- Además, el cálculo de los índices de diversidad (Shannon) y de estado de conservación de los distintos ambientes y localidades encuentran que algunos lugares muestreados dentro de los puertos se encuentran en un estado de conservación bueno o moderado. Este es el caso se los sustratos duros localizados en zonas abiertas y expuestas.

## 3 ¿Existen especies invasoras en la Bahía de Palma, son estas detectables, están establecidas en las zonas portuarias o han llegado a colonizar ambientes naturales?

- Entre las especies asociadas a puertos se encuentran algunas ya listadas como especies invasoras en el Catalogo Español de Especies Invasoras. Es especialmente abundante la presencia de *Ficopomatus enigmaticus* en el Portixol, con una abundancia de unos 250 individuos por metro cuadrado. Especie no citada en Palma hasta la fecha.
- Se han detectado, además, otras especies introducidas como *Hydroides dianthus*, *H. diramphus*, *H. elegans*, y *Branchiomma* spp.
- Ninguna de las especies consideradas como especies invasoras se han encontrado en los ambientes naturales de la Bahía de Palma.

## REFERENCIAS

---

- Aylagas et al. 2014. Environmental Status Assessment Using DNA Metabarcoding: Towards a Genetics Based Marine Biotic Index. PLoS ONE 9: e90529.
- BARNICH, R. & D. FIEGE. 2000a. Revision of the Mediterranean species of Harmothoe Kinberg, 1856 and Lagisca Malmgren, 1865 (Polychaeta: Polynoidea: Polynoinae) with descriptions of a new genus and a new species. Journal of Natural History, 34: 1889-1938.
- Blaxter. 2003. Molecular systematics-counting angels with DNA. Nature 421: 122–124.
- Borja, A., J. Franco, V. Pérez, 2000. A marine biotic index to establish the ecological quality of soft bottom benthos within European estuarine and coastal environments. Marine Pollution Bulletin, 40(12): 1100-1114.
- Boudouresque, C.F., 1999. Introduced species in the Mediterranean: routes, kinetics and consequences. In: Proceedings of the Workshop on Invasive Caulerpa in the Mediterranean, Heraklion, Crete, Greece, March 18–20, 1998. UNEP, Athens, Greece, pp. 51–72.
- Bourlat et al. 2013. Genomics in marine monitoring: New opportunities for assessing marine health status. Mar. Pollut. Bull. 74: 19–31.
- Byers JE, Gribben PE, Yeager C, Sotka EE. 2012 Impacts of an abundant introduced ecosystem engineer within mudflats of the southeastern US coast. Biol Invasions.;12:2587–600.
- Campoy, A. & G. San Martín. 1980. Pettiboneia urciensis sp. n.: un nouveau Dorvilleidae (Polychètes: Errantes) de la Méditerranée. Cahiers de Biologie Marine 21: 201-207.
- Capa et al. 2013. The Australian feather-duster worm Laonome calida Capa, 2007 (Polychaeta) introduced into European inland waters? BIC. 3: 1–11.
- Carlton. 1985. Transoceanic and interoceanic dispersal of coastal marine organisms: the biology of ballast water. Ocean. Mar. Biol. 23: 313–371.
- Çinar. 2013. Alien polychaete species worldwide: current status and their impacts. JMBA, UK. 93: 1257–1278.
- Dean. 2008. The use of polychaetes (Annelida) as indicator species of marine pollution: a review. Rev. Biol. Trop. 56: 11-38.
- European Union. 2011. The EU Diversity Strategy to 2020. Publications Office of the European Union.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular marine biology and biotechnology 3:294–299.
- Gil, J. C.F. 2011. The European Fauna of Annelida Polychaeta. Doutoramento em Biologia. (Especialidade: Biodiversidade). Universidade de Lisboa. 1640 pp.
- Hebert\*PDN, et al. , 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proc. R. Soc. Lond. B 270, 313–321
- Hirai et al. 2014. A metagenetic approach for revealing community structure of marine planktonic copepods. Mol. Eco. Res. (online view)

- Hutchings. 1998. Biodiversity and functioning of polychaetes in benthic sediments. *Bio.Cons.* 7:1133–45.
- Mills et al. 1993. The keystone-species concept in ecology and conservation. *BioScience* 43: 219–224.
- Molnar JL, Gamboa RL, Revenga C, Spalding MD. 2008 Assessing the global threat of invasive species to marine biodiversity. *Front Ecol Environ.*;6:485–92.
- Noble-James, T., Jesus, A. & McBreen, F. 2017. Monitoring guidance for marine benthic habitats. JNCC Report No. 598. JNCC, Peterborough.
- Occhipinti-Ambrogi, A., 1994. Caracteristiques genetiques et capacite d'invasion chez les invertebres dans les eaux littorales et les lagunes mediterraneennes. In: Boudouresque, C.F., Briand, F., Nolan, C. (Eds.), *Introduced Species in European Coastal Waters*. European Commission, Luxembourg, pp. 56–62.
- Olenin S, Alemany F, Cardoso C, Gollasch S, Gouletquer P, Lehtiniemi, M, McCollin T, Minchin D, Miossec L, Occhipinti-Ambrogi A, Ojaveer H, Jensen KR, Stankiewicz M, Wallentinus I, Aleksandrov B. 2010 Marine strategy framework directive—task group 2 report. Non-indigenous species. EUR24342EN. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities.
- Oliveros, J.C. (2007-2015) Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>
- Olsgard. 2003. Polychaetes as surrogates for marine biodiversity: lower taxonomic resolution and indicator groups. *Bio. Cons.* 12: 1033–49.
- Parapar, J. Alós, C., Núñez, J. Moreira, J. Lopez, E., Aguirrezabalaga, F. Besteiro, C y Martinez, Al. 2012. *Annelida, Polychaeta III: Fauna ibérica*, vol. 36. Ramos, M.A. et al. (Eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales. CSIC. Madrid: 416 pp.
- Parapar, J. Moreira, J. Núñez, J. Barnich, R, Brito, M del C., Fiege, D., Cappaccioni-Azzati, R. Y El Haddad, M. 2015. *Annelida, Polychaeta IV: Fauna ibérica*, vol. 41. Ramos, M.A. et al. (Eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales. CSIC. Madrid: 416 pp.
- Pocklington & Wells. 1992. Polychaetes: key taxa for marine environmental quality monitoring. *Mar. Poll. Bull.* 24: 593–598.
- Pons et al. 2006. Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Syst. Biol.* 55: 595–609.
- Ribera, M.A., Boudouresque, C.F., 1995. Introduced marine plants, with special reference to macroalgae: mechanisms and impact. In: Round, F.E., Chapman, D.J. (Eds.), *Progress in Phycological Research*, vol. 11. Biopress Ltd Publ., pp. 187–268.
- San Martín, G. 2003. *Annelida, Polychaeta II: Syllidae*. Fauna ibérica, vol. 21. Ramos, M.A. et al. (Eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales. CSIC. Madrid: 554 pp.
- Sites & Marshall. 2003. Delimiting species: a renaissance issue in systematic biology. *Trend.Ecol.Evol.* 18: 462–470.
- Sogin et al. 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored 'rare biosphere'. *Proc. Nat.Acad. Sci. USA* 103: 12115–12120.

Sparks-McConkey. 2001. Effects on the ecological integrity of a soft-bottom habitat from a trawling disturbance. *Hydrobiologia* 456: 73–85

Viéitez, J. M., Alós, C., Parapar, J., Besteiro, C., Moreira, J., Núñez, J., Laborda, A. y San Martín, G. 2004. Fauna ibérica, vol. 25. Ramos, M.A. et al. (Eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales. CSIC. Madrid: 530 pp.

Wiens & Penkrot. 2002. Delimiting species using DNA and morphological variation and discordant species limits in spiny lizards. *Syst. Biol.* 51: 69–91.

Zibrowius, H., 1991. Ongoing modification of the Mediterranean marine fauna and flora by the establishment of exotic species. *Mesogee* 51, 83–107.

ANEXO 1

FAMILIA	ESPECIE	AUTOR Y AÑO DE DESCRIPCIÓN
AMPHINOMIDAE		
	<i>Euphrosine foliosa</i> <i>Hipponoe</i> sp.	Audouin & H Milne Edwards, 1833
APHRODITIDAE		
	<i>Laetmonice hystrix</i>	(Savigny in Lamarck, 1818)
CAPITELLIDAE		
	<i>Capitella</i> sp. Capitellidae gen. sp. <i>Heteromastus filiformis</i> "Leiochrides australis" "Leiochrides fauveli" <i>Notomastus latericeus</i> <i>Notomastus lineatus</i> <i>Notomastus</i> sp.	(Claparède, 1864) Augener, 1914 Sars, 1851 Claparède, 1869
CHRYSOPETALIDAE		
	<i>Chrysopetalum debile</i> <i>Paleanotus chrysolepis</i>	(Grube, 1855) Schmarda, 1861
CIRRATULIDAE		
	<i>Aphelochaeta marioni</i> <i>Cauleriella parva</i> <i>Cauleriella</i> sp. <i>Chaetozone vivipara</i> <i>Chaetozone gibber</i> <i>Chaetozone</i> sp.  <i>Cirratulidae</i> gen.sp. <i>Cirratulus cirratus</i> <i>Cirriformia afer</i> <i>Cirriformia tentaculata</i> <i>Dodecaceria concharum</i> <i>Dodecaceria</i> sp.	(Saint-Joseph, 1894) Gillandt, 1979  (Christie, 1984) Woodham & Chambers, 1994   (O. F. Müller, 1776) (Ehlers, 1908) (Montagu, 1808) Örsted, 1843
COSSURIDAE		
	<i>Cossura</i> sp.	
DORVILLEIDAE		
	<i>Dorvillea</i> sp. Dorvilleidae gen. sp. <i>Ophryotrocha</i> sp. <i>Parougia albomaculata</i> <i>Pettiboneia urciensis</i> <i>Schistomeringos rudolphi</i>	(Åkesson & Rice, 1992) Campoy & San Martín, 1980 (Delle Chiaje, 1828)
EUNICIDAE		
	<i>Eunice</i> sp. <i>Eunice</i> sp. 2 <i>Eunice vittata</i> Eunicidae gen sp. <i>Leodice harassii</i> <i>Lysidice unicornis?</i>	(Delle Chiaje, 1828)   (Audouin & Milne Edwards, 1833) (Grube, 1840)

	<i>Paucibranchia bellii</i>	(Audouin & Milne Edwards, 1833)
FLABELLIGERIDAE		
	<i>Pherusa</i> sp.	
GLYCERIDAE		
	<i>Glycera alba</i>	(O.F. Müller, 1776)
	<i>Glycera tridactyla</i>	Schmarda, 1861
	Glyceridae gen. sp.	
HESIONIDAE		
	<i>Hesiospina aurantiaca</i>	(M. Sars, 1862)
	<i>Oxydromus</i> cf. <i>pallidus</i>	Claparède, 1864
	<i>Psamathe fusca</i>	Johnston, 1836
LUMBRINERIDAE		
	<i>Abyssoninoe hibernica</i>	(McIntosh, 1903)
	Lumbrineridae gen sp.	
	<i>Lumbrineris coccinea</i>	(Renier, 1804)
	<i>Lumbrineris latreilli</i>	Audouin & Milne Edwards, 1834
	<i>Lumbrineris perkinsi</i>	Carrera-Parra, 2001
	<i>Lumbrineris</i> sp.	
MAGELONIDAE		
	<i>Magelona equilamellae</i>	Harmelin, 1964
MALDANIDAE		
	<i>Macroclymene santanderensis</i>	(Rioja, 1917)
	<i>Euclymene oerstedii</i>	(Claparède, 1863)
	<i>Maldanidae</i> gen. sp. 1	
NEREIDIDAE		
	<i>Ceratonereis (Composetia) costae</i>	(Grube, 1840)
	<i>Neanthes acuminata</i>	(Ehlers, 1868)
	" <i>Neanthes agulhana</i> "	(Day, 1963)
	<i>Neanthes acuminata</i>	(Ehlers, 1868)
	<i>Neanthes nubila</i>	(Savigny, 1822)
	<i>Neanthes rubicunda</i>	(Ehlers, 1868)
	<i>Neanthes</i> sp.	
	Nereididae gen. sp.	
	<i>Nereis pelagica</i>	Linnaeus, 1758
	<i>Nereis perivisceralis</i>	Claparède, 1868
	<i>Nereis pulsatoria</i>	(Savigny, 1822)
	<i>Nereis rava</i>	Ehlers, 1868
	<i>Nereis</i> sp. 1	
	<i>Perinereis cultrifera</i>	(Grube, 1840)
	<i>Platynereis dumerilii</i>	(Audouin & Milne Edwards, 1833)
NEPHTYDAE		
	<i>Nephtys hombergii</i>	Savigny in Lamarck, 1818
OEONIDAE		
	<i>Drilonereis filum</i>	(Claparède, 1868)
ONUPHIDAE		
	<i>Aponuphis bilineata</i>	(Baird, 1870)
	<i>Diopatra</i> sp.?	
OPHELLIDAE		

	<i>Polyophtalmus pictus</i>	(Dujardin, 1839)
	<i>Armandia cirrhosa</i>	Filippi, 1861
ORBINIIDAE		
	<i>Naineris laevigata</i>	(Grube, 1855)
	<i>Naineris quadraticeps</i>	Day, 1965
	<i>Phylo foetida</i>	(Claparède, 1868)
	<i>Protoaricia oerstedii</i>	(Claparède, 1864)
	<i>Scoloplos typicus</i>	(Eisig, 1914)
OWENIIDAE		
	<i>Owenia fusiformis</i>	Delle Chiaje, 1844
PARAONIDAE		
	Paraonidae gen. sp.	
	<i>Aricidea (Acmira) assimilis</i>	Tebble, 1959
	<i>Aricidea (Acmira) simonae</i>	Laubier & Ramos, 1974
	<i>Cirrophorus furcatus/nichebianchi</i>	
	<i>Paradoneis armata</i>	Glémarec,
PHYLLODOCIDAE		
	<i>Eulalia clavigera</i>	(Audouin & Milne Edwards, 1833)
	<i>Eumida punctifera</i>	(Grube, 1860)
	<i>Eumida sanguinea</i>	(Örsted, 1843)
	<i>Nereiphylla pusilla</i>	(Claparède, 1870)
	<i>Nereiphylla rubiginosa</i>	(Saint-Joseph, 1888)
	<i>Pterocirrus macroceros</i>	(Grube, 1860)
PHOLOIDIDAE		
	<i>Pholoe inornata</i>	Johnston, 1839
PILARGIDAE		
	<i>Sigambra parva/tentaculata</i>	
PECTINARIIDAE		
	<i>Petta pusilla</i>	Malmgren, 1866
POLYNOIDAE		
	<i>Harmothoe spinifera</i>	(Ehlers, 1864)
	<i>Lepidonotus clava</i>	(Montagu, 1808)
	<i>Malmgrenia andreapolis</i>	McIntosh, 1874
	<i>Malmgrenia ljunghmani</i>	(Malmgren, 1867)
	<i>Malmgrenia</i> sp.	
	<i>Malmgreniella</i> sp.	
SABELLARIIDAE		
	<i>Sabellaria spinulosa</i>	(Leuckart, 1849)
SABELLIDAE		
	<i>Acromegalomma</i> sp.	
	<i>Amphicorina</i> sp.	
	<i>Amphiglena mediterranea</i>	(Leydig, 1851)
	<i>Branchiomma</i> spp.	
	<i>Chone filicaudata</i>	Southern, 1914
	<i>Dialychone collaris</i>	(Langerhans, 1881)
	<i>Myxicola infundibilulum</i>	(Montagu, 1808)
	<i>Parasabella saxicola</i>	(Grube, 1861)

## SERPULIDAE

<i>Ficopomatus enigmaticus</i>	(Fauvel, 1923)
<i>Hydroides dianthus</i>	(Verrill, 1873)
<i>Hydroides dirampha</i>	Mörch, 1863
<i>Hydroides elegans</i>	(Haswell, 1883)
<i>Hydroides nigra</i>	Zibrowius, 1971
<i>Protula cf. tubularia</i>	(Montagu, 1803)
<i>Protula</i> sp.	
Serpulidae gen sp.	
<i>Serpula cf. concharum</i>	Langerhans, 1880
<i>Serpula</i> sp.	
<i>Spirobranchus cf. tetraceros</i>	(Schmarda, 1861)
<i>Spirobranchus triqueter</i>	(Linnaeus, 1758)
Spirorbinae gen. sp.	

## SIGALIONIDAE

<i>Pelogenia arenosa</i>	(Delle Chiaje, 1830)
<i>Sigalion squamosus</i>	Delle Chiaje, 1830
Sigalionidae gen. sp.	

## SPIONIDAE

<i>Aonides oxycephala</i>	(Sars, 1862)
<i>Boccardia polybranchia</i>	(Haswell, 1885)
<i>Dipolydora armata</i>	(Langerhans, 1880)
<i>Dipolydora coeca</i>	(Örsted, 1843)
<i>Dipolydora giardi</i>	(Mesnil, 1893)
<i>Polydora</i> sp.	
<i>Prionospio cf. multibranchiata</i>	
<i>Prionospio fallax</i>	Söderström, 1920
<i>Prionospio steenstrupi</i>	Malmgren, 1867
<i>Pseudopolydora cf. paucibranchiata</i>	(Okuda, 1937)
<i>Scolelepis (Scolelepis) squamata</i>	(O.F. Muller, 1806)
<i>Spio decorata</i>	Bobretzky, 1870
Spionidae gen sp.	

## SYLLIDAE

<i>Brania pusilla</i>	(Dujardin, 1851)
<i>Erinaceusyllis belizensis</i>	(Russell, 1989)
<i>Eusyllis blomstrandii</i>	Malmgren, 1867
<i>Exogone dispar</i>	(Webster, 1879)
<i>Exogone naidina</i>	Örsted, 1845
<i>Exogone (Exogone) rostrata</i>	Naville, 1933
<i>Exogone</i> sp.	
<i>Exogone verugera</i>	(Claparède, 1868)
<i>Haplosyllis granulosa</i>	(Lattig, San Martín & Martin, 2007)
<i>Myrianida pinnigera</i>	(Montagu, 1808)
<i>Myrianida quindecimdentata</i>	(Langerhans, 1884)
<i>Myrianida</i> sp.	Milne Edwards, 1845
<i>Odontosyllis ctenostoma</i>	Claparède, 1868
<i>Odontosyllis fulgurans</i>	(Audouin & Milne Edwards, 1833)

<i>Paraehlersia ferrugina</i>	(Langerhans, 1881)
<i>Parapionosyllis brevicirra</i>	Day, 1954
<i>Parapionosyllis minuta</i>	(Pierantoni, 1903)
<i>Piosyllis longocirrata</i>	
<i>Pseudosyllis brevipennis</i>	Grube, 1863
<i>Salvatoria alvaradoi</i>	(San Martín, 1984)
<i>Salvatoria neapolitana</i>	(Goodrich, 1930)
<i>Sphaerosyllis</i> sp.	
<i>Sphaerosyllis hystrix</i>	Claparède, 1863
<i>Sphaerosyllis pirifera</i>	Claparède, 1868
<i>Sphaerosyllis pumila</i>	Westheide, 1974
<i>Sphaerosyllis taylori</i>	Perkins, 1981
Syllidae gen. sp.	
<i>Syllis armillaris</i>	(O.F. Müller, 1776)
<i>Syllis</i> cf. <i>genundensis</i>	Lamarck, 1818
<i>Syllis vittata</i>	Grube, 1840
<i>Syllis ferrani</i>	Alós & San Martín, 1987
<i>Syllis garciai</i>	(Campoy, 1982)
<i>Syllis gerlachi</i>	(Hartmann-Schröder, 1960)
<i>Syllis gracilis</i>	
<i>Syllis hyalina</i>	Grube, 1863
<i>Syllis jorgei</i>	San Martín & López, 2000
<i>Syllis krohnii</i>	Ehlers, 1864
<i>Syllis parapari</i>	San Martín & López, 2000
<i>Syllis prolifera</i>	Krohn, 1852
<i>Syllis rosea</i>	(Langerhans, 1879)
<i>Syllis</i> sp.	Lamarck, 1818
<i>Syllis</i> sp. 2	Lamarck, 1818
<i>Syllis torquata</i>	Marion & Bobretzky, 1875
<i>Syllis variegata</i>	Grube, 1860
<i>Xenosyllis scabra</i>	(Ehlers, 1864)

#### TEREBELLIDAE

<i>Amphitrite</i> sp.	
<i>Eupolymnia nebulosa</i>	(Montagu, 1819)
<i>Loimia medusa</i>	(Savigny, 1822)
<i>Lysilla nivea</i>	Langerhans, 1884
<i>Lysilla</i> sp.	
<i>Nicolea venustula</i>	(Montagu, 1819)
<i>Pista cristata</i>	(Müller, 1776)
<i>Polycirrus medusa</i>	Grube, 1850
<i>Polycirrus pallidus</i>	(Claparède, 1864)
<i>Polycirrus</i> sp.	Grube, 1850
<i>Terebella lapidaria</i>	Linnaeus, 1767
Terebellidae gen. sp.	
<i>Thelepus cincinnatus</i>	(Fabricius, 1780)

#### SIPUNCULIDAE

<i>Phascolosoma perlucens</i>	Baird, 1868
-------------------------------	-------------

ANEXO 2

ANEXO 3

ANEXO 4

ANEXO 5

ANEXO 6

	PORTIOL																				PTO PALMA										CALA BLAVA										SA PORRASSA										PORTIOL										PALMA										BALDOSAS									
	RASPADO					DRAGA					RASPADO					DRAGA					RASPADO					DRAGA					RASPADO					DRAGA					RASPADO					DRAGA					RASPADO					DRAGA					RASPADO					DRAGA														
	POR-01	POR-02	POR-03	POR-04	POD-01	POD-02	POD-03	POD-04	PAR-01	PAR-02	PAR-03	PAR-04	PAR-05	PAR-06	PAD-01	PAD-02	PAD-03	PAD-04	PAD-05	PAD-06	CBR-01	CBR-02	CBR-03	CBD-01	CBD-02	CBD-03	SPR-04	SPR-05	SPR-06	SPD-04	SPD-05	SPD-06	POR-11	POR-12	POR-13	POR-14	POD-11	POD-12	POD-13	POD-14	PORBA-11	PORBA-12	PORBA-13	PORBA-14	PAR-11	PAR-12	PAR-13	PAR-14	PAR-15	PAR-16	PAD-11	PAD-12	PAD-13	PAD-14	PAD-15	PAD-16	PABA-11	PABA-12	PABA-13	PABA-14	PABA-15	PABA-16																		
<b>AMPHINOMIDAE</b>																																																																																
Euphrosyne foliosa																																																																																
Hipponee sp.																																																																																
<b>APHRODITIDAE</b>																																																																																
Laetmonice hystrix																																																																																
<b>CAPITELLIDAE</b>																																																																																
Capitella sp.																																																																																
Capitellidae gen. sp.																																																																																
Heteromastus filiformis																																																																																
"Leiochrides australis"																																																																																
"Leiochrides fauveli"																																																																																
Notomastus laetericius																																																																																
Notomastus lineatus																																																																																
Notomastus sp.																																																																																
<b>CHRYSOPETALIDAE</b>																																																																																
Chrysopetalum debile																																																																																
Paleonotus chrysolepis																																																																																
<b>CIRRATULIDAE</b>																																																																																
Aphelocheata marioni																																																																																
Cauleriella parva																																																																																
Cauleriella sp.																																																																																
Chaetozone cf. vivipara																																																																																
Chaetozone gibber																																																																																
Chaetozone sp.																																																																																
Chaetozone/Cauleriella																																																																																
Cirratulidae gen.sp.																																																																																
Cirratulus cirratus?																																																																																
Cirriformia cf. afer																																																																																
Cirriformia cf. tentaculata																																																																																
Dodecaceria concharum																																																																																
Dodecaceria sp.																																																																																
<b>COSSURIDAE</b>																																																																																
Cossura sp.																																																																																
<b>DORVILLEIDAE</b>																																																																																
Dorvillea sp.																																																																																
Dorvilleidae																																																																																
Ophryotrocha sp.																																																																																
Parourgia albomaculata																																																																																
Pettiboneia urclensis																																																																																
Schistomerings rudolfi																																																																																
<b>EUNICIDAE</b>																																																																																
Eunice cf. vittata																																																																																
Eunice sp.																																																																																
Eunice sp. 2																																																																																
Eunice vittata																																																																																
Eunicidae gen.sp.																																																																																
Leodice harassii																																																																																
Lysidice unicornis?																																																																																
Paucibranchia bellii																																																																																
<b>FLABELLIGERIDAE</b>																																																																																
Pherusa sp.																																																																																
<b>GLYCERIDAE</b>																																																																																
Glycera alba																																																																																
Glycera trydactyla																																																																																
Glyceridae gen. sp.																																																																																
<b>HESIONIDAE</b>																																																																																
Hesiospina aurantiaca																																																																																
Oxydromus cf. pallidus																																																																																
Psmathe fusca																																																																																
<b>LUMBRINERIDAE</b>																																																																																
Abyssoninoe hibernica																																																																																
Lumbrineridae gen.sp.																																																																																
Lumbrineris coccinea																																																																																
Lumbrineris latreilli																																																																																
Lumbrineris perkinsi de Florida																																																																																
Lumbrineris sp.																																																																																
<b>MAGELONIDAE</b>																																																																																
Magelona equilamellae																																																																																
<b>MALDANIDAE</b>																																																																																
Euclymene cf. santanderensis vs agulhana"																																																																																
Euclymene oerstedii																																																																																
Maldanidae gen. sp. 1																																																																																
<b>NEREIDIDAE</b>																																																																																
Ceratonereis costae																																																																																
Neanthes acuminata																																																																																
"Neanthes agulhana"																																																																																
Neanthes caudata																																																																																
Neanthes nubila																																																																																
Neanthes rubicunda																																																																																
Neanthes sp.																																																																																
Nereididae gen. sp.																																																																																
Nereis pelagica																																																																																
Nereis perivisceralis																																																																																
Nereis pulsatoria																																																																																
Nereis rava																																																																																
Nereis sp. 1																																																																																
Perinereis cultrifera																																																																																
Platynereis dumerilli																																																																																





## AMPHINOMIDAE

*Euphrosine foliosa*

*Hipponoe* sp.

## APHRODITIDAE

*Laetmonice hystrix* 1

*Laetmonice hystrix* 2

## CAPITELLIDAE

*Capitella* sp.

Capitellidae gen. sp.

*Heteromastus filiformis*

"*Leiochrides australis*"

"*Leiochrides fauveli*"

*Notomastus latericeus*

*Notomastus lineatus*

*Notomastus* sp.

## CHRYSOPETALIDAE

*Chrysopetalum debile*

*Chrysopetalum debile* 2

*Paleanotus chrysolepis*

## CIRRATULIDAE

*Aphelochaeta marioni*

*Cauleriella parva*

*Cauleriella* sp.

*Chaetozone vivipara*

*Chaetozone gibber*

*Chaetozone* sp.

*Chaetozone* sp. 2

Cirratulidae gen.sp. 1

Cirratulidae gen.sp. 2

Cirratulidae gen.sp. 3

Cirratulidae gen.sp. 4

*Cirratulus cirratus*

*Cirriformia afer*

*Cirriformia* sp.

*Cirriformia tentaculata*

*Dodecaceria concharum*

*Dodecaceria* sp. 1

*Dodecaceria* sp. 2

*Dodecaceria* sp. 3

*Dodecaceria* sp. 4

*Dodecaceria* sp. 5

*Dodecaceria* sp. 6

*Dodecaceria* sp. 7

*Timarete punctata*

## COSSURIDAE

*Cossura* sp.

## DORVILLEIDAE

*Dorvillea* sp.

*Dorvilleidae* gen. sp.  
*Dorvilleidae* gen. sp.  
*Ophryotrocha* sp.  
*Parougia albomaculata*  
*Pettiboneia urciensis*  
*Schistomeringos rudolphi*

#### EUNICIDAE

*Eunice* sp. 1  
*Eunice* sp. 2  
*Eunice cf limosa*  
*Eunice vittata*  
*Eunice cf. vittata1*  
*Eunice cf. vittata2*  
*Eunicidae* gen sp.  
*Leodice harassii*  
*Lysidice unicornis?*  
*Paucibranchia bellii*  
*Palola* sp.

#### FLABELLIGERIDAE

*Pherusa* sp.

#### GLYCERIDAE

*Glycera alba*  
*Glycera tridactyla*  
*Glycera* sp. 1  
*Glycera* sp. 2  
*Glyceridae* gen. sp.

#### HESIONIDAE

*Hesiospina aurantiaca*  
*Oxydromus* cf. *pallidus*  
*Psamathe fusca*

#### LUMBRINERIDAE

*Abyssoninoe hibernica*  
*Lumbrineridae* gen sp.  
*Lumbrineris coccinea*  
*Lumbrineris latreilli*  
*Lumbrineris perkinsi*  
*Lumbrineris* sp.  
*Lumbrineris* sp. 2

#### MAGELONIDAE

*Magelona equilamellae*

#### MALDANIDAE

*Macroclymene* cf. *santanderensis*  
*Euclymene oerstedii*  
*Maldanidae* gen. sp. 1  
*Maldanidae* gen. sp. 2

#### NEREIDIDAE

*Ceratonereis (Composetia) costae*  
*Hediste diversicolor*

*Neanthes acuminata 1*  
*Neanthes acuminata 2*  
*Neanthes agulhana/nubila*  
*Neanthes rubicunda*  
*Neanthes sp.*  
Nereididae gen. sp.  
Nereididae gen. sp. 2  
*Nereis pelagica*  
*Nereis perivisceralis*  
*Nereis pulsatoria*  
*Nereis rava*  
*Nereis sp. 1*  
*Perinereis cultrifera*  
*Platynereis dumerilii 1*  
*Platynereis dumerilii 2*  
*Platynereis dumerilii 3*  
*Platynereis dumerilii 4*

#### NEPHTYDAE

*Nephtys hombergii*

#### OEONIDAE

*Drilonereis filum*

#### ONUPHIDAE

*Aponuphis bilineata*

*Diopatra sp.?*

#### OPHELLIDAE

*Polyophtalmus pictus*

*Armandia cirrhosa*

#### ORBINIIDAE

*Naineris laevigata*

*Naineris quadraticeps*

*Nainereis quadricuspida/ Protoaricia oerstedii*

Orbinidae gen sp.

*Phylo foetida*

*Protoaricia oerstedii*

*Scoloplos typicus*

#### OWENIIDAE

*Owenia fusiformis*

#### PARAONIDAE

Paraonidae gen. sp.?

*Aricidea (Acmira) assimilis*

*Aricidea laubieri*

*Aricidea (Acmira) simonae*

*Cirrophorus furcatus/nichebianchi*

*Cirrophorus nichebianchi*

*Paradoneis armata*

#### PHYLLODOCIDAE

*Eulalia clavigera*

*Eumida punctifera*  
*Eumida sanguinea*  
*Eumida sanguinea 2*  
*Nereiphylla pusilla*  
*Nereiphylla rubiginosa*  
*Pterocirrus macroceros*  
*Pterocirrus macroceros?*

#### PHOLOIDIDAE

*Pholoe inornata*

#### PILARGIDAE

*Sigambra parva/tentaculata*

#### PECTINARIIDAE

*Petta pusilla*

#### POLYNOIDAE

*Harmothoe spinifera*  
*Lepidonotus clava*  
*Malmgrenia andreapolis*  
*Malmgrenia ljungmani*  
*Malmgrenia sp.*  
*Malmgreniella sp.*  
*Polynoidae gen. sp.*

#### SABELLARIIDAE

*Sabellaria spinulosa*

#### SABELLIDAE

*Acromegalomma sp.*  
*Amphicorina sp.*  
*Amphiglana mediterranea*  
*Branchiomma sp. 1*  
*Branchiomma sp. 2*  
*Chone filicaudata*  
*Dialychone collaris*  
*Myxicola infundibilulum*  
*Parasabella saxicola*

#### SERPULIDAE

*Ficopomatus enigmaticus*  
*Hydroides dianthus*  
*Hydroides dirampha*  
*Hydroides elegans*  
*Hydroides nigra*  
*Protula cf. tubularia*  
*Protula sp.*  
*Sepulidae gen sp.*  
*Serpula cf. concharum*  
*Serpula sp.*  
*Spirobranchus cf. tetraceros*  
*Spirobranchus triqueter*  
*Spirorbinae gen. sp.*

#### SIGALIONIDAE

*Pelogenia arenosa*  
*Sigalion squamosus*  
Sigalionidae

#### SPIONIDAE

*Aonides oxycephala*  
*Boccardia* cf. *polybranchia*  
*Dipolydora armata*  
*Dipolydora coeca*  
*Dipolydora giardi*  
*Merenzella neglecta*  
*Polydora* sp.  
*Polydora brevipalpa*  
*Polydora brevipalpa/cornuta*  
*Prionospio* cf. *multibranchiata*  
*Prionospio fallax*  
*Prionospio steenstrupi*  
*Pseudopolydora* cf. *paucibranchiata*  
*Scolelepis (Scolelepis) squamata*  
*Scolelepis* sp.  
*Spio decorata*  
Spionidae gen. sp. 1  
Spionidae gen. sp. 2  
Spionidae gen. sp. 3  
Spionidae gen. sp. 4  
Spionidae gen sp. 5

#### SYLLIDAE

*Autolytus/Proceraea*  
*Brania pusilla*  
*Erinaceusyllis belizensis*  
*Eusyllis blomstrandii*  
*Exogone dispar*  
*Exogone naidina*  
*Exogone (Exogone) rostrata*  
*Exogone* sp.  
*Exogone verugera*  
*Haplosyllis granulosa*  
*Myrianida pachicera*  
*Myrianida pinnigera*  
*Myrianida quindecimdentata*  
*Myrianida* sp. 2  
*Odontosyllis ctenostoma*  
*Odontosyllis fulgurans*  
*Paraehlersia ferrugina*  
*Parapionosyllis brevicirra*  
*Parapionosyllis minuta*  
*Piosyllis longocirrata*  
*Trypanosyllis* sp.  
*Pseudosyllis brevipennis*

*Salvatoria alvaradoi*  
*Salvatoria neapolitana*  
*Sphaerosyllis*  
*Sphaerosyllis hystrix*  
*Sphaerosyllis pirifera*  
*Sphaerosyllis pumila*  
*Sphaerosyllis taylori*  
Syllidae gen. sp.  
*Syllis armillaris 1*  
*Syllis armillaris2*  
*Syllis cf. genundensis*  
*Syllis vittata*  
*Syllis ferrani*  
*Syllis garciai*  
*Syllis gerlachi*  
*Syllis gracilis*  
*Syllis gracilis2*  
*Syllis hyalina*  
*Syllis jorgei*  
*Syllis krohnii*  
*Syllis parapari*  
*Syllis prolifera*  
*Syllis rosea*  
*Syllis sp.*  
*Syllis sp. 2*  
*Syllis sp. 3*  
*Syllis torquata*  
*Syllis variegata*  
*Xenosyllis scabra*  
Syllidae gen. sp. 1  
Syllidae gen sp. 2

## TEREBELLIDAE

*Amphitrite sp.*  
*Eupolymnia nebulosa*  
*Loimia medusa*  
*Lysilla nivea*  
*Lysilla sp.*  
*Lysilla sp. 2*  
*Nicolea venustula*  
*Nicolea sp.*  
*Nicolea sp. 2*  
*Pista cristata*  
*Polycirrus medusa*  
*Polycirrus pallidus*  
*Polycirrus sp.*  
*Terebella lapidaria*  
Terebellidae gen. sp. 1  
Terebellidae gen. sp. 2

Terebellidae gen. sp. 3

Terebellidae gen. sp. 4

Terebellidae gen. sp. 5

Terebellidae gen. sp. 6

Terebellidae gen. sp. 7

*Thelepus cincinnatus*

#### SIPUNCULIDAE

*Phascolosoma cf. perlucens*

*Nephasoma sp.*

#### OLIGOCHAETA

*Oligochaeta sp. 1*

*Limnodriloides sp. 1*

*Limnodriloides sp. 2*

*Heronidrilus heronae*

#### UNIDENTIFIED ANNELIDA

Fam gen sp. 1

Fam gen sp. 2

Fam gen sp. 3

Fam gen sp. 4

En amarillo especies recuperadas con morfología -barcoding

En rojo, solo metabarcoding

En verde, morfología+ metabarcoding

Species	Extracciones	Amplificaciones	Genbank
<i>Euphrosine foliosa</i>	1	1	x
<i>Hipponoe</i> sp.	1	0	-
<i>Laetmonice hystrix</i>	2	2	x
<i>Capitella</i> sp.	1	0	-
Capitellidae gen. sp.	0	0	-
<i>Heteromastus filiformis</i>	2	2	x
" <i>Leiochrides australis</i> "	1	0	-
" <i>Leiochrides fauveli</i> "	1	0	-
<i>Notomastus latericeus</i>	1	0	-
<i>Notomastus lineatus</i>	1	1	NEW
<i>Notomastus</i> sp.	0	0	-
<i>Chrysopetalum debile</i>	1	1	x
<i>Paleanotus chrysolepis</i>	1	0	-
<i>Aphelochaeta marioni</i>	1	1	NEW
<i>Cauleriella parva</i>	0	0	-
<i>Cauleriella</i> sp.	1	1	x
<i>Chaetozone vivipara</i>	0	0	-
<i>Chaetozone gibber</i>	1	0	-
<i>Chaetozone</i> sp.	1	1	NEW
Cirratulidae gen.sp.	2	2	NEW
<i>Cirratulus cirratus</i>	3	3	x
<i>Cirriformia afer</i>	0	0	-
<i>Cirriformia tentaculata</i>	1	0	-
<i>Dodecaceria concharum</i>	1	1	x
<i>Dodecaceria</i> sp.	1	1	x
<i>Cossura</i> sp.	0	0	-
<i>Dorvillea</i> sp.	1	1	NEW
Dorvilleidae gen. sp.	1	1	NEW
<i>Ophryotrocha</i> sp.	1	0	-
<i>Parougia albomaculata</i>	2	2	x
<i>Pettiboneia urciensis</i>	1	1	NEW
<i>Schistomeringos rudolphi</i>	0	0	-
<i>Eunice vittata</i>	2	2	NEW
<i>Eunice</i> sp.	2	2	NEW
<i>Eunice</i> sp. 2	1	1	NEW
<i>Eunice vittata</i>	1	0	-
Eunicidae gen sp.	0	0	-
<i>Leodice harassii</i>	1	1	x
<i>Lysidice unicornis?</i>	1	1	NEW
<i>Paucibranchia bellii</i>	1	1	NEW
<i>Pherusa</i> sp.	1	0	-
<i>Glycera alba</i>	1	1	x
<i>Glycera tridactyla</i>	2	2	x
Glyceridae gen. sp.	0	0	-
<i>Hesiospina aurantiaca</i>	2	2	x
<i>Oxydromus</i> cf. <i>pallidus</i>	0	0	-
<i>Psamathe fusca</i>	1	1	x

<i>Abyssoninoe hibernica</i>	1	1	NEW
Lumbrineridae gen. sp.	0	0	-
<i>Lumbrineris coccinea</i>	2	2	NEW
<i>Lumbrineris latreilli</i>	0	0	-
<i>Lumbrineris perkinsi</i>	1	1	x
<i>Lumbrineris</i> sp.	1	1	x
<i>Magelona equilamellae</i>	1	0	-
<i>Macroclymene santanderensis</i>	1	1	x
<i>Euclymene oerstedii</i>	1	1	NEW
<i>Maldanidae</i> gen. sp. 1	1	1	NEW
<i>Ceratonereis (Composetia) costae</i>	0	0	-
<i>Neanthes acuminata</i>	1	1	x
" <i>Neanthes agulhana</i> "	1	1	x
<i>Neanthes acuminata</i>	4	4	x
<i>Neanthes nubila</i>	1	1	x
<i>Neanthes rubicunda</i>	0	0	-
<i>Neanthes</i> sp.	0	0	-
Nereididae gen. sp.	0	0	-
<i>Nereis pelagica</i>	0	0	-
<i>Nereis perivisceralis</i>	1	0	-
<i>Nereis pulsatoria</i>	1	0	-
<i>Nereis rava</i>	1	1	x
<i>Nereis</i> sp. 1	1	0	-
<i>Perinereis cultrifera</i>	0	0	-
<i>Platynereis dumerilii</i>	3	3	x
<i>Nephtys hombergii</i>	1	1	x
<i>Drilonereis filum</i>	2	2	NEW
<i>Aponuphis bilineata</i>	1	1	NEW
<i>Diopatra</i> sp.?	1	1	NEW
<i>Polyophtalmus pictus</i>	1	0	-
<i>Armandia cirrhosa</i>	1	1	NEW
<i>Naineris laevigata</i>	0	0	-
<i>Naineris quadraticeps</i>	2	2	x
<i>Phylo foetida</i>	1	1	x
<i>Protoaricia oerstedii</i>	1	1	x
<i>Scoloplos typicus</i>	0	0	-
<i>Owenia fusiformis</i>	2	2	x
Paraonidae gen. sp.	1	1	x
<i>Aricidea (Acmira) assimilis</i>	0	0	-
<i>Aricidea (Acmira) simonae</i>	0	0	-
<i>Cirrophorus furcatus/nichebianchi</i>	1	1	x
<i>Paradoneis armata</i>	1	1	x
<i>Eulalia clavigera</i>	1	1	x
<i>Eumida punctifera</i>	1	1	NEW
<i>Eumida sanguinea</i>	1	1	x
<i>Nereiphylla pusilla</i>	0	0	-
<i>Nereiphylla rubiginosa</i>	1	1	NEW
<i>Pterocirrus macroceros</i>	1	1	x

<i>Pholoe inornata</i>	1	1	NEW
<i>Sigambra parva/tentaculata</i>	1	1	x
<i>Petta pusilla</i>	1	1	NEW
<i>Harmothoe spinifera</i>	1	1	x
<i>Lepidonotus clava</i>	1	1	x
<i>Malmgrenia andreapolis</i>	1	1	NEW
<i>Malmgrenia ljunghmani</i>	2	2	NEW
<i>Malmgrenia</i> sp.	1	1	NEW
<i>Malmgreniella</i> sp.	0	0	-
<i>Sabellaria spinulosa</i>	1	0	-
<i>Acromegalomma</i> sp.	1	0	-
<i>Amphicorina</i> sp.	1	0	-
<i>Amphiglena mediterranea</i>	4	4	x
<i>Branchiomma</i> spp.	1	0	-
<i>Chone filicaudata</i>	1	1	x
<i>Dialychone collaris</i>	1	1	x
<i>Myxicola infundibilulum</i>	1	1	x
<i>Parasabella saxicola</i>	1	1	x
<i>Ficopomatus enigmaticus</i>	1	0	-
<i>Hydroides dianthus</i>	1	1	x
<i>Hydroides dirampha</i>	2	2	x
<i>Hydroides elegans</i>	1	1	x
<i>Hydroides nigra</i>	1	1	x
<i>Protula</i> cf. <i>tubularia</i>	1	0	-
<i>Protula</i> sp.	1	1	x
Sepulidae gen sp.	1	1	x
<i>Serpula</i> cf. <i>concharum</i>	1	0	-
<i>Serpula</i> sp.	1	1	x
<i>Spirobranchus</i> cf. <i>tetraceros</i>	1	0	-
<i>Spirobranchus triqueter</i>	1	1	x
Spirorbinae gen. sp.	1	0	-
<i>Pelogenia arenosa</i>	0	0	-
<i>Sigalion squamosus</i>	2	2	NEW
<i>Sigalionidae</i>	0	0	-
<i>Aonides oxycephala</i>	3	3	NEW
<i>Boccardia polybranchia</i>	1	0	-
<i>Dipolydora armata</i>	1	0	-
<i>Dipolydora coeca</i>	1	0	-
<i>Dipolydora giardi</i>	1	0	-
<i>Polydora</i> sp.	0	0	-
<i>Prionospio</i> cf. <i>multibranchiata</i>	1	0	-
<i>Prionospio fallax</i>	1	0	-
<i>Prionospio steenstrupi</i>	1	1	x
<i>Pseudopolydora</i> cf. <i>paucibranchiata</i>	2	2	x
<i>Scolecopsis (Scolecopsis) squamata</i>	0	0	-
<i>Spio decorata</i>	0	0	-
<i>Spionidae</i>	0	0	-
<i>Brania pusilla</i>	1	1	NEW

<i>Erinaceusyllis belizensis</i>	1	1	NEW
<i>Eusyllis blomstrandii</i>	0	0	-
<i>Exogone dispar</i>	1	0	-
<i>Exogone naidina</i>	1	0	-
<i>Exogone (Exogone) rostrata</i>	1	0	-
<i>Exogone sp.</i>	0	0	-
<i>Exogone verugera</i>	1	0	-
<i>Haplosyllis granulosa</i>	1	1	NEW
<i>Myrianida pinnigera</i>	0	0	-
<i>Myrianida quindecimdentata</i>	2	2	x
<i>Myrianida sp.</i>	2	2	NEW
<i>Odontosyllis ctenostoma</i>	2	2	NEW
<i>Odontosyllis fulgurans</i>	2	2	x
<i>Paraehlersia ferrugina</i>	1	1	NEW
<i>Parapionosyllis brevicirra</i>	1	0	-
<i>Parapionosyllis minuta</i>	1	0	-
<i>Piosyllis longocirrata</i>	1	1	NEW
<i>Pseudosyllis brevipennis</i>	1	1	x
<i>Salvatoria alvaradoi</i>	1	0	-
<i>Salvatoria neapolitana</i>	1	0	-
<i>Sphaerosyllis</i>	0	0	-
<i>Sphaerosyllis hystrix</i>	1	0	-
<i>Sphaerosyllis pirifera</i>	2	2	NEW
<i>Sphaerosyllis pumila</i>	0	0	-
<i>Sphaerosyllis taylori</i>	1	0	-
Syllidae gen. sp.	0	0	-
<i>Syllis armillaris</i>	4	4	x
<i>Syllis cf. genundensis</i>	2	2	x
<i>Syllis vittata</i>	1	1	x
<i>Syllis ferrani</i>	1	1	NEW
<i>Syllis garciai</i>	1	1	x
<i>Syllis gerlachi</i>	2	2	x
<i>Syllis gracilis</i>	4	4	x
<i>Syllis hyalina</i>	0	0	-
<i>Syllis jorgei</i>	1	1	x
<i>Syllis krohnii</i>	1	1	x
<i>Syllis parapari</i>	0	0	-
<i>Syllis prolifera</i>	2	2	NEW
<i>Syllis rosea</i>	1	0	-
<i>Syllis sp.</i>	0	0	-
<i>Syllis sp. 2</i>	1	0	-
<i>Syllis torquata</i>	1	1	NEW
<i>Syllis variegata</i>	4	4	x
<i>Xenosyllis scabra</i>	1	1	NEW
<i>Amphitrite sp.</i>	1	1	x
<i>Eupolymnia nebulosa</i>	0	0	-
<i>Loimia medusa</i>	1	1	x
<i>Lysilla nivea</i>	2	2	NEW

<i>Lysilla</i> sp.	2	2	NEW
<i>Nicolea venustula</i>	2	2	NEW
<i>Pista cristata</i>	0	0	-
<i>Polycirrus medusa</i>	1	1	NEW
<i>Polycirrus pallidus</i>	0	0	-
<i>Polycirrus</i> sp.	1	1	x
<i>Terebella lapidaria</i>	2	2	NEW
Terebellidae gen. sp.	0	0	-
<i>Thelepus cincinnatus</i>	1	0	-
<i>Phascolosoma perlucens</i>	3	3	x

	209	165	In GB 68	TOTAL
201	158	114	New 46	ESPECIES

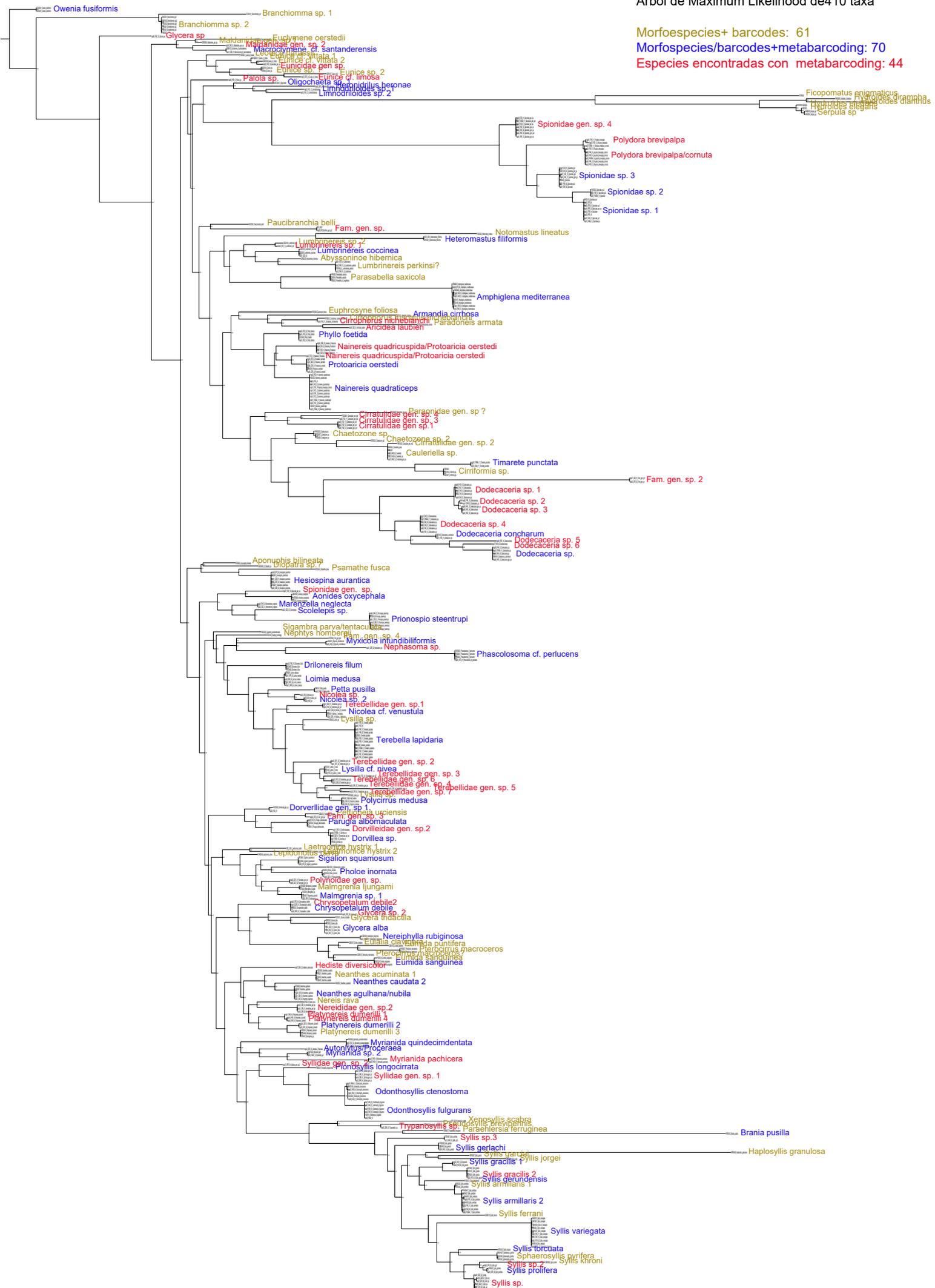
Anexo 3. Tabla con las especies identificadas a través de datos morfológicos (primera columna), el número de ejemplares de dichas especies para el que se ha extraído ADN (segunda columna), el número de ejemplares para los que se han conseguido amplificar ADN de buena calidad (tercera columna) y especies con el fragmento secuenciado nuevo en bases de datos públicos como Gen Bank (cuarta columna).

Arbol de Maximum Likelihood de 410 taxa

Morfoespecies+ barcodes: 61

Morfoespecies/barcodes+metabarcoding: 70

Especies encontradas con metabarcoding: 44



Beast topology with species after GMYC analyses

Total number of species: 175

Morfoespecies+ barcodes: 61

Morfospecies/barcodes+metabarcoding: 70

Especies encontradas con metabarcoding: 44

