



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**  
Instituto de Ecología

**Análisis metagenómico y ecofisiológico de biofilms colonizadores de  
sustratos coralinos: La vida después de la muerte coralina**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

PRESENTA:

**M. en C. Andrés Sánchez Quinto**

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

**DRA. LUISA I. FALCÓN ÁLVAREZ**  
**INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM**

COMITÉ TUTOR:

**DRA. SUSANA ENRÍQUEZ**  
**DOMÍNGUEZ**  
**UNIDAD ACADÉMICA DE**  
**SISTEMAS ARRECIFALES, UNAM**

**DR. MIROSLAV MACEK**  
**FES IZTACALA, UNAM**

**DRA. ROCIO J ALCÁNTARA HERNÁNDEZ**  
**INSTITUTO DE GEOLOGÍA, UNAM**

**DRA. ALEJANDRA PRIETO DAVO**  
**UNIDAD ACADÉMICA DE SISAL, UNAM**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX. MAYO, 2020**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**UNAM –Dirección General de Bibliotecas**

**Tesis Digitales**

**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

Instituto de Ecología

**Análisis metagenómico y ecofisiológico de biofilms colonizadores de  
sustratos coralinos: La vida después de la muerte coralina**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

PRESENTA:

**M. en C. Andrés Sánchez Quinto**

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

**DRA. LUISA I. FALCÓN ÁLVAREZ  
INSTITUTO DE ECOLOGIA, UNAM**

COMITÉ TUTOR:

**DRA. SUSANA ENRÍQUEZ  
DOMÍNGUEZ  
UNIDAD ACADÉMICA DE SISTEMAS  
ARRECIFALES, UNAM**

**DR. MIROSLAV MACEK  
FES IZTACALA, UNAM**

**DRA. ROCIO ALCÁNTARA  
INSTITUTO DE GEOLOGIA, UNAM**

**DRA. ALEJANDRA PRIETO DAVÓ  
UNIDAD ACADEMICA DE SISAL, UNAM**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX. MAYO, 2020.**

# **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al posgrado en Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM, por permitirme ser miembro del programa, además de ser parte esencial en mi formación doctoral.

Por otro lado, agradezco al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP), por el financiamiento concedido para la realización del Coloquio Ramón Margalef en Barcelona, así como la asistencia al AGU 2016 en San Francisco.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de doctorado.

Agradezco a los proyectos SEP-CONACyT No. 254962 y UC-MEXUS CN116 por el apoyo económico otorgado para la realización de esta tesis. Me gustaría agradecer a los miembros de mi comité tutorial, por su atenta y activa participación en cada una de las reuniones semestrales, en las que tuve la fortuna de contar con sus valiosos comentarios y puntos de vista, los cuales que me permitieron conducir y enriquecer este proyecto:

Dra. Luisa I. Falcón (Tutor principal)

Dra. Susana Enríquez (Miembro del Comité Tutor)

Dr. Miroslav Macek (Miembro del Comité Tutor)

Dra. Rocio J Alcántara Hernández

Dra. Alejandra Prieto-Davó

A la Dra. Luisa Falcón por siempre apoyarme en esta increíble aventura, creyendo en mí y asesorándome cada paso del camino. Lu, gracias por tu tiempo y enseñanzas. Pero sobre todo por tu cariño en los momentos difíciles que pasé durante este doctorado y por siempre poner primero tu lado humano ante todo.

Al personal y amigos de la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales (UASA) por todas las facilidades brindadas para la realización de este proyecto. En especial a la Dra. Susana Enríquez y al Dr. Roberto Iglesias. A la Dra. Anastazia Banaszak por permitirme trabajar en su laboratorio. Al Dr. Román Vásquez y a Roberto Velásquez ser grandes amigos y acompañarme al campo.

Al MC Fernando Negrete por su invaluable apoyo técnico, especialmente en el campo. También gracias por ser un excelente compañero de campo y amigo.

Al personal administrativo de la UASA y del Instituto Ecología por la gestión que permitió realizar esta tesis.

A la MC Osiris Gaona por su apoyo técnico. Gracias por apoyar a conseguir material cuando más lo necesitaba. Gracias Osi por ser mi mejor amiga en el laboratorio y escuchar mis preocupaciones durante estos años.

A los miembros del laboratorio de Ecología Bacteriana, especialmente a Daniel Cerqueda, Ricardo Augusto y Jesús Martínez por ser parte de esta aventura.

A Alejandro René González Ponce y José Miguel Baltazar Gálvez del área de cómputo por su asesoría con los scripts y/o por salvar a mi computadora más de una vez del colapso.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de ser parte de la mejor Universidad del país. Además de enseñarme que un GOYA se dice con la boca, pero se canta con el corazón.

A la Cachibanda: Coqui, Santiago, Diego, Fabian y Pollo por las risas y ratos de diversión. A Fafa por su ayuda con las figuras y las tardes de videojuegos. A los amigos de Cuerna: Tulio, Jozn, Migue, Adrian, Chino, Eze, Gordi, Cuevas, Kikis, Conk, Jords, Fer Marquina y a los de Puebla: Jerry, Juan, Pablits, Chino, los hermanos Palomeq, Zeron y Bejas por las aventuras y la diversión.

A mi familia: mi madre y hermanos por su apoyo incondicional durante todos estos años.

A mi nueva familia y esposa Anaid Guerrero por todo tu amor, paciencia y cariño.

Pero en especial esta Tesis va dedicada a mi padre (1950-2016 †) por lo que me enseñó.

## Lo que aprendí de mi padre....

De mi padre aprendí que no se tiene que ser un maestro para enseñar cosas,  
Que la comida se disfruta más cuando se cocina,  
Que la vida es un milagro pero es aún más poder compartirla.  
Que la vida esta para vivirla y no para sufrirla.  
Que se vale comer 3 postres,  
Que dejarse mojar por la lluvia, puede ser un milagro.

De mi padre aprendí que no se necesita saber jugar futbol para hacerlo, sólo hijos y un balón.  
Que se pueden tener hermanos sin ser de sangre como en Pheonix, León, Madrid, Sevilla, Córdoba o a unas casas, la cosa es llegar a encontrarlos.  
Que se puede ser hermano y padre al mismo tiempo.  
Que los sueños están para coleccionarse y cumplirlos.  
Que viajar por el mundo siempre será un privilegio a pesar de que nada saldrá perfecto.  
Que la música bella puede venir de cualquier lado,  
Que la vida se disfruta al máximo y que de si jugos se trata, se vale ponerle apio.

Que los días pueden ser maravillosos, sólo hay que verlos de la forma adecuada.  
Que los hermanos de tu pareja, también son tus hermanos.  
Que ser generoso y atento tiene grandes recompensas,  
Que un espíritu jamás se quiebra, sólo aprende,  
Que donde se pone el ojo, se pone la bala.. más cuando de amor se trata.  
Que Taxco realmente no esta tan lejos.

Que el truco está en ganarse a la suegra.  
Que se vale tener cuidado con aquellos con los de ojos de pícaro (son tremendos),  
Que se debe ser agradecido, incluso con los portadores de malas noticias,  
Que no se necesita decir nada para expresar un sentimiento, un abrazo basta.  
Que todos somos luz y sombra,  
Que el alcohol no quita las penas, las duplica,  
Que la familia es lo más importante, pero por un hijo se da la vida.

Que un alumno también puede ser un hijo del cual se puede aprender muchísimo.  
Que lo que hagas en la vida, sabe más rico cuando le condimentas pasión,  
Que el que madruga, dios le ayuda,  
Que no se tiene que ser religioso para ir a misa y dar gracias por las cosas de la vida, Que se tiene que luchar por los sueños, Que momentos difíciles hay todo el tiempo, pero que jamás estarás sólo, Que el vals con la novia debe ser algo muy “espiritual”.

Que un verdadero amigo se debe conservar y cuidar porque son de por vida.  
Que la mamma e siempre la mamma.  
Que el mundo de las orquídeas es tan basto y tan hermoso.. que no se puede tener sólo una,  
Que se deben cuidar las palabras, porque no sabes cuáles serán las últimas,  
Que el correr o nadar libera tu alma y repara el espíritu,  
Que en el mar, la vida es más sabrosa.  
Que son los pequeños detalles los que te hacen sentir vivo.  
Que cualquiera tiene algo que enseñar y algo que aprender.  
Que vale más ser humilde y generoso que patán y famoso.  
Que el amor por tu mujer es infinito y que se demuestra todos los días.  
Que lo cortés no quita lo valiente.

Que se vale enojarse, pero jamás desquitarse con alguien más de lo que nos pasa.  
Que llorar no es malo, es sólo liberar tus emociones.  
Que no hay edad para reencontrarse con alguien que quieres mucho.  
Que a mí también me hubiera gustado que conocieras a tus nietos.  
Que no hay edad para hacer nuevos amigos.  
Que el sonido de las aves por la mañana es el mejor despertador,  
Que a los invitados se les consiente.  
Que se vale pedir ayuda, a veces no se puede sólo.  
Que ver una orquídea es como recordar un amigo.  
Que las promesas se cumplen, pero negociar tampoco es mal

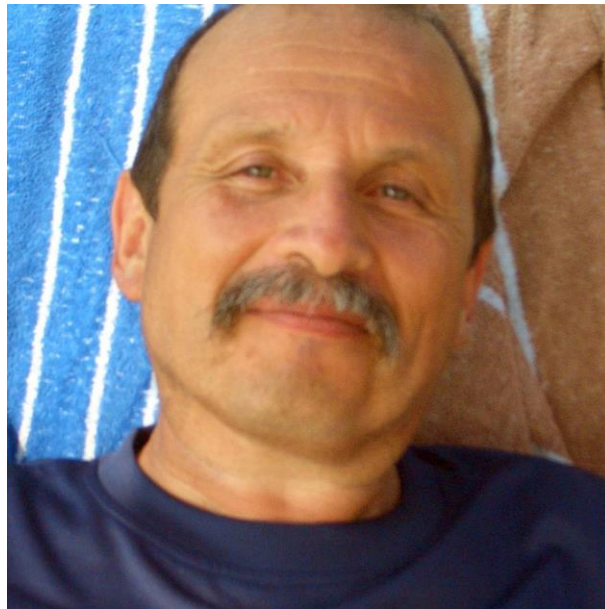


Que el tener una mascota complementa la vida, es otra variable para repartir amor.  
Que si no pudiste al primer intento, lo vuelves a intentar e intentar y algún día lo lograras.  
Que de corazones rotos también se aprende,  
Que no hay edad para ser cariñoso, la bondad es el amor que tienes por el prójimo.  
Que ser la mejor persona en el mundo depende de cada uno, pero la clave está en ver primero por los demás.

Que se debe ayudar a la gente sin esperar nada a cambio.  
Que has hecho las cosas bien cuando recibes tanto cariño de tantas personas,  
Que al final lo mejor es estar tranquilo y en paz. Que Cuernavaca puede ser hermoso por la mañana después de la lluvia.  
Que cualquier momento es bueno para celebrar la vida.  
Que la muerte es sólo el principio,  
Que los ojos brillan cuando se disfrutan las cosas, por minúscula que sea.

Que el desayuno es la comida más importante del día,  
Que la elegancia se lleva en el alma,  
Que nadie dijo que la vida sería fácil, pero que vale la pena.

Que es un privilegio poder compartir con la familia.  
Que es bueno tener un bunker, un rancho o un espacio de paz, es importante darse su tiempo.  
Que también se puede abrazar con la mirada.  
Que el hogar se construye con amor y con paciencia.  
Que un animal puede ser un ser maravilloso,  
Que si un profesor viaja a Israel, se vende la idea de que no tardará.  
Que no hay mayor satisfacción que ver a los hijos realizados,  
Que el amor se puede expresar a la distancia,  
Que nunca es tarde para pedir perdón,  
Que a los fieles difuntos no se les olvida.  
Que jamás pensé en el día en que te dijera adiós, Pero te quiero agradecer porque si de alguien aprendí, fue de ti.



Gracias Pa!

“Puede que los barcos estén más seguros en el Puerto, pero no fueron hechos para eso”

-Anónimo

# Índice general

Índice general	I
Índice de tablas	II
Índice de figuras	III
Resumen	IV
Abstract	V
Introducción	
Arrecifes de coral	1
Ecología y el ciclo de vida de los arrecifes de coral	2
Corales	3
Biom mineralización	4
Calcificación en corales	6
Estado actual de los arrecifes de coral en el Caribe Mexicano	9
<i>Acropora palmata</i> en México	10
El holobionte de <i>Acropora</i>	11
Problemática ambiental de los ecosistemas coralinos	13
Los microorganismos asociados a los arrecifes de coral	15
Antecedentes	15
Justificación e importancia	17
Preguntas de investigación	18
Objetivo general	18
Hipótesis	19
Área de estudio	19
Materiales y Métodos	21
Resultados	29
Discusión general	40
Conclusiones	45
Perspectivas	46
Referencias	47
Anexo I	54
Anexo II	62
	I

## ÍNDICE DE TABLAS

## PÁGINA

Tabla 1. Rutas metabólicas analizadas siguiendo el metabolismo energético propuesto por KEGG	27
Tabla 2. Caracterización fisicoquímica del agua superficial (izquierda) y de los biofilms (derecha) colonizadores de la pedacería de restos coralinos (promedio de 3 submuestras) en La Bocana en julio-agosto de 2017.	29
Tabla 3. Concentraciones de pigmentos y clorofilas en los biofilms colonizadores de restos calcáreos.	31
Tabla 4. Rutas metabólicas y organismos presentes en los biofilms de la pedacería de coral que han sido asociados con la precipitación de carbonato.	39

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>PÁGINA</b>
Figura 1. Ciclo de vida de los corales en los arrecifes de coral y su interacción con otros organismos	2
Figura 2. Ubicación geográfica (izquierda) de puntos de muestreo dentro del área de estudio "La Bocana" en el sistema de arrecifes de Puerto Morelos, Quintana Roo (el recuadro superior derecho muestra una <i>A. palmata</i> saludable y en las estructuras de la pedacería de coral <i>A. palmata</i> , derecha inferior).	20
Figura 3. Se observa en el lado izquierdo una <i>A. palmata</i> sana rodeada por restos calcáreos colonizados por biofilm. Al centro, los restos de una <i>A. palmata</i> en proceso de deterioro y a la derecha restos calcáreos colonizados por biofilm.	21
Figura 4. Diagrama de flujo indicando las fases de la metodología de las tres secciones principales del proyecto.	22
Figura 5. Sección metodológica de caracterización Físico-Química y biogeoquímica desglosado en cada una de sus sub-secciones.	22
Figura 6. Sección metodológica de caracterización Ecofisiología desglosado en cada una de sus sub-secciones.	23
Figura 7. Sección metodológica de Metagenómica desglosada en cada una de sus sub-secciones.	23
Figura 8. Cámaras de incubación utilizadas para el experimento de fijación de nitrógeno a partir del ensayo de reducción de acetileno.	28
Figura 9. Composición filogenética de la pedacería de coral colonizados por biofilms para cada dominio. Bacterias 87.37%, Arqueas 3.39%, Eucariota 8.12% y Virus 0.73%.	33
Figura 10. Composición filogenética de la pedacería de coral colonizados por biofilms para cada dominio. Bacterias 87.37% (A), Arqueas 3.39% (B), Eucariota 8.12% (C) y Virus 0.73% (D). R: Las bacterias estaban dominadas por las gammaproteobacteria (33.56%) y las alfa proteobacteria (21.36%). B: Las arqueas fueron dominadas por Thaumarchaeota no clasificadas (91.54%). C: Los eucariotas estaban dominados por	33

Anthozoa (19.00%) y Demospongiae (14.25%). D: los virus estaban dominados por Caudovirales (88,26%).

Figura 11. Potencial metabólico de la pedacería de coral. El potencial metabólico de la pedacería de coral está dominado por subsistemas basados en agrupamiento (3,816,880 secuencias) y carbohidratos (3,601,705 secuencias). Los aminoácidos y derivados, el metabolismo de las proteínas y derivados (3,266, 144; 2, 177,104 y 2, 122,139 secuencias respectivamente) también están altamente representados. Las secuencias que codifican el metabolismo del potasio, la latencia y la esporulación y la fotosíntesis fueron representadas por > 100,000 secuencias. **35**

Figura 12. Modelo del papel funcional propuesto de las bacterias en los restos calcáreos de coral evaluado a través de la metagenómica e indicando las rutas biogeoquímicas asociadas a los ciclos de nitrógeno, azufre y metano. **37**

Figura 13. Fijación de nitrógeno cuantificada en la pedacería de coral con el ensayo de reducción de acetileno durante un ciclo de 24 h. El ensayo comenzó a las 12: 00h; T1 = 18: 00h; T2 = 24: 00h; T3 = 6: 00h; T4 = 12: 00h. **38**



## Resumen

En los últimos 30 años, el coral de la especie *Acropora palmata* ha experimentado una pérdida excesiva de individuos que muestran pocos signos de recuperación en todo el Caribe Mexicano, lo que resulta en largos tramos de estructuras de pedacería coralina. De acuerdo a diversos reportes, se han identificado zonas donde las colonias de *A. palmata* han sido muy perturbadas, formando estructuras montañosas con los restos calcáreos transportados desde la barrera arrecifal. Estos restos presentan un proceso de litificación que permite que los fragmentos se fijen entre sí. Cuando el coral muere y se fijan dichos fragmentos, el esqueleto comienza a ser colonizado por algas, esponjas, virus, bacterias y otros microorganismos, formando una nueva comunidad. Dichas comunidades son relevantes para los arrecifes, ya que forman parte del ecosistema y aportan diversidad tanto taxonómica como metabólica. En la presente tesis analizamos, con base en un enfoque metagenómico y algunos experimentos ecofisiológicos, la diversidad, los metabolismos más abundantes y los ciclos biogeoquímicos asociados a la comunidad que coloniza la pedacería de los restos calcáreos de *A. palmata* en La Bocana (Puerto Morelos, QRoo, México). A partir de los resultados, se encontró que las comunidades asociadas a la pedacería calcárea de los restos de coral pueden desempeñar un papel importante en los entornos de arrecifes de coral mediante la remineralización de nitrógeno, azufre y carbono. De igual forma, se encontró la presencia de diversos metabolismos que han sido asociados a la precipitación de carbonatos, lo que favorece la hipótesis del rol que tienen los biofilms microbianos en la formación de barreras arrecifales. Las bacterias tienen un papel importante en estos ecosistemas, siendo el dominio que más predominó en el metagenoma, en el cual las Proteobacterias son el Filo más abundante y están presentes en la mayoría de las rutas metabólicas. Este estudio proporciona la primera caracterización amplia de las comunidades asociadas a la pedacería de coral y su papel en los ciclos biogeoquímicos, lo que sugiere una visión potencial de un mundo donde los arrecifes de coral ya no estarían dominados por corales.



## **Abstract**

In the last 30 years, the coral *Acropora palmata* has experienced an excessive loss of individuals that show few signs of recovery throughout the Mexican Caribbean, resulting in long stretches of dead coral reef structures. According to various reports, disturbed colonies of *A. palmata* form mountainous structures with the calcareous rubble transported from the reef barrier. These remains have a lithification process that allows the fragments to bind to each other. When the coral dies and the fragments are bound, the skeleton is colonized by algae, sponges, virus, bacteria and other microorganisms, which form a new community. These communities are relevant for the reefs as they are part of the ecosystem and provide important taxonomic and metabolic diversity. In the present study, we analyzed, using a metagenomic approach and some ecophysiological experiments, the diversity and metabolisms associated to biogeochemical cycles of the calcareous rubble of *A. palmata* in La Bocana (Puerto Morelos, QRoo, Mexico). The communities associated with the coral rubble can play an important role in coral reef environments by potentially remineralizing nitrogen, sulfur and carbon. Moreover, we also found the presence of several pathways associated to carbon precipitation. In general, Bacteria have an important role in these ecosystems, being the most abundant Domain in the metagenome. Proteobacteria is the most abundant Phylum and is present in most metabolic pathways. This study provides the first broad characterization of communities associated with coral rubble and their role in biogeochemical cycles, suggesting a potential vision of a world where coral reefs would no longer be dominated by corals.

# INTRODUCCIÓN

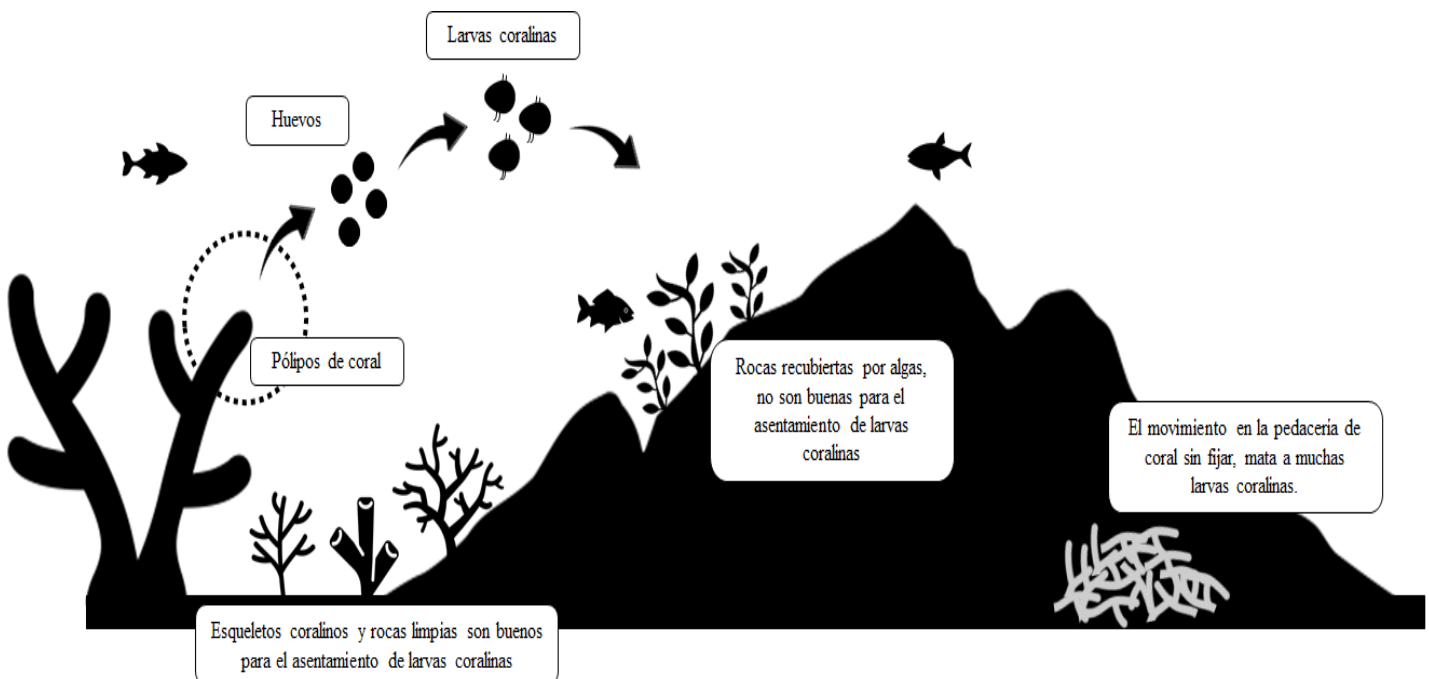
## Arrecifes de coral

Los arrecifes de coral son uno de los ecosistemas más productivos del planeta, constituyendo las estructuras carbonatadas de origen biológico de mayor tamaño. Se estima que mantienen una tercera parte de todas las especies marinas descritas y aportan un cuarto de la productividad de la pesca marina (Shinzato *et al.*, 2014). Alrededor de 500 millones de personas alrededor del mundo dependen de recursos obtenidos de los arrecifes de coral; sin embargo, se espera que esta cifra se duplique en los próximos 40 años (Hawkins *et al.*, 2013). Los esqueletos calcáreos de corales, principalmente *A. palmata*, entre otros, forman grandes arrecifes en conjunto con la actividad cementante de las algas coralinas con las cuales conviven en el mismo espacio al colonizar el bentos marino, permitiendo la formación de barreras. Estas estructuras calcáreas proporcionan microambientes complejos, que sostienen una amplia diversidad microbiana y de macrofauna lo cual los convierte en ecosistemas que albergan una alta diversidad de organismos (Ainsworth *et al.*, 2010).

Los arrecifes de coral se distribuyen en el océano de acuerdo con las propiedades físico-químicas del ambiente y el sedimento (Sweet *et al.*, 2011). La mayoría no tolera temperaturas menores a 18°C; siendo entre 23°C y 29°C las temperaturas óptimas para su desarrollo. La salinidad del agua necesaria para el desarrollo de los corales normalmente radica entre 32 y 42 en condiciones cristalinas con un pH ~8. La importancia de la luz para su desarrollo y crecimiento restringe a la mayoría de estos organismos a la zona eufótica (menor de 70 metros de profundidad) (Lalli *et al.*, 1995). Debido a estas condiciones, la mayoría de las especies de coral están ubicadas en aguas de zonas tropicales y subtropicales, entre latitudes de 30° norte y sur (Barnes, 1987). Además de que son lugares que proveen una amplia superficie para la colonización y desarrollo de comunidades de microorganismos, cualquier perturbación afecta la productividad, la biomasa, la composición y la función del ecosistema coralino (Uthicke *et al.*, 2011a). Las bacterias tienen un papel fundamental en este ecosistema, ya que interactúan de manera compleja y diversa con otros organismos tanto en el desarrollo como en la función del arrecife, siendo parte del holobionte coralino (Ainsworth *et al.*, 2010; Shinzato *et al.*, 2014).

## Ecología y el ciclo de vida de los arrecifes de coral

Los corales escleractinios están considerados entre los principales constructores de la formación arrecifal. Se caracterizan por su crecimiento sobre los restos calcáreos a través de muchas generaciones (Birkeland, 1997). Otros organismos como las algas, los foraminíferos y diversos moluscos, contribuyen a cementar y a aportar carbonatos a la estructura arrecifal (Littler y Littler 1985; Connell, 1978). Muchos otros residentes de los arrecifes de coral, al morir también aportan alimento (materia orgánica) y carbonatos al arrecife (Schuhmacher, 1978). Algunas algas marinas de los géneros *Udotea*, *Corallina*, *Chloropyta*, entre otros, al igual que los pastos marinos como *Thalassia testudinum*, tienen la capacidad de depositar carbonato de calcio, al igual que los corales (Littler y Littler, 1985). Además, las algas coralinas proporcionan un sustrato calcáreo favorable para el asentamiento de corales u otros invertebrados. En realidad, la plánula coralina por lo general requiere de sustratos coralinos cubiertos por algas coralinas incrustantes (CCA) para asentarse, las cuales reconoce químicamente la larva (Harrington *et al.*, 2004).



**Figura 1. Ciclo de vida de los corales en los arrecifes de coral y su interacción con otros organismos.**

Los restos calcáreos se desgastan a través del tiempo debido a diversos factores biológicos, físicos y químicos. Sin embargo, procesos físicos como el oleaje, están considerados entre los más importantes debido a la capacidad de erosionar a los arrecifes coralinos (Harney y Fletcher, 2003). Por otro lado, la bioerosión también tiene un papel fundamental en los arrecifes de coral ya que hace más susceptible al sustrato para ser erosionado ya sea de manera física y/o química, y produce cantidades importantes de sedimento (MacGeachy y Stearn 1976; Warne, 1977; Scoffin, 1992). Entre los bioerosionadores más importantes se encuentran el pez loro (fam. Scaridae), esponjas del género cliónidas, equinoideos ramoneadores (género *Echinometra*), algas endolíticas y bivalvos litófagos (género *Lithophaga*), entre otros (Holmes *et al.*, 2000; Perry y Hephurn 2008). El sustrato erosionado puede quedar atrapado dentro de rocas u otros esqueletos de coral, para luego ser “estabilizados” por el crecimiento de algas y otros organismos incrustantes (Sheppard *et al.*, 2017). Se cree que, a lo largo de todos los arrecifes, existen cambios químicos a partir de diversos metabolismos, tanto de las macroalgas, así como de microorganismos que permiten la consolidación del sedimento a la roca caliza (Sheppard *et al.*, 2017). La complejidad estructural que poseen los arrecifes de coral es importante ya que se correlaciona positivamente con una alta diversidad de especies (Randall, 1963; Graham y Nash, 2013). A una mayor complejidad estructural, una mayor disponibilidad de sitios para el desove, los refugios para los juveniles y de recursos alimentarios. Además de un incremento superficial (microhábitats) para el asentamiento de algas e invertebrados (Hiatt y Strasburg, 1960; Moreno-Sánchez, 2009).

## **Corales**

Los corales están formados por la relación endosimbiótica entre invertebrados de la clase Anthozoa, Filum Cnidaria, los dinoflagelados (alrededor de 7 géneros) y bacterias. Al conjunto de los tres grupos de organismos (coral-dinoflagelado-microbioma) se le denomina holobionte. Esta relación explica el éxito ecológico y evolutivo de los corales duros (Ainsworth *et al.*, 2010; Shinzato *et al.*, 2014). Los dinoflagelados son organismos unicelulares fotosintéticos que se encuentran en endosomas del tejido gastrodermal denominados simbiosomas. Dichos simbiosomas tienen su origen en la membrana plasmática del coral, en donde es incorporado el dinoflagelado por medio de un proceso de

fagocitosis (Shinzato *et al.*, 2014). Los dinoflagelados son fundamentales para la homeostasis del holobionte, ya que varios procesos del coral como son: el metabolismo (p ej. producción de oxígeno), la pigmentación, la eliminación de desechos y la secreción del carbonato de calcio para la formación del esqueleto del cnidario dependen de esta asociación simbiótica (Cooper *et al.*, 2011; Shinzato *et al.*, 2014). El dinoflagelado simbiótico recibe protección, compuestos para la fotosíntesis, compuestos nitrogenados, fosfatos y un medio para desarrollarse (Hawkins *et al.*, 2013). Por medio de la clorofila y otros pigmentos, los dinoflagelados utilizan los rayos del sol, el CO<sub>2</sub> y el agua para realizar la fotosíntesis oxigénica, liberando O<sub>2</sub> y sintetizando carbohidratos. Por otro lado, los dinoflagelados simbiotes a diferencia de los de vida libre, tienen la capacidad de absorber de dos a cinco veces más la luz que reciben debido a la habilidad que tiene el esqueleto coralino de amplificar el campo lumínico. Dicha capacidad de amplificación depende de la estructura del esqueleto coralino ya que se ha observado una mayor capacidad de amplificación en esqueletos ramificados que en esqueletos robustos y masivos (faceloides). Lo cual, de acuerdo a Enriquez et al (2017) ha influido en el éxito evolutivo y ecológico de los corales escleractinios en los arrecifes de coral (Enríquez et al. 2005; Enríquez et al. 2017).

Asimismo, pueden producir y proporcionar al coral algunos aminoácidos, glicerol, azúcares, grasas y proteínas. Alrededor del 90% de la materia orgánica producida por el dinoflagelado es utilizada por el coral (Sumich, 1996; Hawkins *et al.*, 2013). Los corales y sus dinoflagelados secretan una mucosidad que permite el crecimiento y protección de algunas bacterias. La mucosidad es un polímero sintetizado en células especializadas del pólipo y excretada por el dinoflagelado a la superficie del coral. Las propiedades específicas de la mucosidad pueden variar dependiendo de la especie de coral por lo que se cree que la composición microbiana también puede cambiar entre especies de coral (Sweet *et al.*, 2011).

### **Biomíneralización**

La calcificación puede ser inducida por organismos como bacterias, algas y animales (vertebrados e invertebrados) (Paerl *et al.*, 2001). Se considera que el HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> es el sustrato utilizado en la calcificación debido a su gran abundancia en el océano (mayor al 90%). Sin embargo, también el carbonato (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) puede estar ligado a la calcificación. Para que la

biomineralización sea un proceso viable, es de gran importancia el estado de saturación ( $\Omega$ ) del mineral, tanto de la calcita como de la aragonita, y el pH circundante. Existen tres mecanismos diferentes involucrados en la producción de biominerales: (1) *Mineralización controlada biológicamente*; ésta consiste en actividades celulares que dirigen específicamente la formación de minerales. En este proceso, los organismos controlan la nucleación y el crecimiento de los minerales. Los minerales se sintetizan directamente en un lugar específico dentro o sobre la célula, pero sólo bajo ciertas condiciones. (2) *Mineralización influenciada biológicamente* es el proceso mediante el cual, la precipitación mineral pasiva es causada por la presencia de materia orgánica de la superficie celular, como son las sustancias poliméricas extracelulares asociadas con los biofilms (o biopelículas). (3) *Mineralización biológicamente inducida*; es la modificación química de un ambiente por la actividad biológica que da como resultado la sobresaturación y la precipitación de los minerales (Dupraz *et al.*, 2009).

Algunos organismos con la capacidad de precipitar carbonatos son los cocolitofóridos, los foraminíferos y algunos moluscos que pueden formar depósitos de calcita. La mayoría de las especies del grupo de las algas coralinas incrustantes (CCA), rodolitos o articuladas, precipitan  $\text{CaCO}_3$  en forma de calcita rica en Mg. Los corales, las cianobacterias, las algas verdes y cafés precipitan aragonita normalmente (Dupraz *et al.*, 2009), y también la fanerógama marina *Thalassia testudinum* (Enríquez & Schubert 2014). La localización de los depósitos de los cristales, dependerá del organismo, por ejemplo: algunas algas tienen la capacidad de precipitar sobre su superficie. Por otro lado, las cianobacterias producen capas orgánicas donde precipitan los cristales de manera externa. Los corales, moluscos y foraminíferos precipitan sus carbonatos de manera extracelular. Existen otros organismos que pueden precipitar carbonato de manera interna ya sea en tejidos u otras estructuras, como algunas algas verdes y algas rojas. Los organismos pueden precipitar carbonatos diferentes de acuerdo a su especie. Se ha reconocido la existencia de hasta 60 biominerales distintos; entre ellos, cristales extracelulares o intracelulares que son generalmente inorgánicos. Asimismo, los cristales pueden contener elementos traza de compuestos orgánicos que pueden regular el proceso de biomineralización (Dupraz *et al.*, 2009).

Cabe mencionar que todavía no se conocen completamente los mecanismos de calcificación de muchos organismos arrecifales, inclusive el mecanismo fisiológico de los corales del orden Scleractinia. Estos corales son de los más estudiados debido a que son los principales constructores de la estructura primaria arrecifal y, por lo tanto, los primeros responsables de la acreción de este ecosistema. Sin embargo, lo que sí se sabe es que la calcificación en los corales escleractinios es un proceso de biomineralización externa, que está biológicamente controlado a nivel celular. Este no es un proceso físico-químico en su totalidad, ya que depende de las células calicoblásticas del hospedero. También depende de un transporte activo de calcio y de carbono inorgánico al sitio de la esqueletogénesis (calicoblasto). Por último, de una matriz orgánica que sirve como el sitio de nucleación de los cristales de  $\text{CaCO}_3$ . Todos estos procesos requieren de energía metabólica, que en su mayor parte proviene de la fotosíntesis de las algas simbiotas (McConnaughey et al., 1997; Dupraz et al 2009; Dupraz et al., 2005)

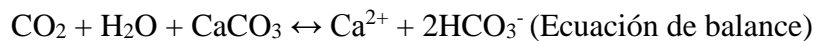
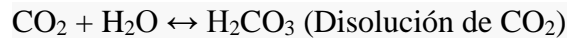
### **Calcificación en corales**

Además de las propiedades ya mencionadas de reflexión, muchos organismos sésiles marinos (p ej. los corales) utilizan el  $\text{CaCO}_3$  para formar estructuras en su base para el sostén y/o estructuras a lo largo del cuerpo para su protección mediante la utilización de los cristales de aragonita y calcita, por lo que la biomineralización es uno de los procesos biológicos más importantes del mundo (Furla et al., 2000). En el mar se encuentran los iones y los elementos necesarios para poder llevar a cabo el proceso de calcificación (Zhu y Dittrich, 2016). La alcalinidad total (AT) es una de las variables del sistema de carbonatos y del ciclo del carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ). Los mecanismos que controlan su variabilidad en diferentes ambientes marinos son importantes para comprender la biogeoquímica marina. Lewis y Wallace (1998) diseñaron un programa (CO2SYS) que permite calcular las cuatro variables medibles del sistema de carbonatos (Alcalinidad Total, Carbono inorgánico disuelto (CID), presión parcial de  $\text{CO}_2$  ( $\text{pCO}_2$ ) y pH).

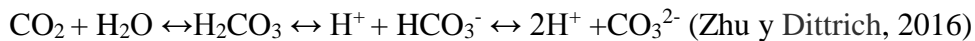
Actualmente, el pH estimado en los océanos es alrededor de 8.0-8.1 y la precipitación de carbonatos se incrementa a un pH mayor a 8.0, por lo que muchos organismos requieren de compartimentos o regiones donde “alcalinizan” aún más el medio para favorecer la

precipitación de carbonatos ( $\text{CO}_3^{2-}$ ). La calcificación depende en gran medida del “estado de saturación” del agua del entorno y cabe mencionar que el agua marina superficial es la de mayor concentración de carbonato cálcico. Por otro lado, los iones de calcio abundan en el océano, por lo que no son un factor limitante. Sin embargo, la cantidad de iones carbonato es más variable y escasa, por lo que puede limitar el proceso de calcificación (Kleypas et al., 2000; Gehlen et al., 2007; Fabry et al., 2008).

En este proceso los iones de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) se unen con iones de bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) además de agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ), para producir carbonato de calcio mineral ( $\text{CaCO}_3$ ) y protones (iones de hidrógeno,  $\text{H}^+$ ) en una serie de eventos;



La concentración de carbonatos ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) en el océano está ligada al ciclo del carbono, a través de una serie de reacciones químicas que transforman el  $\text{CO}_2$  atmosférico en diferentes especies químicas, este proceso es denominado sistema de carbonatos;



De esta forma, los carbonatos y los bicarbonatos que necesitan los organismos, están disponibles en el medio oceánico. Sin embargo, el valor de pH del agua de mar es 8.1, en el cual existe mucha más disponibilidad de  $\text{HCO}_3^-$  (90%) que de  $\text{CO}_3^{2-}$  (10%). Muchos organismos deben basificar el pH de manera local ( $\text{pH} > 9.3$ ) para poder precipitar el  $\text{CO}_3^{2-}$  (Furla *et al.*, 2000). Es importante considerar el estado de saturación de aragonita ( $\Omega_{\text{aragonita}}$ ), ya que la deposición de aragonita ( $\text{CaCO}_3$ ) en el agua de mar depende de que el producto de las concentraciones, en fase disuelta, de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{CO}_3^{2-}$ , sea mayor que la concentración en equilibrio del  $\text{CaCO}_3$  (Zhu y Dittrich, 2016). La concentración en equilibrio se denomina como constante producto-solubilidad ( $K_{\text{sp}}$ ), por lo tanto:

$$\Omega_{\text{aragonita}} = [\text{Ca}^{2+}]_{\text{océano}} \times [\text{CO}_3^{2-}]_{\text{océano}} / K_{\text{sp}}$$

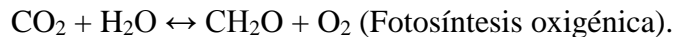
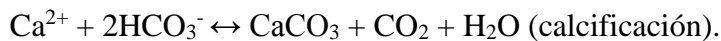


CaCO<sub>3</sub> se disuelve si:  $\Omega_{\text{aragonita}} < 1$

CaCO<sub>3</sub> precipita si:  $\Omega_{\text{aragonita}} > 1$

Debido a que la concentración de Ca<sup>2+</sup> permanece casi constante,  $\Omega_{\text{aragonita}}$  es proporcional a la concentración de iones CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>. Los esqueletos de los organismos se forman en condiciones de sobresaturación de CaCO<sub>3</sub> en el medio de calcificación. La calcificación es altamente dependiente de factores como la luz, la temperatura y el movimiento del agua, entre otros (Enríquez y Schubert, 2014). En todos los organismos calcificadores, la calcificación es dependiente de la temperatura pues son procesos enzimáticos, en los organismos fotosintéticos, la calcificación también depende de la luz por su dependencia de la actividad fotosintética y por tanto también de los factores ambientales que afectan a la fotosíntesis como el movimiento de agua. La calcificación y la fotosíntesis son procesos que están muy vinculados, y en el arrecife de coral hay una proporción muy importante de organismos fotosintéticos con capacidad de calcificar, algunos forman los “ladrillos” del arrecife de coral y muchos otros son productores de arena.

Las tasas de calcificación aumentan en organismos fotosintéticos a diferencia de aquellos que no lo son (por ejemplo, corales simbióticos vs corales no simbióticos) (Gattuso *et al.*, 2000). Las siguientes ecuaciones químicas muestran el proceso en el que la fotosíntesis se acopla con la calcificación



La anhidrasa carbónica, desempeña un papel clave en numerosos procesos fisiológicos ya que acelera el proceso de calcificación (Richier *et al.*, 2003). Existen diversos tipos de anhidrasas carbónicas, algunas solubles y otras unidas a la membrana plasmática, unas con actividad interna celular o en un organelo celular (i.e, mitocondria o cloroplasto), y también con actividad externa a la célula (Frost *et al.*, 2013). Esta enzima une el CO<sub>2</sub> con una molécula de H<sub>2</sub>O, para formar el HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, la especie química de carbono que se une con el Ca<sup>2+</sup> para formar el CaCO<sub>3</sub> (Furla *et al.*, 2000)

De acuerdo con Enríquez y Schubert (2014), la tasa de calcificación de *Thalassia*

*testudinum*, el pasto marino dominante en el Caribe y Golfo de México, se incrementa significativamente en condiciones de luz pero también se observa en oscuridad y cuando se inhibe la fotosíntesis. En iluminación, la calcificación aumenta al doble con respecto a las condiciones de oscuridad y de inhibición de la fotosíntesis. Este proceso que se conoce con el nombre genérico de “light-enhanced calcification” y se ha observado en muchos organismos fotosintéticos (Cohen et al., 2016). En el caso de la calcificación de *T. testudinum* también se ha documentado que aumenta con la temperatura a lo largo de un ciclo anual, sin embargo, otros factores ambientales no identificados todavía no explican su inhibición en un momento dado, ni cuando la actividad fotosintética está en condiciones óptimas en el verano (Enríquez & Schubert 2014). Este fenómeno de “desacoplamiento” entre la fotosíntesis y la calcificación también se ha documentado en corales (Comeau et al., 2016; Eyal et al., 2019). En estudios recientes de corales, se ha señalado también la importancia de la materia orgánica del esqueleto de carbonato en el proceso de calcificación, ya sea como una matriz extracelular orgánica con funciones estructurales para la dirección de la deposición de los cristales o por su importancia en la nucleación de cristales (Wooldridge, 2012).

Se le ha asociado con la biomineralización al determinar el crecimiento de cristales y su organización espacial (Ramos-Silva *et al*, 2014). En corales se ha observado que la inhibición de la síntesis de la matriz orgánica por emetina o cicloheximida detienen el proceso de calcificación, sin afectar la fotosíntesis o la respiración (Richier *et al*, 2003). Por lo tanto, las matrices orgánicas) tienen un papel importante estructural en la determinación de la forma del esqueleto de diversos organismos marinos, además de facilitar enzimas para algunos de los procesos de biomineralización (Richier *et al*, 2003). Sin embargo, aún se desconocen los organismos y los genes implicados en el proceso de calcificación de los biofilms bacterianos en los fragmentos inertes de los corales.

### **Estado actual de los arrecifes de coral en el Caribe Mexicano**

El Sistema Arrecifal Mesoamericano (MRS) es reconocido como una de las regiones más biodiversas del Caribe. Sin embargo, la complejidad estructural de los arrecifes coralinos ha disminuido de manera importante en los últimos 40 años. Se han reportado pérdidas de hasta el 80-90% en la complejidad, además de cambios en la diversidad y en la cobertura coralina

(Alvarez-Filip *et al.*, 2009). La degradación de los arrecifes se cuantifica a partir de los cambios de cobertura coralina, y su disminución resulta en la pérdida de complejidad estructural. En caso de que dicha población no tenga la capacidad de recuperarse o alguna nueva comunidad tenga la capacidad de conformar una complejidad similar, la función arrecifal comienza a presentar cambios (Mumby *et al.*, 2007; Alvarez-Filip *et al.*, 2011). Se han reportado estudios recientes que indican una pérdida en la cobertura coralina, al igual que la comunidad original del Caribe, responsable de la formación de la mayoría de los arrecifes. Esta comunidad se ha ido sustituyendo por otras con un menor crecimiento que reflejan una menor complejidad estructural en el arrecife.

La disminución coralina, especialmente la de los Acropóridos, tiene grandes consecuencias en el funcionamiento y la estructura de los arrecifes del Caribe Mexicano. Esto es debido a que, ninguna otra especie constructora de arrecifes combina la morfología de ramificación compleja y las altas tasas de calcificación (Young *et al.*, 2012). La mortalidad de *A. palmata* representa una pérdida sustancial en las tasas de producción de carbonato de los arrecifes del Caribe, pero sobre todo en la contribución de la comunidad coralina a la acreción del arrecife y a la generación de complejidad estructural en la parte somera de la comunidad coralina (Kennedy *et al.*, 2013; Perry *et al.*, 2013).

### ***Acropora palmata* en México**

*Acropora* es el género de corales que dominaban los sistemas coralinos en el Mar Caribe (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2014). La especie *A. palmata* pertenece a los llamados corales escleractinios, comúnmente conocidos como los corales duros o pétreos, debido a su capacidad de secretar un esqueleto de carbonato de calcio. Estas especies de coral habitan en los arrecifes tropicales de toda la región del Caribe y Golfo de México. Están consideradas dentro de las principales especies constructoras de arrecifes de coral en la parte somera del complejo coralino (Lighty *et al.*, 1982). Por su forma ramificada, crean una estructura compleja tridimensional que proporciona refugios a una gran diversidad de especies marinas (Rogers *et al.* 1982; Lirman *et al.*, 1999).

Estas especies han sufrido una fuerte regresión y están actualmente consideradas especies en peligro de extinción bajo la norma (NOM-059-SEMARNAT-2010). Son especies que se han mostrado altamente vulnerables frente a los cambios ambientales que

están afectando el Caribe, resultando a una creciente pérdida de su presencia en la cobertura coralina y en el subsecuente deterioro de hábitat. Entre los años 70s y 80s hubo un declive importante en las poblaciones de *Acropora* en el sureste de México que afectó severamente su área de distribución, presentando pocos signos de recuperación hasta la fecha (Grober-Dunsmore *et al.*, 2006). Esta situación coincide con la persistencia de enfermedades ya reportadas y con una mayor incidencia de enfermedades emergentes (banda blanca, parches de necrosis, etc.) (Vollmer y Kline, 2008); donde se reportaron pérdidas en la cobertura del 50 al 100% dependiendo de la localidad (Tunnell, 1992). Aunque en el Caribe no fue masiva la disminución en la cobertura coralina, aún quedan varios parches de fragmentos calcáreos de *Acropora palmata* muertas (Jordán-Dahlgren y Rodríguez-Martínez, 2003). Algunas de las colonias pueden permanecer frágiles en caso de que la población siga sujeta a perturbaciones constantes, por lo que se ha observado que la ruptura de las ramas del coral sin la capacidad de regenerar el tejido perdido, lleva a la muerte del holobionte. La pérdida en la cobertura coralina de *A. palmata* y la subsiguiente erosión de sus esqueletos calcáreos, tienen un impacto directo en la heterogeneidad espacial de los arrecifes del Caribe, lo que puede provocar disminuciones en la biodiversidad, comprometer la productividad de la pesca y reducir la protección costera de la energía de las olas (Alvarez-Filip, 2009). Actualmente, *A. palmata* ya se encuentra catalogada dentro de la lista de especies en peligro crítico de la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza. Además, está ubicada en la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas (CITES) (Dodge *et al.*, 2008; Carpenter *et al.*, 2008). El coral está compuesto por el conjunto de pólipos, el dinoflagelado y el microbioma que conforman el holobionte. Este holobionte tiene la capacidad de secretar una mucosidad en la cual abundan diversos microorganismos, además de comunidades que se pueden albergar en cavidades del esqueleto calcáreo y dentro de células del pólipo (Sweet *et al.*, 2011).

### **El holobionte de *Acropora***

La mucosidad que secreta *Acropora* está compuesta principalmente por carbohidratos, lípidos (4.2%) y aminoácidos como la serina y la treonina. Entre los carbohidratos se encuentra la arabinosa, N-acetyl-glucosamina, manosa, glucosa, galactosa y fucosa (Alagely *et al.*, 2011). Esta mucosidad tiene dos funciones: funge como zona receptora para

determinar que poblaciones de bacterias permanecen asociadas, y tanto el polímero como algunas moléculas de bajo peso molecular sirven como fuente de alimento para los microorganismos comensales (Alagely *et al.*, 2011). La versatilidad metabólica y fisiológica de las bacterias les dan robustez, prevalencia y adaptación a las comunidades de los hospederos del arrecife (Stolz, 2000). También, influyen de manera importante los procesos biogeoquímicos y la productividad dentro del ambiente arrecifal. Estas son fundamentales para la estabilidad del ecosistema, ya que son determinantes en el establecimiento de cadenas alimenticias, de los ciclos de vida de los organismos, de los ciclos químicos y de los ciclos de nutrientes (Ainsworth *et al.*, 2010). Además, tienen un papel importante en el reclutamiento y metamorfosis de larvas de nuevos organismos (p.ej. el tetrabromopirrol (TBP) producido por bacterias del género *Pseudoalteromonas* que induce el asentamiento de las larvas de los corales), la degradación de la materia orgánica, el reciclaje de los nutrientes, la colonización y la diversidad de las especies a través de señales químicas de las comunidades benthicas (Ainsworth *et al.*, 2010, Negri *et al.*, 2004, Harder *et al.*, 2014, Uthicke *et al.*, 2011b).

Las bacterias presentes en la mucosidad de corales como *A. palmata* (p.ej. *Pseudoalteromonas* sp. y *Marinobacter*) protegen al hospedero y al dinoflagelado de patógenos, ocupando nichos específicos y produciendo antibióticos que regulan e inhiben el crecimiento de bacterias y/o sus factores de virulencia que causan enfermedad en los corales (p.ej. *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus pumilus*, virus, levaduras, entre otros) (Zinjarde *et al.*, 2011, Ainsworth *et al.*, 2010, Alagely *et al.*, 2011, Sweet *et al.*, 2011). De acuerdo a Beltrán (2016), las bacterias que predominan en *A. palmata* son las Proteobacterias, Bacteroidetes, Planctomycetes, y en menor proporción Cianobacteria y Actinobacteria.

Los efectos globales del cambio climático están alterando a las poblaciones de *Acropora* en México, lo cual ha provocado fenómenos de blanqueamiento, una reducción en las tasas de crecimiento y una mayor incidencia de enfermedades (Jordán-Dahlgren y Rodríguez-Martínez, 2004). La presencia y la abundancia de especies bacterianas en las mucosidades de diversas especies de coral, dependen de propiedades físicas y de parámetros químicos. Estas condiciones incluyen la cantidad y calidad de luz, la temperatura, la salinidad, la presión atmosférica (profundidad) y el pH (Stolz, 2000). Al presentarse

condiciones limitantes y estresantes (aumento en temperatura, cambios en salinidad, enfermedades, sedimentación, etc.), se pierde la asociación simbiótica, el coral se blanquea con altas probabilidades de muerte sino se recuperan las condiciones favorables para su crecimiento, lo que en consecuencia produce la formación del biofilm en los restos calcáreos (Shinzato *et al.*, 2014, Hawkins *et al.*, 2013). Los estudios de Alagely (2011), revelan que, en corales previos a estar sujetos a condiciones de estrés, las bacterias que expresan pocos genes de virulencia pueden cambiar su metabolismo y pasar a otro estado metabólico que aumenta la expresión de genes involucrados en la patogénesis. Al cambiar la composición bacteriana de las mucosidades del coral, también se afecta la fertilización y el asentamiento de larvas de coral de manera indirecta, ya que modifica la química y/o el sustrato preferido de algunas especies (Negri *et al.*, 2013).

En conclusión, los efectos globales del cambio climático están alterando a las poblaciones de *Acropora* en México, lo cual ha provocado fenómenos de blanqueamiento, una reducción en las tasas de crecimiento y una mayor incidencia de enfermedades (Jordán-Dahlgren y Rodríguez-Martínez, 2004).

### **Problemática ambiental de los ecosistemas coralinos**

Los arrecifes de coral están degradándose rápidamente a escala global debido a la combinación de diversos factores: cambios ambientales, sobreexplotación, enfermedades del coral y la eutrofización del agua del océano, resultando en la pérdida de su hábitat y biodiversidad (Hoegh-Guldberg *et al.*, 2007, Barott *et al.*, 2011, Shinzato *et al.*, 2014). Cuando existen cambios en el ambiente como el aumento de temperatura, la disminución del pH, la cantidad y calidad de luz, los nutrientes, las fuentes de carbono, la salinidad y la presión, pueden afectar directa o indirectamente a los corales. Dichas perturbaciones pueden o no ser reversibles, pero podrían involucrar procesos como el blanqueamiento coralino o implicaciones en el crecimiento del coral (Hoegh-Guldberg *et al.*, 2007). Dentro del ciclo de vida del coral, éste coloniza un sustrato, crece, se reproduce y muere. Dicho crecimiento forma la complejidad de los arrecifes. Sin embargo, evidencia reciente revela que el crecimiento de los corales ha disminuido formando una menor cantidad de “ladrillos arrecifales”. Lo que sugiere una menor cobertura coralina y un estado de regresión en el arrecife. En su mayoría, los fragmentos de diversas especies coralinas llegan a formar arena.

No es el caso de los restos calcáreos de *A. palmata*, los cuales por su gran densidad y tamaño, resulta más complicada su erosión manteniendo su estructura (Edwards, 2010; Arribas *et al.*, 2007).

Existen diversos tipos de estrés (agudos y crónicos) que afectan a los corales. Los agudos pueden considerarse de poca duración como lo es un ciclón, el cambio de temperatura de manera estacional o eventos como “El Niño”. Los crónicos son de períodos prolongados y difícilmente recuperan su estado original. Un ejemplo de efecto crónico es el aumento de temperatura por calentamiento global. El estrés se puede ver reflejado en la apoptosis de células con simbiosomas, la digestión o la expulsión del dinoflagelado causando el blanqueamiento coralino (Berges *et al.*, 2004; Bozec *et al.*, 2015).

En caso de los impactos agudos, existe la posibilidad de que el coral pueda recuperar su estado inicial antes de la perturbación si las condiciones son las adecuadas. Sin embargo, en las perturbaciones crónicas, la composición microbiana de la mucosidad se ve alterada cuando el holobionte comienza a enfermarse, y en conjunto con la pérdida del endosimbionte, provocar el blanqueamiento del coral que, en algunas condiciones, termina con la muerte del cnidario, afectando la sobrevivencia y la productividad de los arrecifes de coral (Shinzato *et al.*, 2014, Hawkins *et al.*, 2013). El impacto del daño dependerá del tiempo y la intensidad de dichas condiciones (Barnes *et al.*, 1999). Dicho escenario provocaría un cambio en la homeostasis de las colonias de coral volviéndolas vulnerables y dominadas por algas con capacidad de un desarrollo estable (Canadell *et al.*, 2007; IPCC, 2007). Además, se afectaría la productividad, los ciclos de nutrientes y se incrementarían las enfermedades en corales causadas por bacterias patógenas (Uthicke *et al.*, 2011b). Las enfermedades de los corales han ido en aumento los últimos 20 años debido a un incremento en la temperatura, los contaminantes y la disminución en la calidad del agua (ej. los detergentes y los agentes patogénicos presentes en el drenaje), lo que permite la proliferación del crecimiento microbiano oportunista y la formación de biofilms (NMFS, 2001, Rohwer *et al.*, 2001; Wingender *et al.*, 2010). De acuerdo a Alvarez-Filip (2009), la cobertura coralina a lo largo del arrecife en el Caribe Mexicano, ha disminuido en los últimos 30 años, lo que conlleva a investigar qué clase de organismos colonizan estos remanentes calcáreos y qué rol desarrollan en el ecosistema emergente.

## **Los microorganismos asociados a los arrecifes de coral**

Actualmente, no se tiene caracterizada la diversidad de especies ni funciones de microbiomas presentes en los arrecifes de coral. De igual manera, se desconoce qué tan específicas son las comunidades microbianas a las especies de coral, qué determina su conformación y su papel en los procesos biogeoquímicos del arrecife y de cada comunidad y/o colonia. Se cree que las bacterias son fundamentales para mantener la funcionalidad y estabilidad de las comunidades coralinas y de muchos otros organismos como las esponjas. Por ejemplo, los simbioses de coral pueden brindar “servicios” al holobionte como: fijar nitrógeno y carbono, degradar materia orgánica y regular poblaciones de microorganismos a partir de antibióticos, entre otros. Existen reportes que sugieren que las comunidades microbianas y sus metabolismos tienen un papel fundamental en la función del arrecife, ya que interactúan de manera compleja con otros organismos. Asimismo, éstas pudieran influenciar de manera importante los procesos biogeoquímicos y ecológicos dentro del ambiente coralino, las cadenas alimenticias, los ciclos de vida de organismos, los ciclos químicos, los ciclos de nutrientes, entre otros. Varios reportes sugieren que más de un 90% de microorganismos no son cultivables, por lo que parece inevitable el empleo de técnicas moleculares como las ómicas para resolver muchas de las incógnitas que aún quedan por descubrir en la asociación entre los microorganismos y los arrecifes de coral.

## **ANTECEDENTES**

Hasta hace relativamente poco, se han encontrado restos de fragmentos de *Acropora* pegados al sedimento, por lo que se cree que las bacterias y otros microorganismos pudieran estar implicados en la re-colonización de estas estructuras (Beltrán *et al.*, 2016). La colonización microbiana en estas estructuras es de gran relevancia en los procesos ecológicos dentro del ecosistema (p ej. ciclaje de nutrientes), aunque aún no se tenga el conocimiento suficiente en cuanto a su composición ni a su metabolismo (Ainsworth *et al.*, 2010).

Diversos estudios revelan que las bacterias asociadas a los corales difieren de aquellas encontradas en la columna de agua y éstas de las encontradas en fragmentos calcáreos, lo que sugiere que existe especificidad entre los microorganismos y los corales



(Sweet *et al.*, 2011; Beltrán *et al.*, 2016). Actualmente, existen reportes de la relación que hay entre microorganismos y la precipitación de carbonato. Estos reportes han permitido comprender el papel fundamental de los microorganismos (principalmente procariontes) para la precipitación o disolución de carbonatos (Zhu y Dittrich, 2016). En el trabajo de Beltrán *et al.*, (2016), se identificó la diversidad de Bacterias y Arqueas utilizando la técnica de 16S rDNA de los biofilms en los restos calcáreos de *A. palmata*. Además, se observaron los cambios en abundancia y composición microbiana de dichas estructuras en escenarios de cambio climático (incremento de temperatura y pH ácido).

De acuerdo a los resultados de Beltrán *et al.*, (2016), se encontró que Gammaproteobacteria y Alphaproteobacteria son los grupos de organismos con una mayor abundancia en las estructuras fragmentadas del coral muerto, seguidas por Deltaproteobacteria las cuales se encontraron en una menor proporción. En estas estructuras también se encontró una mayor abundancia de algas verdes y rodofitas, mientras que las estramenófilas se encontraron en menor proporción. Este trabajo mostró que la composición microbiana asociada a *A. palmata* sana es menos diversa y diferente a la composición microbiana del biofilm que coloniza los esqueletos de *A. palmata*. Igualmente, mostró que los microorganismos que colonizan los restos de *A. palmata* no se ven afectados en su composición ante escenarios de disminución del pH y aumento de la temperatura, sugiriendo que estos biofilms microbianos seguirán colonizando los restos de *A. palmata* ante condiciones de cambio climático (Beltrán *et al.*, 2016). La función que desarrollen en los arrecifes dependerá de las condiciones ambientales a las que pudiesen estar expuestas en un futuro como la luz, temperatura, pH, nutrientes, corrientes, etc.

Actualmente, se desconocen los procesos de selección al momento de colonizar las estructuras calcáreas de los restos coralinos, la composición total de los microorganismos involucrados en los biofilms y su cambio con el tiempo, además de las rutas metabólicas presentes y el papel que realizan en los arrecifes de coral. Sin embargo, se sabe que las bacterias asociadas al holobionte de *Acropora* en un arrecife sano, tienen la capacidad de proteger al hospedero de patógenos a través de compuestos antimicrobianos, en donde se han reconocido a través de cultivos microbiológicos a tres grandes grupos: Firmicutes, Gammaproteobacteria y Actinobacteria (Nithyanand *et al.*, 2009). Actualmente, comienza el interés de investigar la composición de la microbiota asociada a los corales, pero no así a

los fragmentados calcáreos colonizados por biofilms, por lo que en este proyecto se pretende profundizar en la dinámica, la producción y los procesos de los consorcios microbianos asociados a estos fragmentos.

## **JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA**

El presente proyecto determinó la composición y el posible papel ecológico que tienen los biofilms microbianos que se establecen en los restos calcáreos de *A. palmata* en el arrecife de coral. *A. palmata* es la especie coralina más abundante en el Arrecife Mesoamericano, pero ha sufrido grandes eventos de mortandad masiva (Aronson y Precht, 2001; Alvarez-Filip, 2016). Las poblaciones a lo largo del Arrecife Mesoamericano no han logrado recuperar la distribución ni la abundancia que tenían antes de la década de 1980 (Rodríguez-Martínez, 2014). Jordán-Dahlgren (1985), realizó una descripción de la cobertura coralina y de *Acropora* en varios arrecifes del Caribe Mexicano (tanto para la zona frontal del arrecife como para la posterior), entre ellos en Puerto Morelos. Este estudio encontró con base en monitoreos realizados a lo largo de diferentes años que, en 1985 la zona frontal del arrecife tenía una cobertura de coral de 19%, y *Acropora* constituía el 50% del total de esta cobertura. Sin embargo, para el 2016 los acropóridos apenas abarcaban el 10% de la cobertura total. En el caso del arrecife posterior, la cobertura de coral era mayor en 1985 ya que la cobertura de *Acropora* ocupaba el 30%, a diferencia del 2016 en el que la cobertura de *Acropora* no abarcaba ni el 1% del total (Alvarez-Filip, 2016).

Al momento de fracturarse, algunas de las estructuras coralinas de *A. palmata* son rápidamente (en cuestión de semanas) colonizadas por biofilms bacterianos que precipitan carbonatos, cementando entre sí fragmentos de coral. A la fecha sabemos que el biofilm que crece sobre estas estructuras en deterioro es diferente y mucho más diversa a la mucosidad que se encuentra en los corales sanos (Beltrán *et al.*, 2016). Por lo tanto, la presencia de bacterias y el ambiente favorable que generan para lograr la producción de EPS, mineralización y la cementación de las rocas coralinas es un tema novedoso y de gran importancia que debe de seguir desarrollándose de manera más detallada.

El metabolismo microbiano de las comunidades que habitan en el arrecife de coral tiene gran relevancia en los procesos ecológicos dentro del ecosistema arrecifal, pero éstas

comunidades son poco conocidas (Ainsworth *et al.*, 2010). En este proyecto se analizó el metagenoma de las estructuras fragmentadas y colonizadas por biofilms de restos calcáreos de *A. palmata*. A partir de dichos análisis se podrán catalogar rutas metabólicas potencialmente involucradas en los sistemas arrecifales y permitirá conocer la diversidad aproximada en los fragmentos colonizados por biofilms, así como las abundancias por rango taxonómico. Entender la diversidad bacteriana asociada a los fragmentos colonizados por biofilm y sus interacciones en los procesos biogeoquímicos resulta fundamental para predecir el cambio funcional de los arrecifes de coral, los cuales se encuentran entre los reservorios más grandes de carbono.

## **PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN**

Esta tesis integra técnicas de investigación para responder dos preguntas principales:

- (1) ¿Cuál es la composición taxonómica de los biofilms que colonizan a los esqueletos de coral de *A. palmata*?
- (2) ¿Qué rutas metabólicas se encuentran asociadas a los biofilms colonizadores de esqueletos de *A. palmata*?

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

- Se determinará la diversidad y los metabolismos asociados a la pedacería de restos calcáreos de *Acropora palmata* mediante técnicas de metagenómica y ecofisiología.

### **Objetivos Específicos**

- Resumir el conocimiento sobre la problemática que enfrentan los arrecifes coralinos en México.
- Caracterizar la composición microbiana y funciones metabólicas estimadas por metagenómica de biofilms que colonizan los fragmentos calcáreos en la Bocana.

- Determinar la composición relativa de los organismos presentes en los fragmentos colonizados por biofilms en la Bocana.
- Identificar las rutas metabólicas a partir de la identificación de enzimas pivotaes y genes específicos en las secuencias obtenidas por medio del metagenoma en la Bocana.
- Determinar la abundancia de las rutas metabólicas identificadas por metagenómica, presentes en los fragmentos colonizados por biofilms en la Bocana.
- Cuantificar la composición elemental (C, N y P) en fragmentos colonizados por biofilms y determinar el tipo de biomineral precipitado por el biofilm en Bocana.
- Determinar los nutrientes presentes en la columna de agua de Bocana.

## **HIPÓTESIS**

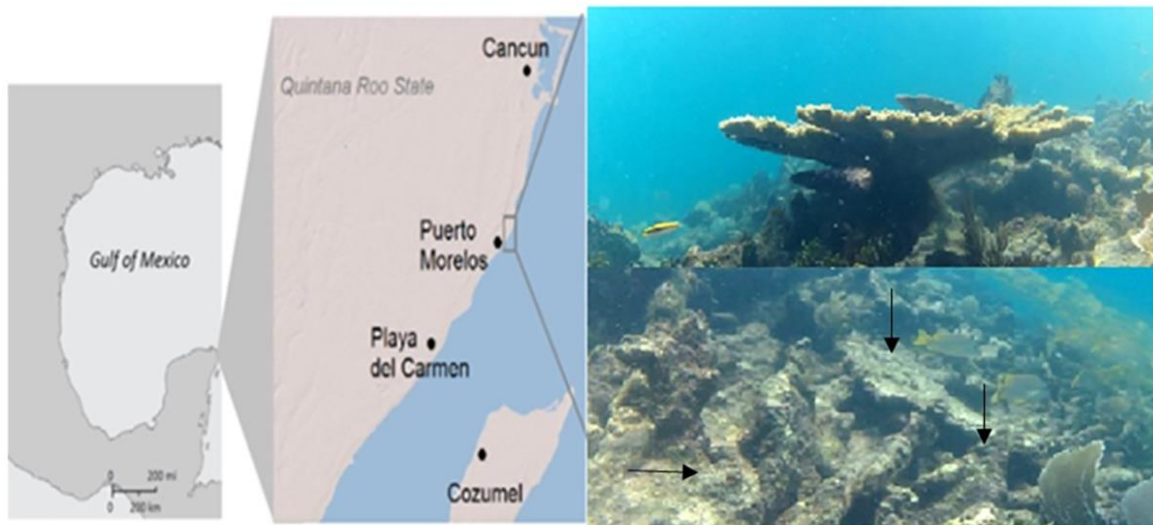
- Ho: La composición predominante en la pedacaría de coral estará asociada a organismos eucariontes comúnmente encontrados en los arrecifes, como los corales.
- Ha: Los ensambles que colonizan la pedacaría de *A. palmata* serán predominantemente bacterianos, aunque habrá componentes eucariontes y virales.
- Ho: Al ser un ecosistema tropical y somero, el componente funcional predominante de la pedacaría de coral estará asociado a los metabolismos comúnmente encontrados en arrecifes “sanos” como la fotosíntesis oxigénica y la fijación de nitrógeno.
- Ha: La comunidad asociada a la pedacaría de coral tendrá un componente de degradación de la materia orgánica.

## **ÁREA DE ESTUDIO**

Puerto Morelos, es una localidad ubicada al norte del estado de Quintana Roo, aproximadamente unos 33 km al sur de Cancún y 35 km al norte Playa del Carmen. El clima es cálido sub-húmedo con una temperatura promedio anual de 26.3°C, un máximo en el verano de 35.5°C y un mínimo en invierno de 13°C. Se caracteriza por una laguna arrecifal

localizada a los 20°50'50.5 latitud norte y 86°52'30.6 longitud oeste (Instituto Nacional de Ecología, 2000; Coronado *et al.* 2007). El arrecife estudiado es la Bocana, el cual se encuentra localizado a 20° 52' 32" latitud norte y 86° 51' 02" longitud oeste.

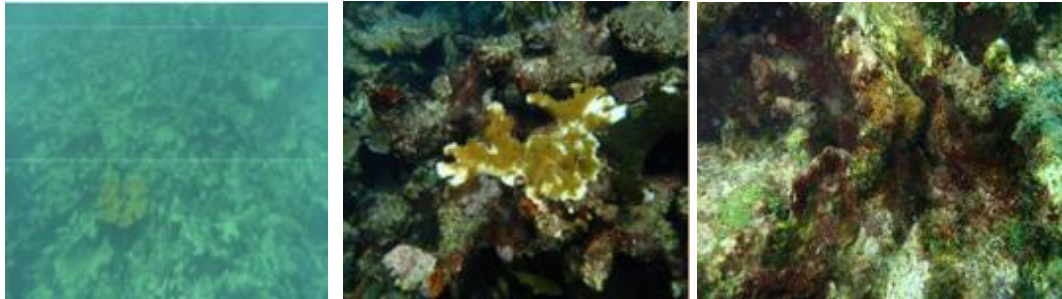
El arrecife de La Bocana, forma parte de la barrera arrecifal denominada “Gran Cinturón de Arrecifes del Atlántico Occidental”, la cual es la segunda más grande del mundo (Carabias *et al.*, 2000). La laguna se define por una línea de costa y por una barrera arrecifal litoral de alrededor de 5.5 km de longitud, la distancia varía entre 350 y 1600 m de la línea de costa (Jordán-Dahlgren, 1993). En cuanto a la profundidad, oscila entre 2 - 8m con un promedio entre tres y cuatro metros (Coronado *et al.* 2007). El agua dentro de la laguna mantiene una temperatura ~30 °C en verano (agosto-septiembre) y en invierno desciende hasta 24-25°C (diciembre-enero). La salinidad promedio es de 35.7 y el agua se mantiene aproximadamente con un pH de 8.19 (Coronado *et al.* 2007; Sheufen *et al.*, 2017).



**Figura 2. Ubicación geográfica (izquierda) de puntos de muestreo dentro del área de estudio "La Bocana" en el sistema de arrecifes de Puerto Morelos, Quintana Roo (el recuadro superior derecho muestra una colonia viva de *A. palmata* y las estructuras de pedacería (acumulación de esqueletos de coral muertos) de *A. palmata* de la derecha inferior).**

Este estudio se centra en los fragmentos colonizados por biofilm de los restos calcáreos de *A. palmata*, dentro de la formación arrecifal “La Bocana” que se ubica en las

cercanías de la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales, UNAM en Puerto Morelos, Q. Roo.



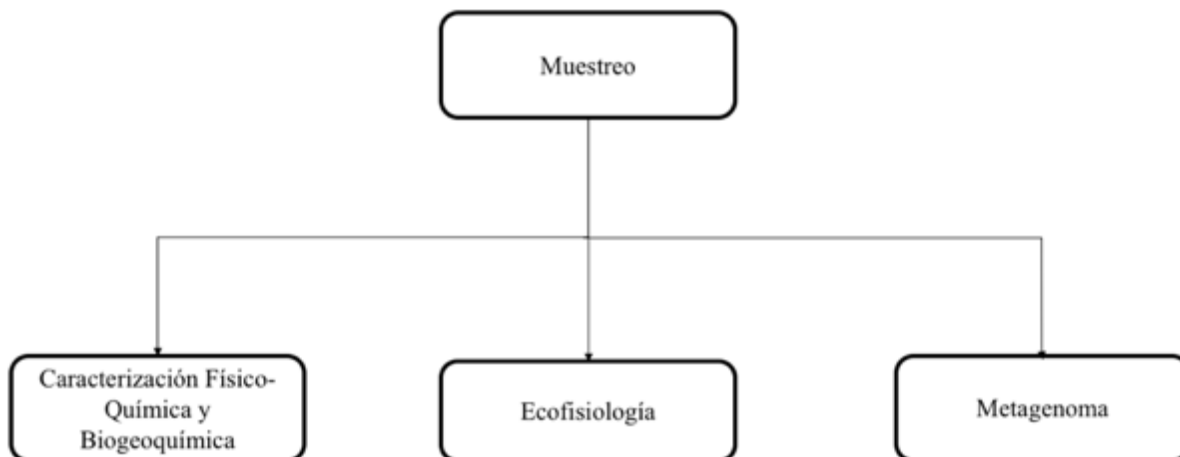
**Figura 3.** Se observa en el lado izquierdo una *A.palmata* sana rodeada por restos calcáreos colonizados por biofilm. Al centro, los restos de una *A. palmata* en proceso de deterioro y a la derecha restos calcáreos colonizados por biofilm.

## **Materiales y Métodos**

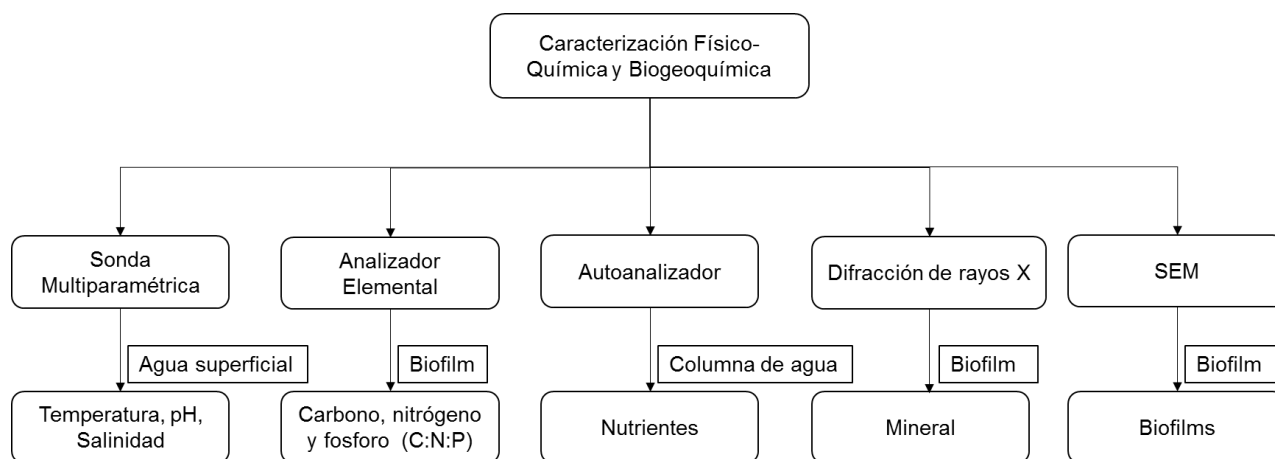
### **Colecta de muestras**

Todas las muestras se obtuvieron entre julio y agosto de 2015 de 9:00 h a 13:00 h utilizando el barco de La Unidad Académica de Sistemas Arrecifales (UASA). Todas las muestras se recolectaron cada 10 m en una sola línea de transecto hacia el norte, desde el punto de partida de 20° 52' 32"N y 86° 51' 02" O utilizando equipo de buceo, un martillo, un cincel y guantes. Se recogieron muestras de 6 puntos diferentes tomando 3 réplicas de la pedacería del coral en "Bocana Grande" a una profundidad alrededor de 3-5 m. Parte de las muestras se mantuvieron en hielo durante el viaje y a -20° C después de llegar a La Unidad Académica de Sistemas Arrecifales (UASA); mientras que, la otra parte se mantuvo en agua originaria de la "Bocana" para la fijación de nitrógeno y los ensayos de metanogénesis.

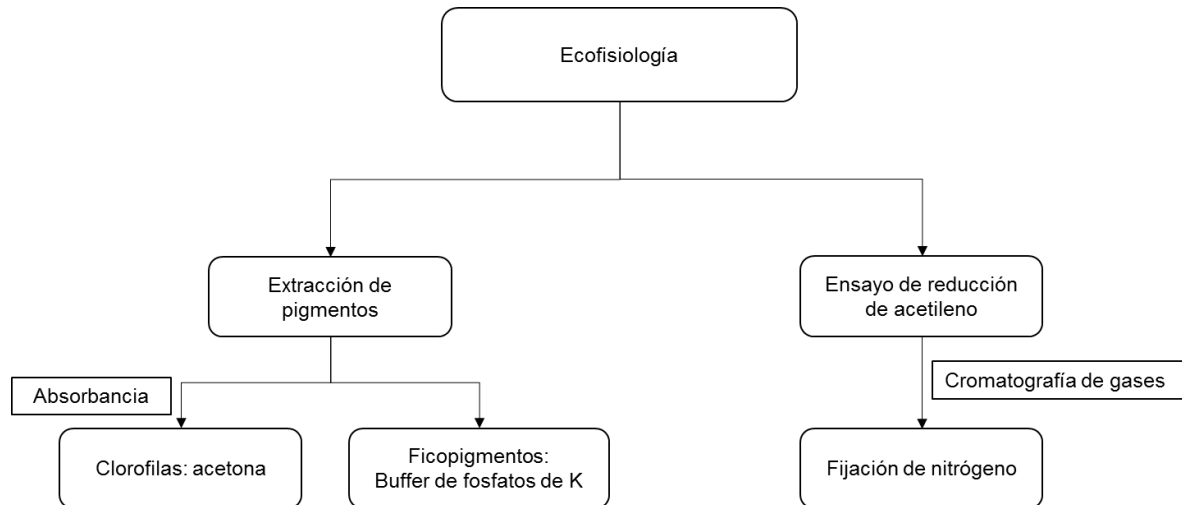
El proyecto se dividió en 3 etapas después de realizar el muestreo: Caracterización Físico-Química y Biogeoquímica, Ecofisiología y Metagenoma (Figura 4). Cada una dividida en sub-secciones las cuales se describen a continuación (Figura 5-7).



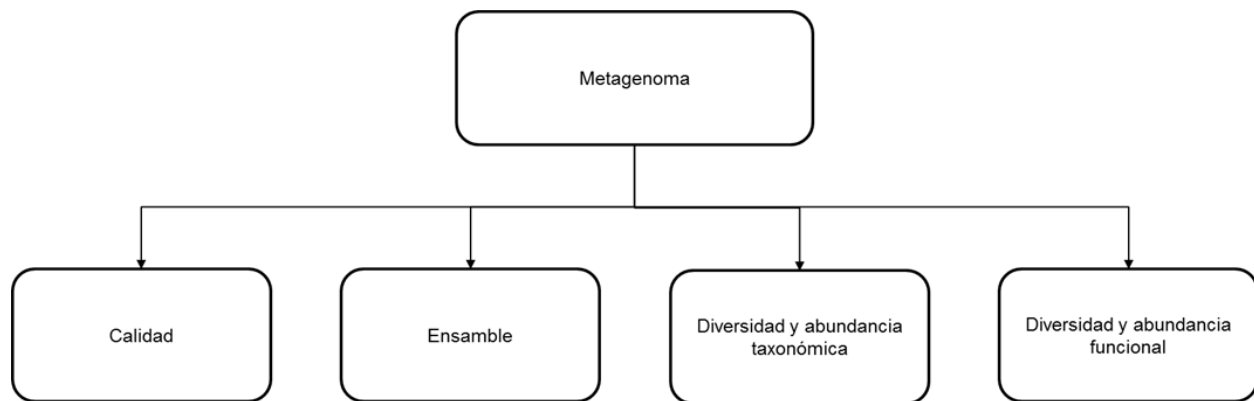
**Figura 4. Diagrama de flujo indicando las fases de la metodología de las tres secciones principales del proyecto.**



**Figura 5. Sección metodológica de caracterización Físico-Química y biogeoquímica desglosado en cada una de sus sub-secciones.**



**Figura 6. Sección metodológica de caracterización ecofisiológica desglosado en cada una de sus sub-secciones.**



**Figura 7. Sección metodológica de metagenómica desglosada en cada una de sus sub-secciones.**

### **Sonda multi-paramétrica**

Se utilizó una sonda multi-paramétrica para medir pH, temperatura y conductividad en la superficie de la zona de muestro llamada “La Bocana”.



## **Nutrientes**

Se tomaron seis muestras de 30 ml de agua superficial en recipientes debidamente lavados en el punto de muestreo de la Bocana. Las muestras fueron divididas en dos grupos, cada uno con tres envases de 30 ml con agua de la localidad. Para el primer grupo de muestras, se utilizó 30 ml de agua pre-filtrada con membranas de nitrocelulosa (0.22  $\mu\text{m}$ ) al que fueron agregadas tres gotas de cloroformo y se mantuvieron congeladas hasta su análisis. La determinación de la concentración de SRP (fósforo soluble reactivo), amonio, nitrato y nitrito fue determinada para este primer *set* de muestras, utilizando un analizador de flujo segmentado (Skalar San Plus, Skalar) con los métodos estándar adaptados por Grashoff *et al* (1983) y siguiendo los circuitos de Kirkwood (1994). Para el análisis de nitrógeno total y fósforo total de las muestras de agua, se utilizó el segundo *set* de muestras las cuales no fueron filtradas; sin embargo, se mantuvieron congeladas hasta su análisis. Para el análisis de este segundo grupo, se utilizó el método de Valderrama (1981). Los análisis fueron realizados con el apoyo del Laboratorio de Biogeoquímica Acuática, en el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM.

## **Análisis elemental (C, N y P) de los fragmentos colonizados por biofilm.**

Se obtuvieron los valores orgánicos de C, N y formas disponibles del P en el laboratorio de Química Acuática del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. Para el análisis elemental de los fragmentos deteriorados se extrajeron secciones de la parte superficial de aproximadamente 1  $\text{cm}^3$  que fueron mantenidas en congelación y obscuridad hasta su análisis. Posteriormente, las muestras fueron secadas a 12°C en vacío en el Savant SpeedVac drier (Whaltham, MA, USA) durante al menos 3 horas. Una vez secas, fueron maceradas con mortero y pistilo hasta quedar en polvo. Se obtuvo 20 mg de esta mezcla (n=3 para cada tipo de muestra de fragmento de coral deteriorado) para estimar su composición elemental de C y N (en un Analizador elemental PerkinElmer 2400) y de P por una oxidación con persulfato a alta temperatura (Valderrama, 1981). Para estimar la composición elemental del componente orgánico de los fragmentos deteriorados de *A. palmata*, se removieron los carbonatos, incubando aproximadamente 150 mg de la mezcla seca y macerada de cada fragmento de coral con ácido clorhídrico 1.5 N en tubos de ensayo. Estas fueron colocadas en parrillas a 40°C dentro de la campana de extracción. Una vez que todo el líquido se

evaporó, las muestras fueron resuspendidas en agua desionizada y centrifugadas por 20 minutos a 4000 x g a temperatura ambiente. El sobrenadante fue recuperado para analizar formas disueltas y particuladas de N y P y los pellets fueron secados a 50°C y mantenidos en un desecador hasta su análisis. Los pellets del componente orgánico en su totalidad (de aprox. 15 mg) fueron utilizados para su análisis elemental de C y N, así como su análisis por el método de Valderrama de nitrógeno total y fósforo total.

### **Análisis de difracción de rayos X del biofilm vs Coral**

Se realizó un análisis de difracción de rayos X en el Instituto de Geología dentro del departamento de Geoquímica de la UNAM con el fin de caracterizar el tipo de mineral encontrado en los fragmentos calcáreos colonizados por biofilms. Se maceró alrededor de 5g de muestra de *A. palmata* sana y del fragmento colonizado por biofilm. Para caracterizar el tipo de mineral encontrado en los fragmentos deteriorados de coral, se utilizó un Difractómetro EMPYREAN equipado con filtro de Ni, tubo de cobre de foco fino y detector PIXcel3D, la medición se midió en el intervalo angular  $2\theta$  de 5° a 70°.

### **Protocolo de extracción de material genético**

Aproximadamente 5 g de cada una de las muestras se maceró con nitrógeno líquido y buffer de extracción (100 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, 100 mM EDTA pH 8), con 1% de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) al 6%, siguiendo tres ciclos continuos de congelación-descongelación. Posteriormente, las muestras se incubaron durante 30 min a 37°C con lisozima (30 mg mL<sup>-1</sup>; Sigma Aldrich, Carlsbad, CA). Después, se les adicionó 3 mL de duodecilsulfato sódico (SDS) al 20% y proteinasa K (10 mg mL<sup>-1</sup>; Sigma Aldrich), dejándolos toda la noche en incubación a 55°C. Los ácidos nucleídos se extrajeron dos veces con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y una vez con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), recuperando el sobrenadante después de cada centrifugación (8000 rpm por 15 min). Posteriormente, el producto se limpia con DNeasy Blood & Tissue Kit® y se precipita una última vez con 0.1 del volumen de acetato de sodio 3M y 1 volumen de etanol absoluto.

## Metagenómica

Después de la extracción, todas las muestras se agruparon para preparar una biblioteca metagenómica única utilizando el kit de preparación de la biblioteca Nextera DNA Flex (Illumina, San Diego, CA). En dicha preparación se insertaron fragmentos de ADN total (1 µg) en vectores y se secuenciaron con tecnología de secuenciación del genoma completo. (HiSeq 2 x 150), en el Centro de Ciencias Genómicas de Yale Keck. Una vez obtenidas las secuencias, se utilizaron dos estrategias de anotación de las cuales se obtuvieron resultados similares una vez que fueron comparadas: MG-RAST (Keegan *et al.*, 2016) portal (<https://www.mg-rast.org/index.html?stay=1>) para la anotación taxonómica y una “estrategia manual” para las vías metabólicas. Se recuperaron un total de 168,585,058 lecturas y permanecieron 146,635,889 después del filtrado de calidad dentro de MG-RAST. Se descartaron todas las secuencias de Enterobacteria phage phiX174 sensu lato ya que es una contaminación común en Illumina NGS (Mukherjee *et al.*, 2015). Las secuencias obtenidas están disponibles en MG-RAST bajo el número de acceso (mgs696720).

Para la "estrategia manual", la calidad de las secuencias se evaluó con FASTQC (Andrews, 2010). Los cortes de calidad se hicieron utilizando el programa Trimmomatic, en donde se optó por mantener secuencias de al menos 20 Phred score (Bolger y Giorgi, 2014) y se reevaluaron con FASTQC. Posteriormente, se comparó el mejor ensamble utilizando los programas: MEGAHIT (Li *et al.*, 2015), IDBA-UD (Peng *et al.*, 2012) y metaSPAdes (Nurk *et al.*, 2017). Una vez obtenidos los ensamblajes, se compararon con el programa QUAST (Gurevich *et al.*, 2013) y se decidió continuar con el ensamble obtenido a través de IDBA-UD (1,952,389 contigs). Para la predicción de genes y la agrupación de reads, se utilizaron los programas Prodigal (1,895,953 secuencias) y CD-HIT (1,771,109 agrupaciones), respectivamente (Hyatt *et al.*, 2010 and Fu *et al.*, 2012) (Anexo 2). La anotación se realizó utilizando Ghost-Koala (Kanehisa *et al.*, 2016) (<https://www.kegg.jp/ghostkoala/>). Para identificar los organismos implicados en las rutas metabólicas de interés, es decir aquellos asociados a ciclos biogeoquímicos del C, N y S, seguimos la anotación de la clasificación dentro de la categoría de "metabolismo energético" en el KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>).

Se implementó una clasificación de rutas metabólicas por genes únicos y específicos de cada ciclo biogeoquímico (metabolismo del nitrógeno, metabolismo del azufre,

metabolismo del metano, fijación del carbono y fotosíntesis). Esto con el fin de evitar la cuantificación de más de un gen dentro de una misma ruta metabólica (p ej. el ciclo del nitrógeno), evitando un sesgo en su cuantificación. Por lo tanto, aquellos genes encontrados en 2 o más módulos de la misma vía metabólica fueron descartados.

**Tabla 1. Rutas metabólicas analizadas siguiendo el metabolismo energético propuesto por las rutas del KEGG**

Energy metabolism		
Methane metabolism	Searched genes	KO code
Methanotrophy	<i>pmoA-amoA-C,mmo-X,Y,Z,B,C,D,mdh1,mdh2,MOX</i>	K10944,K10945,K10946,K16157,K16158,K16159,K16160,K16161,K16162,K14028,K14029,K17066
Methanogenesis	<i>mcrA, B, G, C, D</i>	K00399, K00401, K00402, K03421, K03422
CO <sub>2</sub> →methane	<i> fwdA,B,C,D,E,F,G,H, ftr, mch, mtd, hmd and mer</i>	K00200, K00201, K00202, K00203, K11261, K00205, K11260, K00204, K00672, K01499, K00319, K13942, K00320
Acetate→methane	<i>acs</i>	K01895
Methanol→methane	<i>mtaA, mtaB, mtaC</i>	K14080, K04480, K14081
Methylamine/dimethylamine/trimethylamine→methane	<i>mtbA, mtmC, mtbC, mttC, mtmB, mtbB, mttB</i>	K14082, K16177, K16179, K14084, K16176, K16178, K14083
<b>Nitrogen Metabolism</b>		
Assimilatory nitrate reduction	<i>nasA,nasB, narB, NR, nirA,NIT-6</i>	K00372, K00360, K00367, K10534, K00366, K17877
Dissimilatory nitrate reduction	<i>nirB, nirD, nrfA, nrfH, nirK, nirS, norB, norC, nosZ</i>	K00362, K00363, K03385, K15876, K00368, K15864, K04561, K02305, K00376
Denitrification	<i>nirK, nirS, norB, norC, nosZ</i>	K00368, K15864, K04561, K02305, K00376
Nitrification	<i>hao, PmoA-amoA-C</i>	K10535, K10944, K10945, K10946
Nitrogen fixation	<i>nifD,nifK, nifH, anfG, vnfD, vnfK, vnfG, vnfH</i>	K02586, K02591, K02588,K00531,K22986, K22987, K22898, K22899
Anammox	<i>hdh</i>	K20935
<b>Sulfur Metabolism</b>		
Assimilatory sulfate reduction	<i>cysC,cysH, cysJ, cysI,Sir</i>	K00860, K00390, K00380, K00381,K00392
Dissimilatory sulfate reduction and oxidation	<i>aprA, aprB,dsrA,dsrB</i>	K00394, K00395,K11180, K11181
<b>Carbon fixation</b>		
3-hydroxypropionate bi-cycle	<i>accA, accB, accC, accD,mcr,mct,meh,smtA1, smtB</i>	K01962, K02160, K01961, K01963, K14468, K14469, K15052, K14470, K09709, K14471, K14472
Dicarboxylate-hydroxybutyrate cycle	<i>4hbl</i>	K14467
Reductive citrate cycle (Arnon-Buchanan cycle)	<i>pycA,pycB, pyc, frdA, frdB, frdC, frdD,frdE, aclA, aclB, ccsA, ccsB, ccl</i>	K01959, K01960, K01958, K18556, K18557, K18558, K18559, K18560, K15230, K15231, K15232, K15233, K15234
Calvin cycle	<i>prkB, rbcL, rbcS, GAPA, K0110</i>	K00855, K01601, K01602, K05298, K01100
Hidroxypropionate-hidroxybutylate	K15039, K15018, K15019, K15020, K14466	K15039, K15018, K15019, K15020, K14466
Reductive-CoA (Wood-lungdahl)	<i>cooS, fdhA, fdhB, metF, acsE, acsB</i>	K00198, K05299, K15022, K00297, K15023, K14138
<b>Photosynthesis</b>		
Photosystem I	<i>psaA,psaB,psaC, psaD,psaE,psaF, psaG</i>	K02689, K02690, K02691, K02692, K02693, K02694, K08905
Photosystem II	<i>psbA,psbB,psbC, psbD,psbE,psbF, psbL</i>	K02703, K02704, K02705, K02706, K02707, K02708, K02703
Allophycocyanin	<i>apcA,apcB,apcC, apcD,apcE,apcF</i>	K02092, K02093, K02094, K02095, K02096, K02097
Phycocyanin	<i>cpcA,cpcB,cpcC, cpcD,cpcE,cpcF,cpcG, pecA, pecB,pecC, pecE,pecF</i>	K02284, K02285, K02286, K02287, K02288, K02289, K02290, K02628, K02629, K02630, K02631, K02632
Phycocerythrin	<i>cpeA, cpeB, cpeC,cpeD,cpeE,cpeR, cpeS,cpeT, cpeU,cpeY, cpeZ</i>	K05376, K05377, K05378, K05379, K05380, K05381, K05382, K05383, K05384, K05385, K05386
LHC-antenna	<i>Lhca1,lhca2,lhca3,lhca4,lhca5,lhcb1,lhcb2, lhcb3, lhcb4, lhcb5,lhcb6,lhcb7</i>	K08907, K08908, K08909, K08910, K08911, K08912, K08913, K08914, K08915, K08916, K08917, K14172

Genes associated to each pathway and KO code are listed.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220117.t001>

### **Fijación de nitrógeno**

Para estimar las tasas de fijación de nitrógeno producido por las muestras, se utilizaron de 5 puntos de muestreo, en dónde cada punto se analizó como sub-réplica. Cada una de las réplicas permaneció sumergida dentro de cámaras de incubación en una tina (1.5 m diámetro por 60cm de alto) con flujo constante proveniente de la laguna costera. Dichas cámaras se componen por dos partes: una sección acuosa en la base, en dónde se encuentran las muestras y una sección gaseosa en la superficie en dónde es sellada con tapones de goma y con silicón.



**Figura 8. Cámaras de incubación utilizadas para el experimento de fijación de nitrógeno a partir del ensayo de reducción de acetileno.**

Una vez selladas las cámaras, se estimó la actividad de la nitrogenasa con ensayos de reducción de acetileno (Capone, 1993). Para el caso de la fijación de nitrógeno, cada réplica fue sometida a la saturación atmosférica con acetileno, el cual es reducido a etileno por la nitrogenasa ( $C_2H_2 \rightarrow C_2H_4$ ). La actividad de la nitrogenasa fue monitoreada cada 6 horas durante 24hr, es decir, un total de 4 mediciones. Fueron colectados tres mililitros de la fase gaseosa e inyectados en tubos “vacutainers” (al menos por triplicado), para su posterior análisis con cromatografía de gases (Falcón *et al.*, 2007).

Las muestras de gas obtenidas de la reducción de acetileno fueron analizadas en un cromatógrafo de gases, provisto con un detector de ionización de flama, con el que se

determina la cantidad de etileno ( $C_2H_4$ ). En la detección de ionización de flama, el gas portador (nitrógeno) se mezcla con hidrógeno y con el aporte de aire se forma una flama que enciende e ioniza los compuestos separados en la columna. Esta ionización es registrada por un par de electrodos como diferencia de potencial. La tasa de fijación de nitrógeno se calculó a partir del etileno formado como función de la proporción de los valores de etileno entre la muestra y el estándar, de la concentración. Para estos cálculos, se obtuvieron a partir del cromatógrafo de gases; los valores del área del etileno, el área del acetileno y la del etano. Posteriormente, se obtuvo el “ajuste”, el cual se calcula multiplicando el área del etileno por un millón (debido a que el estándar utilizado se componía por partes por millón) y dividido por la suma de las áreas de los tres gases. El ajuste se divide por el tiempo en minutos incubado y posteriormente, se multiplica por el factor obtenido a partir de la pendiente  $\{([Diferencia\ del\ área\ y\ el\ blanco * 1,000,000] / Area\ Total) = Ajuste; \{(Ajuste / Tiempo) * 0.0135\}$ . Las unidades obtenidas a partir de estos cálculos son micromoles de etileno por hora, los cuales se pueden normalizar por peso de carbono orgánico de las muestras del biofilm.

La conversión del acetileno reducido a  $N_2$  fijado se calcula a partir de la proporción de reducción de acetileno por reducción de  $N_2$ , 3:1 (Capone y Montoya, 2001). Por lo que la unidad final es micromoles de  $N_2$  [ $mmol\ g^{-1}\ h^{-1}$ ] de carbono orgánico. Los experimentos de fijación de nitrógeno, junto con la medición de los parámetros ambientales y las colectas de material se hicieron durante el verano del 2016.

## RESULTADOS

El arrecife de Puerto Morelos se caracteriza por una salinidad promedio 36.34 y un pH circuneutral de 8.1. Los nutrientes disueltos obtenidos son similares a los reportados en otros estudios para la región (Hernández-Terrones et al., 2011) (Tabla 2).

**Tabla 2. Caracterización fisicoquímica del agua superficial (izquierda) y de los biofilms (derecha) colonizadores de la pedacería de restos coralinos (promedio de 3 submuestras).**

	Agua superficial	Biofilms colonizadores
Salinidad (UPS)	36.35 ± 0.05	-
pH	8.11 ± 0.02	-
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (μM)	1.23 ± 0.16	-
N- NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (μM)	0.9 ± 0.104	-
N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (μM)	0.06 ± 0.003	-
P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (μM) (SRP)	0.21 ± 0.002	-
SiO <sub>2</sub> (μM)	2.86 ± 0.878	-
DIN(μM)	2.2 ± 0.104	-
TN(μM)	10.211 ± 5.2	-
TP(μM)	4.51 ± 1.61	-
DIN: SRP	10.47	-
TP:DIN	2.05	-
N orgánico (mg/g)	-	0.063 ± 0.007
C orgánico (mg/g)	-	0.702 ± 0.024
C orgánico: N orgánico	-	11.14
TP (mg/g)	-	0.33 ± 0.07
TN (mg/g)	-	33.41 ± 0.40

TC (mg/g)	-	371.36 ± 1.28
TN:TP	-	10.124
TC:TN	-	11.11
TC:TP	-	1125.33
Mineral más abundante		Calcita rica en Mg (86%)

De manera inicial, los biofilms colonizadores de fragmentos calcáreos fueron caracterizados con base en parámetros biogeoquímicos para comprender su contenido y proporciones elementales (Tabla 2). A partir de los presentes resultados, hemos mostrado que los biofilms colonizadores en las pedaceras coralinas son ricos en C, N, materia orgánica y P. La cuantificación de pigmentos como ficoeritrina, ficocianina y aloficocianina indica presencia de rodofitas, cryptofitas y cianobacterias (Tabla 3). La ficoeritrina está en mayor concentración en la pedacera de coral, seguida de la ficocianina y la aloficocianina. La clorofila *a* fue el pigmento más abundante, seguido de *chl b* y *chl c*.

**Tabla 3. Concentraciones de pigmentos y clorofilas en los biofilms colonizadores de restos calcáreos.**

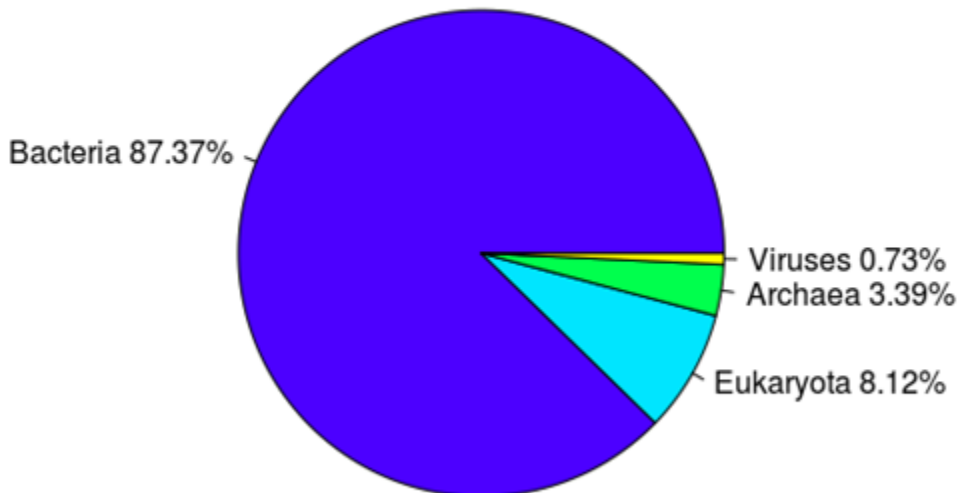
	Ficoeritrina (µg/g)	Ficocianina (µg/g)	Aloficocianina (µg/g)	Ecuación utilizada
Biofilms colonizadores de sustratos calcáreos	585.31 (±77.26)	165.15 (±50.94)	198.34 (±70.51)	Kursar <i>et al</i> (1983)
	<i>Chl a</i> (µg/g)	<i>Chl b</i> (µg/g)	<i>Chl c</i> (µg/g)	Ecuación utilizada
	208.13 (±55.87)	37.14 (±1.5)	24.94 (±7.36)	Jeffrey y Humphrey <i>et al</i> (1975)



En el análisis metagenómico por MG-RAST, inicialmente se recuperaron 168.585.058 secuencias, de las cuales 146.635.889 permanecieron después del filtrado de calidad ( $Q > 20$ ). Dichas secuencias tienen una longitud promedio de aproximadamente 151 pb y un contenido promedio del 50.6% de GC. Del total de las secuencias, aproximadamente el 11% fue clasificado como desconocido, el 13% no pasó el control de calidad y el 76% fue anotada exitosamente. De las secuencias anotadas, 1,153,764 (~ 1%) se asociaron con genes de ARN ribosómico; 47,791,606 (~ 37.3%) fueron secuencias de proteínas predichas con funciones conocidas y 79,190,216 (~ 61.80%) fueron secuencias de proteínas con función desconocida.

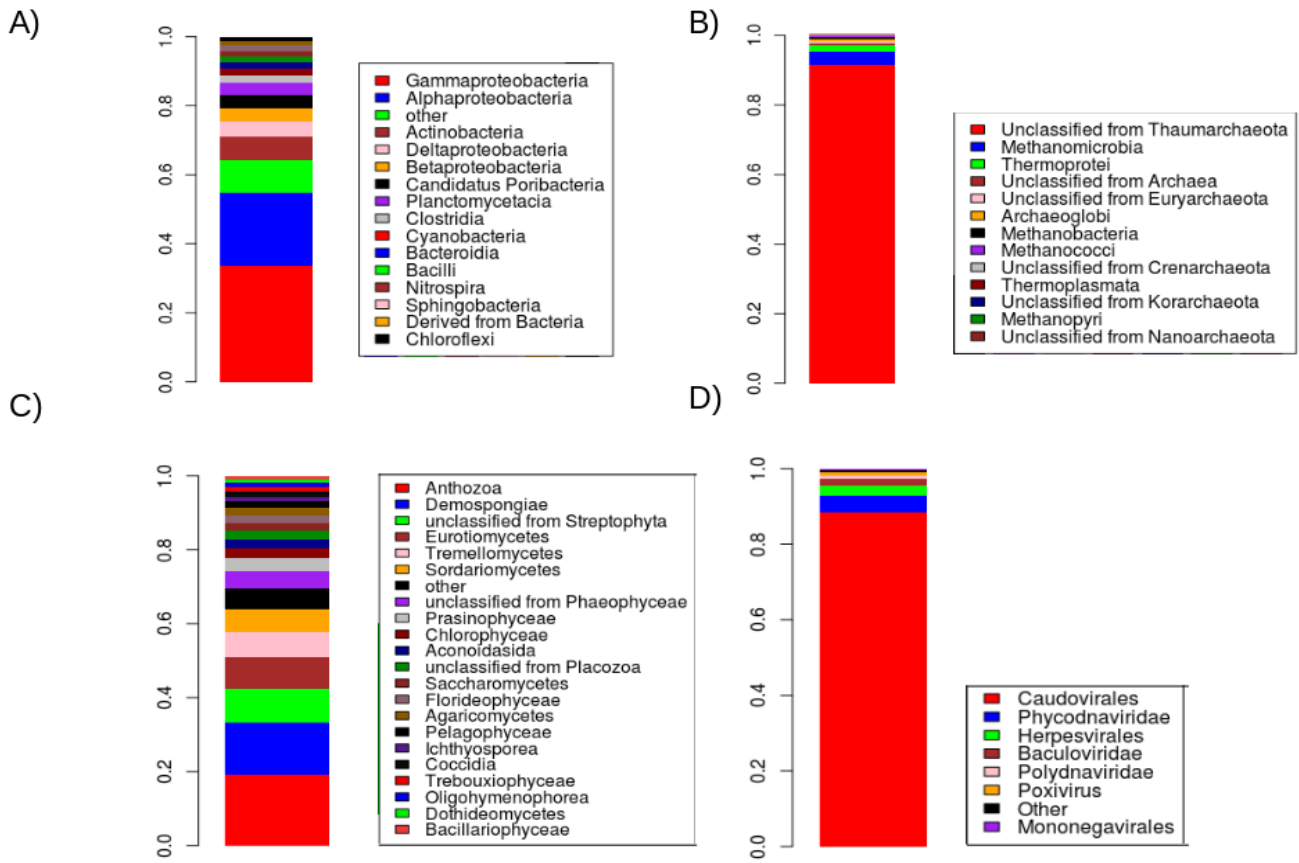
El conjunto de datos de secuencia metagenómica estuvo dominado por Bacterias con un 87.37% (11,048,161 secuencias), seguido por las Eucariotas con el 8.12% (1,026,844 secuencias), luego las Arqueas con un 3.39% (428,679) y por último los Virus con 0.73% (92,345) (Fig. 9). Alrededor del 0.39% eran secuencias no clasificadas.

### Coral rubble Domains



**Figura 9. Composición filogenética de la pedacería de coral colonizados por biofilms para cada dominio. Bacterias 87.37%, Arqueas 3.39%, Eucariota 8.12% y Virus 0.73%.**

Dentro del grupo de las bacterias, Gammaproteobacteria fue la clase más abundante con un 33.56%, seguida de Alphaproteobacteria 21.36%, Actinobacteria 6.95%, Deltaproteobacteria 4.25%, Betaproteobacteria 3.98%, Candidatus Poribacteria 3.84%, Planctomycetacia 3.28%, Clostridia 2.32%, Cyanobacteria 1.89%, Bacilos 1.65%, Nitrospira 1.59%, Esfingobacterias 1.55% y 1.37% de bacterias no clasificadas. El género más abundante en las bacterias fue el de los organismos no clasificados de *Candidatus Poribacteria* 5.39%. Luego *Chromohalobacter* 3.66%, *Halomonas* 2.84%, *Nitrospira* 2.00%, *Pseudomonas* 1.55%, *Prevotella* 1.46%, *Candidatus Solibacter* 1.19%, *Planctomyces* 1.17%, *Burkholderia* 1.15% y *Rhodothermus* 1.10% (Fig. 10A).



**Figura 10. Muestra las abundancias relativas y la distribución filogenética de Bacteria, Eucaria, Arquea y Virus. A: Las bacterias estaban dominadas por las Gammaproteobacteria (33.56%) y las Alfaproteobacteria (21.36%). B: Las arqueas fueron dominadas por Thaumarchaeota no clasificada (91.54%). C: Los eucariotas estaban dominados por Anthozoa (19.00%) y Demospongiae (14.25%). D: los virus estaban dominados por Caudovirales (88.26%).**

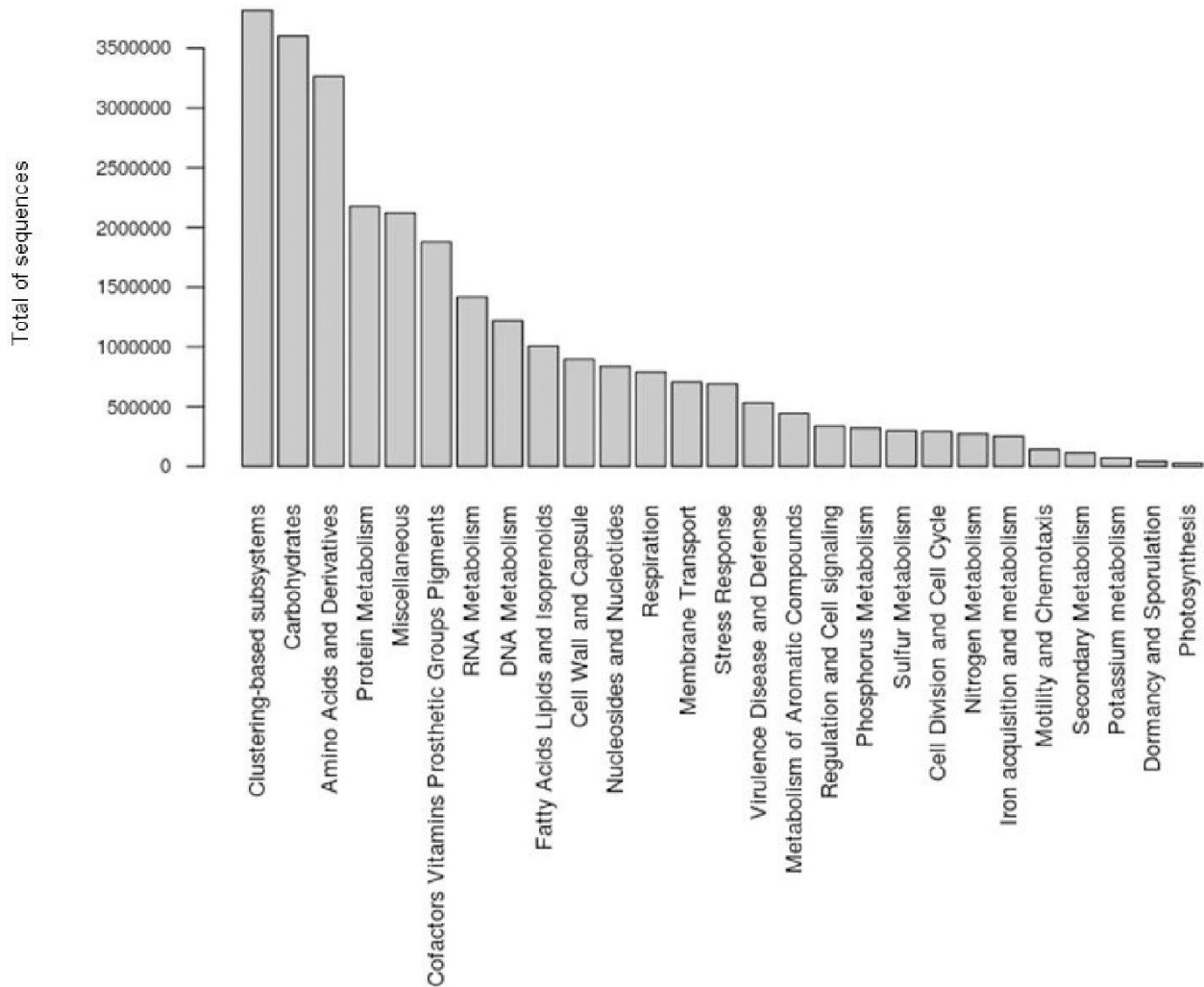
La clase más abundante en el dominio Arquea fue Thaumarchaeota sin clasificar 91.54% (354,552), seguida de Methanomicrobia 3.69% y Thermoprotei 1.75% (Fig. 10B). Los géneros más abundantes fueron *Nitrosopumilus*, *Cenarchaeum*, *Thaumarchaeota*, y *Methanosarcina*, entre otros.

Las clases de los eucariotas más abundantes fueron los Anthozoa 19.00% y Demospongiae 14.25%. Seguidos por Streptophyta 9.07%, Eurotiomycetes 8.51%, Tremellomycetes 6.81%, Sordariomycetes 6.31%, Phaeophyceae 4.64%, Prasinophyceae 3.24%, Chlorophyceae 2.67%, Aconoidasida 2.45%, Placozoa 2.34%, Saccharomycetes 2.2%, Florideophyceae 1.99%, Florideophyceae 1.99, Pelagophyceae 1.75%, Ichthyosporea 1.41%, Coccidia 1.26%, Trebouxiophyceae 1.19%, Oligohymenophorea 1.16%, Dothideomycetes 0.97% y Bacillariophyceae 0.95%. Los géneros más abundantes fueron *Filobasidiella* (Basidiomycota), *Monosiga*, *Ectocarpus* (Ectocarpaceae) y *Penicillium* (Trichomaceae) (Fig. 10C).

Los bacteriófagos de doble cadena de ADN más abundantes en el metagenoma de restos calcáreos de coral fueron Caudovirales (88.26%) seguido de Phycodnaviridae con 4.70% y Herpesvirales 2.63% (Fig. 10D). Los virus más abundantes fueron *Microvirus*, *Myoviridae*, *Siphoviridae* y virus similares a T4.

Por otro lado, el potencial metabólico de la comunidad que se desarrolla en la pedacería de coral estuvo dominado por un subsistema basado en agrupamiento (secuencias de acoplamiento funcional, pero de función desconocida) (13.37%) y genes que codifican funciones metabólicas centrales como la utilización de carbohidratos (12.6%) los cuales probablemente sean parte del ambiente o del ciclaje de las comunidades del biofilm. También se identificaron aminoácidos y derivados (11.44%), metabolismo de proteínas (7.62%),

Derivados (7.43%), cofactores, vitaminas, grupos protésicos, pigmentos (6.57%), metabolismo del ARN (4.96%) y metabolismo del ADN (4.27%) (Fig. 11).



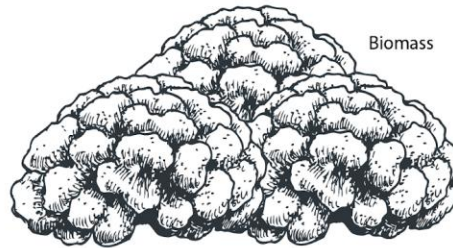
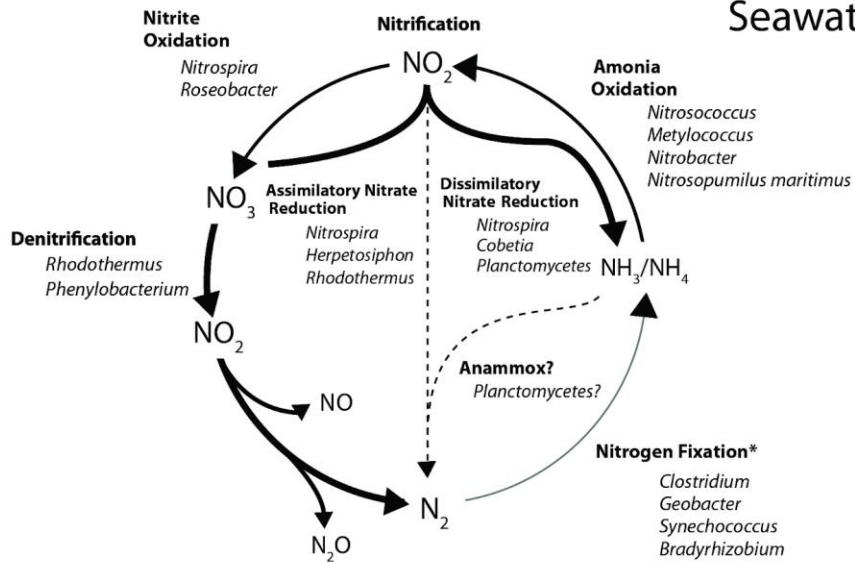
**Figura 11. Potencial metabólico de la pedacrería de coral obtenida con MG-RAST. El potencial metabólico está dominado por subsistemas basados en agrupamiento (3,816,880 secuencias) y carbohidratos (3,601,705 secuencias). Los aminoácidos y derivados, el metabolismo de las proteínas y derivados (3,266,144; 2,177,104 y 2,122,139 secuencias respectivamente) también están altamente representados. Las secuencias que codifican el metabolismo del potasio, la latencia y la esporulación y la fotosíntesis fueron representadas por > 100,000 secuencias.**

Los biofilms que colonizan la pedacera de coral en la Bocana, albergan una gran diversidad de bacterias que están asociadas al ciclo elemental del N, S y C (Figura 12). Los resultados sugieren que estas comunidades están reduciendo el nitrato y están involucradas en la desnitrificación. Aun no se tiene clara la fuente de materia orgánica, sin embargo, el flujo constante de aguas residuales, la mortandad de ciertos organismos y el ciclaje de nutrientes podrían ser fuentes importantes. Los genes identificados en las rutas descritas, son los reportados en la Tabla S1. Por otro lado, las bacterias con las que se identificó la función de dichos genes a partir del GHOST-KOALA son los mostrados en la Figura 12.

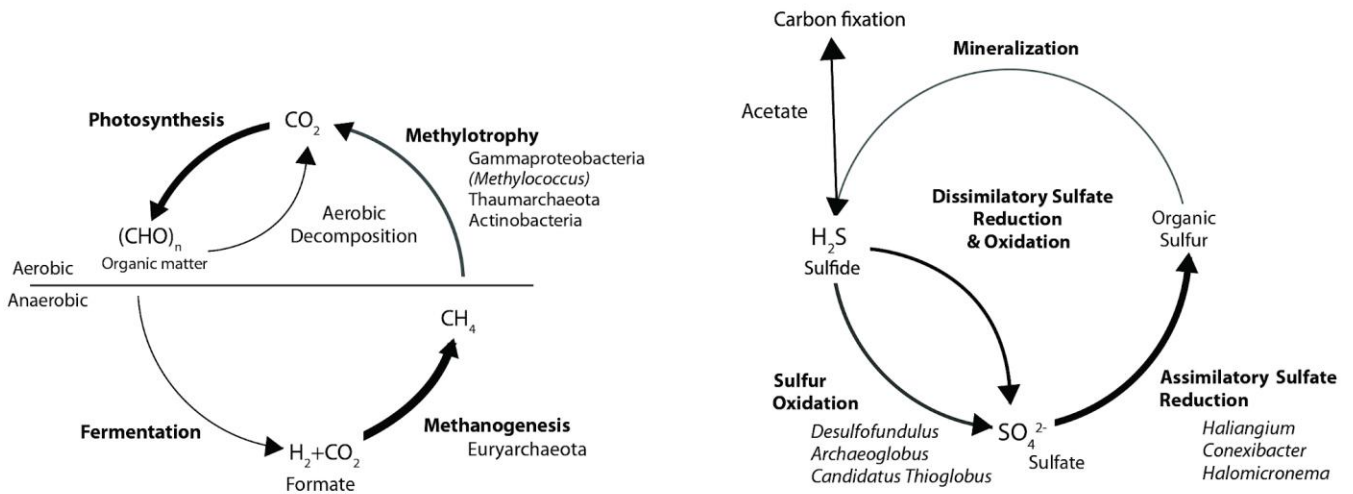
# Atmosphere



# Seawater

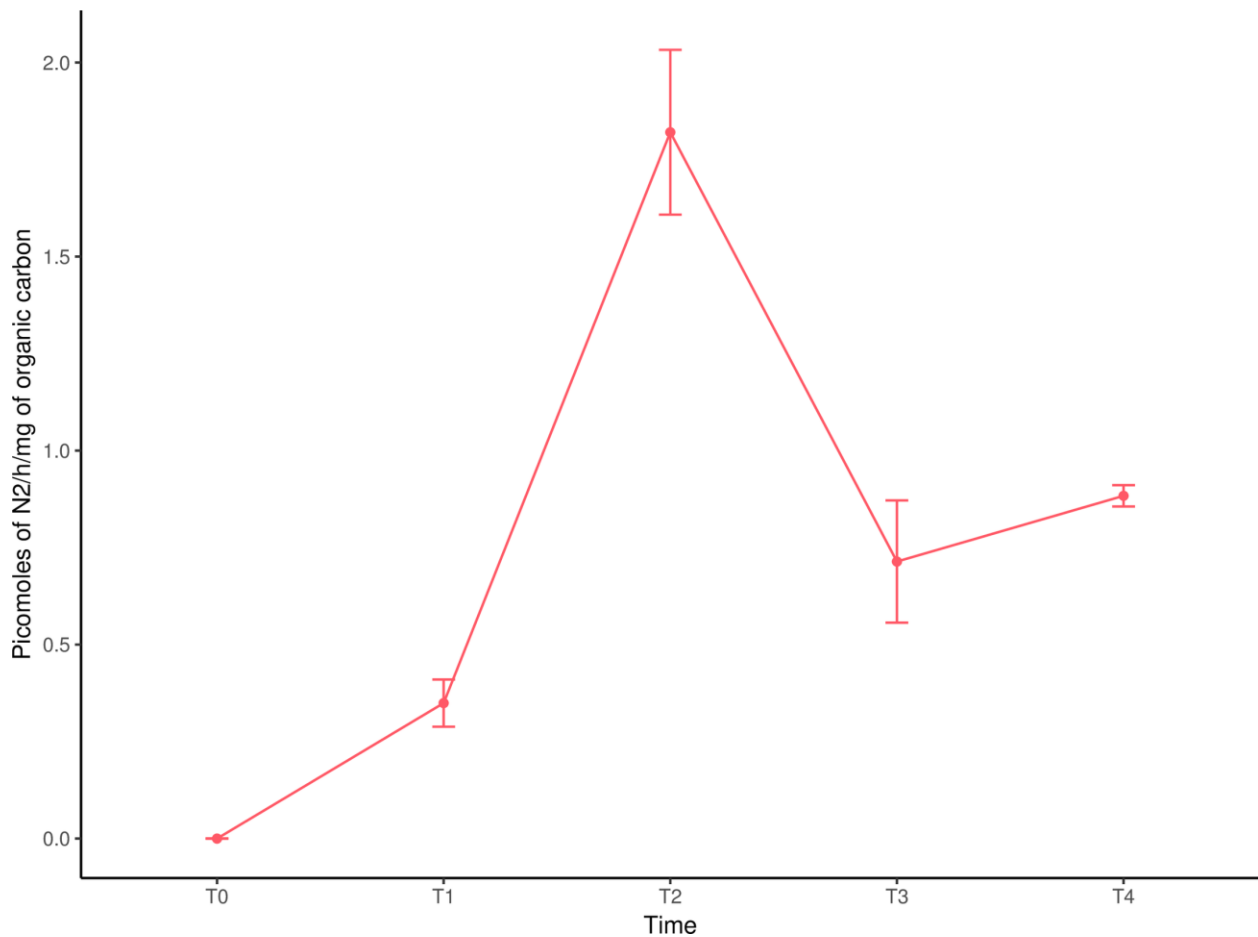


Coral Rubble Biofilm  
 C.org (mg/g) = 0.702 ± 0.024  
 N.org (mg/g) = 0.063 ± 0.007



**Figura 12. Modelo del papel funcional propuesto de las bacterias en los restos calcáreos de coral evaluado a través de la metagenómica (Tabla suplementaria 1) e indicando las rutas biogeoquímicas asociadas a los ciclos de nitrógeno, azufre y metano.**

La fijación de nitrógeno se cuantificó en la pedacera de coral con actividades máximas entre la medianoche y la madrugada (Fig. 13). Aunque se realizaron los mismos ensayos para la metanogénesis, no se registró producción. La identidad de los microorganismos asociados a cada vía genética se muestra en la Tabla S1.



**Figura 13. Fijación de nitrógeno cuantificada en la pedacera de coral cada 6 horas con el ensayo de reducción de acetileno durante un ciclo de 24 h. El ensayo comenzó a las 12: 00h; T1 = 18: 00h; T2 = 24: 00h; T3 = 6: 00h; T4 = 12: 00h.**

El potencial fotosintético se consideró como la suma de las secuencias anotadas obtenidas de los fotosistemas I y II junto con el tipo de pigmento que poseen los organismos (Ficobilisoma: Aloficocianina, Ficocianina, Ficoeritrina vs antena LHC - fotosíntesis). Los organismos más abundantes fueron algas verdes, cianobacterias, algas rojas y estramenofilos. Los géneros más abundantes fueron *Chondrus* (Rhodophyta), *Coccomyxa* (Chlorophyta), *Chlorella* (Chlorophyta), *Chlamydomonas* (Chlorophyta), *Ostreococcus* (Chlorophyta), *Aureococcus* (SAR), *Prochlorococcus* (Cianobacterias), entre otros (Tabla S1).

Los metabolismos más abundantes relacionados con la precipitación de carbonatos fueron la amonificación, la reducción de sulfato, la desnitrificación, la ureólisis, la fotosíntesis y la oxidación de metano, los cuales están vinculados con el aumento en el pH favoreciendo la precipitación (Zhu et al., 2016) (Tabla 4). Algunos ejemplos de microorganismos que poseen las rutas metabólicas de la amonificación fueron *Cobetia* y *Nitrospira*. Para la reducción de sulfato, *Archaeoglobus* y *Candidatus Thioglobus* fueron relevantes. Por otro lado, *Nitrosopumilus* y *Gallionella* dentro de la desnitrificación, *Campylobacter* en ureólisis y *Synechococcus*, *Microcystis* y *Micromona* en la ruta fotosintética. Finalmente, se identificó a *Methylomicrobium* en la ruta de oxidación del metano.

**Tabla 4. Rutas metabólicas y organismos presentes en los biofilms de la pedacera de coral que han sido asociados con la precipitación de carbonato.**



Metabolismo	Número de hits	Grupos microbianos	Grupos identificados	Ejemplo
Fotosíntesis	4,027	Organismos fotosintéticos	Cianobacteria & Algas	<i>Synechococcus, Microcystis and Micromonas</i>
Ureolisis	4,462	Bacterias ureolíticas	Alfaproteobacteria & Epsilonproteobacteria	<i>Campylobacter</i>
Desnitrificación	5,828	Bacterias y arqueas nitrato-reductoras	Thaumarchaeota & Betaproteobacteria	<i>Nitrosopumilus &amp; Gallionella</i>
Amonificación	53,660	Bacterias desasimilatorias de la reducción del nitrato	Gammaproteobacteria & Nitrospirae	<i>Cobetia &amp; Nitrospira</i>
Sulfato reducción	38,457	Bacterias y arqueas sulfato reductoras	Proteobacteria, Firmicutes, Euryarchaeota	<i>Archaeoglobus &amp; Candidatus Thioglobus</i>
Oxidación del Metano	478	Metanógenas	Gammaproteobacteria	<i>Methylochromobium &amp; Methylococcus</i>

## DISCUSIÓN GENERAL

En la actualidad, los estudios asociados a la pedacería calcárea colonizada por biofilms son escasos (Beltrán *et al.*, 2016); además de que no se ha considerado de manera recurrente su cobertura como parámetro en los estudios de arrecifes de coral. Es importante comenzar a considerar las implicaciones que caracterizan a estas comunidades de las pedacerías calcáreas, ya que son diferenciables de las de un arrecife sano.

La alta tasa en la pérdida de cobertura coralina que se ha observado en las últimas décadas, genera un incremento en ecosistemas de “cementorios de coral” en diversos arrecifes del Caribe Mexicano. Sin embargo, desgraciadamente el aumento de estos sucesos de igual forma disminuye la producción calcárea de los arrecifes por lo que se refleja en un crecimiento más lento y de un esqueleto menos denso afectando el crecimiento arrecifal (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2014; Alvarez-Filip *et al.*, 2009; Rioja-Nieto *et al.*, 2018).

El papel que ejercen las comunidades que colonizan la pedacería calcárea en el ecosistema del arrecife aún se desconoce, de ahí la importancia del presente trabajo. Se ha reportado anteriormente que los biofilms de arrecifes son importantes como señales de asentamiento para una variedad de invertebrados marinos, incluidos los corales mismos (Webster *et al.*, 2004). No obstante, los arrecifes dominados por la pedacería calcárea de coral, como La Bocana Grande en México, no sostienen el asentamiento de las larvas de coral (Alvarez-Filip *et al.*, 2016). Sin embargo, es una realidad que el papel funcional de los microbios en los arrecifes de coral se está convirtiendo en un nuevo tema de investigación,

ya que los microorganismos juegan un papel fundamental en el ciclo de los nutrientes y de la energía en nuestro planeta (Arrigo, 2005). Los límites espaciales de las comunidades colonizadoras de estas estructuras calcáreas son claramente diferenciables del coral *A. palmata* sano, por lo que funcionan como unidades semi-independientes de sus entornos, utilizando la luz y la materia orgánica e inorgánica para funcionar.

Este es el primer intento de esclarecer tanto la diversidad como el rol potencial de las comunidades colonizadoras de estas acumulaciones calcáreas en el medio ambiente marino. De acuerdo con trabajos previos, se ha demostrado que la diversidad microbiana de la pedacera de coral es específica y diferente a la de los corales sanos, la del agua circundante y la de los sedimentos (Beltrán *et al.*, 2016). En el presente estudio se integró información de metagenómica para describir las comunidades microbianas y el potencial funcional de dichos biofilms que colonizan los restos calcáreos de la pedacera de *A. palmata*. Para el estudio a nivel de comunidad, se integraron secuencias metagenómicas realizando una reconstrucción metabólica de los genes específicos asociados a los metabolismos del carbono, nitrógeno, azufre, entre otros. Es decir, que procesos como la fijación de nitrógeno, fijación de carbono, fotosíntesis, asimilación del azufre entre otros, fueron analizados en los restos calcáreos de coral colonizados por dichas comunidades. Por lo tanto, el presente trabajo es un ejemplo de una aproximación ecosistémica del metabolismo.

A diferencia de un arrecife sano, los cuales se caracterizan por ser ecosistemas oligotróficos productivos y en donde predominan metabolismos como la fijación de carbono o nitrógeno (Lesser *et al.*, 2007; Weber *et al.*, 2019; Kelly *et al.* 2018; Yang *et al.*, 2019). El presente trabajo ha encontrado que los metabolismos predominantes en la pedacera calcárea, corresponden a la degradación de materia orgánica. Por lo tanto, se podría esperar un posible cambio funcional en los ecosistemas donde predominan metabolismos autotróficos (fijación de nitrógeno, fotosíntesis, etc) a heterotróficos. Sin embargo, sería importante complementar la descripción ecosistémica con enfoques de metatranscriptómica o transcriptómica. Esto, con la finalidad de observar el nivel en los transcritos de las rutas metabólicas evaluadas para poder evidenciar si una posible mayor expresión de genes corresponde a un metabolismo específico más abundante.

Dicho enfoque puede ayudar a dar el salto conceptual en el estudio del metabolismo a nivel comunitario, para describir el acoplamiento de la comunidad a nivel biogeoquímico

y poder predecir su comportamiento, más allá de la descripción de su composición filogenética. Con la presente aproximación, se puede proponer un modelo del metabolismo comunitario, además de poder realizar un catálogo del potencial genético aproximado (su pangenoma) (Fullmer *et al.*, 2015). En el presente trabajo, se contempló a la comunidad colonizadora de restos coralinos como una unidad metabólica, con el objetivo de predecir su capacidad de usar el carbono, el nitrógeno y el azufre inorgánico, así como las rutas metabólicas predominantes que se encuentran involucradas. Los resultados metagenómicos, revelan la importancia de las bacterias dentro de la pedacera calcárea, esto es debido a su gran abundancia y participación en varias rutas metabólicas. A partir de las anotaciones funcionales del metagenoma, se observó una mayor abundancia de secuencias asociadas al metabolismo de carbohidratos y proteínas en la pedacera calcárea, que se encuentran asociadas a la oxidación de materia orgánica. Los carbohidratos y los metabolismos de las proteínas tienen un papel importante en el almacenamiento de energía dentro de estas comunidades. La mayoría de los microorganismos y de las algas pueden biosintetizar aminoácidos que también tienen una alta representación en los resultados metabólicos. En cuanto al carbono, el nitrógeno y el azufre son nutrientes esenciales y limitantes para los organismos en los ecosistemas oceánicos (Hassan *et al.*, 2005). Por lo tanto, la capacidad de absorción de estos nutrientes puede permitir que los organismos marinos sobrevivan en los ecosistemas de la pedacera coralina.

De igual forma, los resultados en las secuencias del metagenoma sugieren que estas comunidades tienen un papel importante en el ciclaje del nitrógeno a través de múltiples rutas, donde la desnitrificación (5,928 hits), la reducción asimilatoria y no-asimilatoria del nitrato (10,624 y 10,459 registros, respectivamente) fueron las más abundantes. Según el número total de secuencias del metagenoma, no se sugiere ninguna limitación aparente de N en las comunidades colonizadoras de la pedacera coralina (Tabla S1 y Fig. 12). Por lo tanto, la incorporación de N orgánico y su remineralización se destacan en esta comunidad.

Es probable que las arqueas y las bacterias lleven a cabo la nitrificación, de hecho, según Wuchter *et al* (2006) *Nitrosopumilus maritimus* puede dominar este proceso en ambientes acuáticos marinos. Según las secuencias obtenidas, la fijación de nitrógeno no es una ruta muy abundante. De igual forma, a diferencia de estudios en donde se ha reportado la fijación de nitrógeno en corales como *Montastrea cavernosa* (Lesser *et al.*, 2007). En la

pedacería calcárea de los restos coralinos, se ha observado una fijación de nitrógeno menor en hasta tres órdenes de magnitud a la de un coral sano, lo que indica una diferencia en la capacidad para captar nitrógeno del ambiente en estos ecosistemas. Sin embargo, las mediciones *in situ* de la fijación de nitrógeno (Fig. 13) revelaron una mayor actividad de nitrogenasa entre la media noche y la madrugada, lo que, junto con la gran cantidad de Alphaproteobacterias asociadas a la nitrogenasa, sugiere el papel de los diazotrófos heterotróficos en la pedacería calcárea.

Existen estudios que recientemente han demostrado que es probable que los arrecifes de coral tengan un papel importante en el ciclo biogeoquímico del azufre (Broadbent *et al.*, 2004; Raina *et al.*, 2010; Turchyn, 2005). El azufre se encuentra en el agua de mar y en las rocas sedimentarias, incluidos los carbonatos de calcio y magnesio (Muyzer *et al.*, 2008). La reducción asimilatoria de sulfato (30.871 hits) es la ruta principal para el ciclo del azufre en el metagenoma ensamblado (Tabla S1 y Fig. 10). Esto sugiere que la mayor parte del azufre se metaboliza en compuestos orgánicos que son un componente esencial de las proteínas. La presencia de bacterias oxidantes de sulfato, bacterias reductoras de sulfato, arqueas reductoras de sulfato (órdenes en Euryarchaeota) y quimiosintetizadores dependientes del azufre como Crenarchaeota en la anotación taxonómica del metagenoma, implica un posible papel para la comunidad microbiana en el ciclo de azufre orgánico e inorgánico. Otros organismos como las actinobacterias, que resultó ser la tercera clase bacteriana más abundante en genes que están relacionados con la asimilación de sulfato, además de la disimilación de los metabolismos de nitrato y metano.

De acuerdo a Anandan *et al.*, (2016), las actinobacterias pueden tener un papel importante en la descomposición de la materia orgánica y el reciclaje de nutrientes. Thaumarchaeota es el filum más abundante de las arqueas, y albergan organismos quimiolitotróficos oxidantes de amonio (Pester *et al.*, 2011; Witzany, 2017) que se asociaron con los ciclos de nitrógeno y carbono. Anthozoa, Demospongiae y Streptophyta fueron los eucariotas más abundantes que forman parte de la diversidad común de los arrecifes. Eurotiomycetes (Ascomycota) y Tremellomycetes (Basidiomycota) fueron la cuarta y quinta eucariotas más abundantes y se ha reportado previamente que tienen un potencial rol en el metabolismo del azufre y del nitrógeno en los arrecifes de coral y ambientes marinos (Kimes *et al.*, 2010; Amend *et al.*, 2012; Richards *et al.*, 2012).

La comunidad en la pedacera calcárea es potencialmente importante en el ciclo del carbono a través de las transformaciones de metano que provienen de las diferentes fuentes de carbono en la materia orgánica, la cual probablemente está ligada a los organismos colonizadores de las estructuras calcáreas o del drenaje asociado al ambiente circundante (Tabla S1 y Fig. 12), donde Euryarchaeota pudiera tener un papel clave para la metanogénesis. De hecho, la metanogénesis está presente en arquea dentro del metagenoma ensamblado. Las arqueas metanogénicas asociadas a la pedacera calcárea poseen el potencial de desempeñar un papel en la transformación de metano y la fijación de C. La presencia de metanótrofos asociados a grupos como Gammaproteobacteria sugiere múltiples estrategias de transformación de metano dentro de la comunidad. La emisión de metano no fue detectable *in situ*, aunque se identificaron significativamente más hits de secuencias para la metanogénesis que para la oxidación de metano (Tabla S1).

Los microorganismos son fundamentales en el ciclo del carbono y tienen papeles importantes en diferentes ecosistemas. En la pedacera calcárea se identificaron todas las rutas de la fijación de carbono, lo que indica que estas comunidades pueden fijar CO<sub>2</sub> y asimilar C en diversas condiciones. Las Alphaproteobacteria, las Gammaproteobacteria, las cianobacterias y las algas verdes son los principales fijadores de carbono fotosintéticos oxigénicos, aunque no se debería de descartar la presencia de los fotótrofos anoxigénicos ya que formaban parte de la diversidad microbiana (Tabla S1).

De acuerdo con la literatura, *A. palmata* precipita aragonita. Sin embargo, de acuerdo a diversos reportes y a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se muestra que la mineralización de carbonatos inducida por la actividad microbiana y ciertas algas calcáreas en los restos calcáreos, está más bien asociada a la calcita rica en magnesio. Por lo tanto, podría asumirse que la precipitación de carbonatos es llevada a cabo por las comunidades microbianas y las algas calcáreas. (Tabla S1 y Tabla 4) (Camoin *et al.*, 1999; Riding y Tomás, 2006; Beltrán *et al* 2016). La función de estos carbonatos es fundamental para el desarrollo del arrecife y de los organismos que la habitan, ya que brindan soporte, refugio, estabilización estructural, superficie para colonizar, trampas de materia orgánica, entre otros (Riding *et al.*, 2011). Previamente, se ha sugerido la capacidad que tienen las superficies de los biofilms microbianos para atrapar sedimentos, realizar cambios a microescala en el pH y servir como

núcleo de cristal proporcionando un medio para la precipitación de  $\text{CaCO}_3$  (Beltrán *et al.*, 2016; Riding *et al.*, 2011).

Los microbios pueden favorecer la precipitación de carbonatos a través de diferentes rutas metabólicas. Dentro de estos metabolismos se encuentran la fotosíntesis, la ureólisis, la amonificación, la desnitrificación, la reducción de sulfato, la oxidación anaeróbica de sulfuro y la oxidación de metano (Zhu y Dittrich, 2016). Todas estas rutas metabólicas asociadas a la precipitación de carbonatos se identificaron en la pedacera calcárea (amonificación y reducción de sulfato las más abundantes) (Tabla 4). Sin embargo, se considera que en los sistemas marinos, los microorganismos fotosintéticos son responsables de desencadenar la precipitación de calcita (Arp *et al.*, 2001). Las tasas, la ecofisiología y los mecanismos de las precipitaciones minerales de carbonato en las comunidades colonizadoras de la pedacera calcárea, deben y tienen que considerarse en investigaciones futuras. Por otro lado, la presencia de rutas asociadas a la generación de metano,  $\text{CO}_2$  y a la desnitrificación, indica que es importante realizar aproximaciones con transcriptómica y de ecofisiología para determinar el aporte de gases de efecto invernadero en estos ecosistemas emergentes.

La gran diversidad encontrada en los restos calcáreos coincide con reportes previos de 16S rDNA como el de Beltrán *et al* (2016). Sin embargo, esta es la primera aproximación en describir la comunidad desde un enfoque metagenómico para describir tanto la diversidad como su función potencial funcional. De acuerdo a Rohwer (2001), la riqueza microbiana aumenta con el deterioro en la salud de los corales, lo que a su vez puede tener un rol en la patogenicidad del hospedero. El comprender la diversidad asociada a la pedacera de coral y las interacciones en los procesos biogeoquímicos es esencial para predecir los cambios funcionales en un futuro donde los arrecifes dominados por corales, dejen de ser dominantes.

## **CONCLUSIONES GENERALES**

Las comunidades asociadas a la pedacera calcárea de los restos de coral pueden desempeñar un papel importante en los entornos de arrecifes de coral mediante la remineralización de nitrógeno, azufre y carbono. Por otro lado, la mayor parte de los metabolismos encontrados en la pedacera están asociados a la degradación de materia orgánica, lo que no se esperaría encontrar en un arrecife de coral sano. Debido a esto, se cree que el constante flujo de aguas

residuales desde la zona costera pueda estar influyendo en la diversidad y en las rutas metabólicas del arrecife de la Bocana en Puerto Morelos. Metabolismos como la metanogénesis y la desnitrificación fueron de los más abundantes, lo que pudiese indicar una pérdida en la producción de oxígeno y una disminución de los metabolismos autotróficos como son la fijación de nitrógeno o la fotosíntesis.

Las bacterias tienen un papel importante, siendo el dominio que más predominó, en el cual las Proteobacterias son el filo más abundante y están presentes en la mayoría de las rutas metabólicas. De igual forma, se identificaron posibles rutas metabólicas asociadas a la precipitación de carbonatos, las cuales valdría la pena estudiar más a detalle para determinar tanto las tasas de cementación como las de erosión en estas comunidades colonizadoras de sustratos calcáreos.

Por otro lado, metabolismos como la metanogénesis, la desnitrificación y la respiración ( $\text{CO}_2$ ), son metabolismos que a su vez están asociados a gases de efecto invernadero, los cuales tendrían que considerarse para futuros proyectos. Se requieren de estudios más completos de ecofisiología y metatranscriptómica para identificar si el aporte de las comunidades es significativo en el ecosistema. De igual forma, se deben comparar dichas comunidades colonizadoras de los restos calcáreos de coral entre diferentes arrecifes, para comprender si la diversidad es específica de dichas estructuras o si los metabolismos presentes en la pedacera de coral de “La Bocana” es una característica común entre los arrecifes de baja cobertura coralina.

El comprender la diversidad asociada a la pedacera de coral y las interacciones en los procesos biogeoquímicos es esencial para predecir los cambios funcionales que ocurren en los arrecifes de coral después de un declive en la cobertura coralina.

## **PERSPECTIVAS**

- Resulta fundamental el comprender el impacto que implica un cambio en la diversidad de acuerdo a la localidad de los arrecifes y/o de su impacto antropogénico. De igual forma intentar identificar la fuente de procedencia de estos organismos, si es que vienen de aguas residuales o de drenajes circundantes.

•Es fundamental determinar si dichos ecosistemas emergentes de restos calcáreos podrán soportar la gran diversidad que mantienen los arrecifes de coral sanos. Por lo tanto, es importante seguir con la línea de investigación para comprender y determinar el potencial rol que desarrollarán dichos ambientes en el futuro.

• Realizar aproximaciones de metatranscriptómica para poder cuantificar los transcritos en las comunidades microbianas de los restos calcáreos y sus proyecciones en condiciones de cambio climático. Esto, con la finalidad de cuantificar la actividad de las rutas metabólicas más abundantes y poderlas asociar de manera “cuantificable” a lo que reflejan estos arrecifes.

•Aún falta describir procesos de ecofisiología en estas estructuras (tasas de calcificación, tasas fotosintéticas, flujo de nutrientes, ciclaje de elementos constitutivos de materia orgánica, etc.). Esto con la finalidad de complementar el potencial funcional que se pudiera obtener a partir de la metatranscriptómica y metagenómica con las tasas medidas *in situ*.

•Debido a que estas comunidades tienen la capacidad de fijar carbono por diversas rutas, es necesario determinar si el proceso de calcificación predomina ante el de descalcificación, lo que podría determinar si estos ecosistemas tendrían la capacidad de mantener la diversidad en arrecifes sanos, y definir si son fuentes o sumideros de carbono.

## REFERENCIAS

1. Ainsworth T.D. Thurber R.V. and R.D. Gates. (2010). The future of coral reefs a microbial perspective. *Trends in Ecology and Evolution*. 25(4):233-240.
2. Alagely, A., Krediet, C. J., Ritchie, K. B., & Teplitski, M. (2011). Signaling-mediated cross-talk modulates swarming and biofilm formation in a coral pathogen *Serratia marcescens*. *The ISME journal*, 5(10), 1609.
3. Amend, A. S., Barshis, D. J., & Oliver, T. A. (2012). Coral-associated marine fungi form novel lineages and heterogeneous assemblages. *The ISME journal*, 6(7), 1291.
4. Anandan, R., Dharumadurai, D., & Manogaran, G. P. (2016). An introduction to actinobacteria. In *Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications*. IntechOpen.
5. Andrews, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data.
6. Alvarez-Filip, L., Dulvy, N. K., Gill, J. A., Côté, I. M., & Watkinson, A. R. (2009). Flattening of Caribbean coral reefs: region-wide declines in architectural complexity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1669), 3019-3025.



7. Alvarez-Filip, L., Gill, J. A., Dulvy, N. K., Perry, A. L., Watkinson, A. R., & Côté, I. M. (2011). Drivers of region-wide declines in architectural complexity on Caribbean reefs. *Coral Reefs*, 30(4), 1051.
8. Álvarez-Filip, L. & Banaszak, A.T (2016). Informe de Programa de Conservación de Especies en Riesgo (PROCER). Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos, Puerto Morelos.
9. Arp, G., Reimer, A., & Reitner, J. (2001). Photosynthesis-induced biofilm calcification and calcium concentrations in Phanerozoic oceans. *Science*, 292(5522), 1701-1704.
10. Arribas, M<sup>a</sup>.E., Arribas, J., De la Peña, J.A., Estrada, R., López-Acevedo, F.J., Marfil, R., Varas, M.J. (2007-2011). <http://www.ucm.es/info/petrosed/>.
11. Arrigo, K. R. (2005). Marine microorganisms and global nutrient cycles. *Nature*, 437(7057), 349-355.
12. Aronson, R. B., & Precht, W. F. (2001). White-band disease and the changing face of Caribbean coral reefs. In *The ecology and etiology of newly emerging marine diseases* (pp. 25-38). Springer, Dordrecht.
13. Barnes and Hughes. (1999). An Introduction to Marine Ecology; Third edition. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd. pp. 117-141.
14. Barnes, R.D. 1987. Invertebrate Zoology; Fifth Edition. Fort Worth, TX: Harcourt Brace Jovanovich College Publishers. pp. 92-96, 127-134, 149-162.
15. Barott, K. L., Rodriguez-Brito, B., Janouskovec, J., Marhaver, K. L., Smith, J. E., Keeling, P. & Rohwer, F. L. (2011). Microbial diversity associated with four functional groups of benthic reef algae and the reef-building coral *Montastraea annularis*. *Environ. Microbiol.* 13, 1192–1204.
16. Beltrán, Y., Cerqueda-García, D., Taş, N., Thomé, P. E., Iglesias-Prieto, R., & Falcón, L. I. (2016). Microbial composition of biofilms associated with lithifying rubble of *Acropora palmata* branches. *FEMS microbiology ecology*, 92(1).
17. Berges J.A., D. J. Franklin, O. Hoegh-Guldberg, R. J. Jones .(2004). Cell death and degeneration in the symbiotic dinoflagellates of the coral *Stylophora pistillata* during bleaching. *Mar Ecol Prog Ser*. Vol. 272: 117–130.
18. Birkeland, C. (1997). Life and Death of Coral Reefs. Ecology.
19. Bolger, A., & Giorgi, F. (2014). Trimmomatic: a flexible read trimming tool for illumina NGS data. URL <http://www.usadellab.org/cms/index.php>.
20. Broadbent, A. D., & Jones, G. B. (2004). DMS and DMSP in mucus ropes, coral mucus, surface films and sediment pore waters from coral reefs in the Great Barrier Reef. *Marine and Freshwater Research*, 55(8), 849-855.
21. Camoin, G. F. (1999). Microbial mediation in carbonate diagenesis.
22. Canadell J.G, C. Le Quéré, M. R. Raupach, C. B. Field, E. T. Buitenhuis, P. Ciais, T. J. Conway, N. P. Gillett, R. A. Houghton, and G. Marland, (2007), Contributions to accelerating atmospheric CO2 growth from economic activity, carbon intensity, and efficiency of natural sinks. *PNAS* 104(47):18866-18870.
23. Capone, D. G. (1993). Determination of nitrogenase activity in aquatic samples using the acetylene reduction procedure. *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*, 621-631.
24. Capone, D. G., & Montoya, J. P. (2001). Nitrogen fixation and denitrification. *Methods in microbiology*, 30, 501-515.
25. Carabias, J., E. Provencio, J. Elvira, D. Gutiérrez y M- Gómez. 2000. Programa del Manejo del Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos. México. Instituto Nacional de Ecología. 224p.
26. Carpenter, K. E., Abrar, M., Aeby, G., Aronson, R. B., Banks, S., Bruckner, A., & Edgar, G. J. (2008). One-third of reef-building corals face elevated extinction risk from climate change and local impacts. *Science*, 321(5888), 560-563.
27. Constantz, B., & Weiner, S. (1988). Acidic macromolecules associated with the mineral phase of scleractinian coral skeletons. *Journal of Experimental Zoology*, 248(3), 253-258.
28. Connell, J. H. (1978). Diversity in tropical rain forests and coral reefs. *Science*, 199(4335), 1302-1310.
29. Cooper, T. F., Berkelmans, R., Ulstrup, K. E., Weeks, S., Radford, B., Jones, A. M., & van Oppen, M. J. (2011). Environmental factors controlling the distribution of *Symbiodinium* harboured by the coral *Acropora millepora* on the Great Barrier Reef. *PLoS One*, 6(10), e25536.

30. Coronado C., J. Candela, R. Iglesias-Prieto, J. Sheinbaum, M. López & F. J. Ocampo-Torres. 2007. On the circulation in the Puerto Morelos fringing reef lagoon. *Coral Reefs*. 26:149-163.
31. Dodge, R. E., Birkeland, C., Hatzilolos, M., Kleypas, J., Palumbi, S. R., Hoegh-Guldberg, O., & Staub, F. (2008). A call to action for coral reefs. *Science*, 322(5899), 189-190.
32. Dupraz C. R., P. Reid, O. Braissant, A. W. Decho, R. S. Norman, P. T. Visscher. (2009). Processes of carbonate precipitation in modern microbial mats. *Earth-Science Reviews*. Pages 141–162.
33. Dupraz, C., and P. T. Visscher. 2005. Microbial lithification in marine stromatolites and hypersaline mats. *Trends in Microbiology* 13:429-438.
34. Edwards, A.J. (ed.) (2010). Reef Rehabilitation Manual. Coral Reef Targeted Research & Capacity Building for Management Program: St Lucia, Australia. ii + 166 pp.
35. Enríquez, S., & Schubert, N. (2014). Direct contribution of the seagrass *Thalassia testudinum* to lime mud production. *Nature communications*, 5, 3835.
36. Falcón, L. I., Cerritos, R., Eguiarte, L. E., & Souza, V. (2007). Nitrogen fixation in microbial mat and stromatolite communities from Cuatro Ciénegas, Mexico. *Microbial ecology*, 54(2), 363-373.
37. Fu, L., Niu, B., Zhu, Z., Wu, S., & Li, W. (2012). CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics*, 28(23), 3150-3152.
38. Fullmer, M. S., Soucy, S. M., & Gogarten, J. P. (2015). The pan-genome as a shared genomic resource: mutual cheating, cooperation and the black queen hypothesis. *Frontiers in microbiology*, 6, 728.
39. Furla, P., Galgani, I., Durand, I., & Allemand, D. (2000). Sources and mechanisms of inorganic carbon transport for coral calcification and photosynthesis. *Journal of Experimental Biology*, 203(22), 3445-3457.
40. Gattuso, J. P., & Buddemeier, R. W. (2000). Ocean biogeochemistry: calcification and CO<sub>2</sub>. *Nature*, 407(6802), 311.
41. Goldberg, W. M. (2001). Acid polysaccharides in the skeletal matrix and calicoblastic epithelium of the stony coral *Mycetophyllia reesi*. *Tissue and Cell*, 33(4), 376-387.
42. Goreau, T. F., & Goreau, N. I. (1959). The physiology of skeleton formation in corals. II. Calcium deposition by hermatypic corals under various conditions in the reef. *The Biological Bulletin*, 117(2), 239-250.
43. Graham, N. A. J., & Nash, K. L. (2013). The importance of structural complexity in coral reef ecosystems. *Coral Reefs*, 32(2), 315-326.
44. Grasshoff, K., Ehrhardt, M., & Kremling, K. (1983). Methods of seawater analysis. Verlag Chemie GMBH. Weinheim. [64] K. Ozawa, M. Emori, S. Yamamoto, R. Yukawa, S. Yamamoto, R. Hobara, K. Fujikawa, H. Sakama, I. Matsuda, J. Phys. Chem. Lett, 55(2014), 1953.
45. Grober-Dunsmore, R., Bonito, V., & Frazer, T. K. (2006). Potential inhibitors to recovery of *Acropora palmata* populations in St. John, US Virgin Islands. *Marine Ecology Progress Series*, 321, 123-132.
46. Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 29(8), 1072-1075.

47. Harder Tilmann, David Abrego, Cherie A. Motti, Jan Tebben. (2014). Gene Expression Patterns during the Early Stages of Chemically Induced Larval Metamorphosis and Settlement of the Coral *Acropora millepora*. DOI: 10.1371/journal.pone.0091082
48. Harrington, L., Fabricius, K., De'Ath, G., & Negri, A. (2004). Recognition and selection of settlement substrata determine post- settlement survival in corals. *Ecology*, 85(12), 3428-3437.
49. Harney, J. N., & Fletcher III, C. H. (2003). A budget of carbonate framework and sediment production, Kailua Bay, Oahu, Hawaii. *Journal of Sedimentary Research*, 73(6), 856-868.
50. Hassan, R., Scholes, R., & Ash, N. (2005). Ecosystems and human well-being: current state and trends.
51. Hawkins, T. D., Bradley, B. J., & Davy, S. K. (2013). Nitric oxide mediates coral bleaching through an apoptotic-like cell death pathway: evidence from a model sea anemone-dinoflagellate symbiosis. *The FASEB Journal*, 27(12), 4790-4798.
52. Hernández-Terrones, L., Rebolledo-Vieyra, M., Merino-Ibarra, M., Soto, M., Le-Cossec, A., & Monroy-Ríos, E. (2011). Groundwater pollution in a karstic region (NE Yucatan): baseline nutrient content and flux to coastal ecosystems. *Water, Air, & Soil Pollution*, 218(1-4), 517-528.
53. Hiatt, R. W., & Strasburg, D. W. (1960). Ecological relationships of the fish fauna on coral reefs of the Marshall Islands. *Ecological Monographs*, 30(1), 65-127.
54. Hoegh-Guldberg, O et al, 2007 Coral Reefs under rapid climate change and ocean acidification, *Science* 318(5857):1737.
55. Holmes, K. E., Edinger, E. N., Limmon, G. V., & Risk, M. J. (2000). Bioerosion of live massive corals and branching coral rubble on Indonesian coral reefs. *Marine Pollution Bulletin*, 40(7), 606-617.
56. Hyatt, D., Chen, G. L., LoCasio, P. F., Land, M. L., Larimer, F. W., & Hauser, L. J. (2010). Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC bioinformatics*, 11(1), 119.
57. Instituto Nacional de Ecología. 2000. Indicadores de desarrollo sustentable en México. Mexico.
58. IPCC, 2007: Cambio climático 2007: Informe de síntesis. Contribución de los Grupos de trabajo I, II y III al Cuarto Informe de evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático [Equipo de redacción principal: Pachauri, R.K. y Reisinger, A. (directores de la publicación)]. IPCC, Ginebra, Suiza, 104 págs.
59. Jeffrey, S. y G. Humpfrey. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemie und Physiologie Der Pflanzen* 167: 191 -94.
60. Jordán-Dahlgren, E. 1993. El ecosistema arrecifal coralino del Atlántico Mexicano. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*. XLIV:157-175.
61. Jordán-Dahlgren, E. y Rodríguez-Martínez, R. E. 2003. The Atlantic coral reefs of Mexico. En: Cortés, J. (Ed.). *Latin American Coral Reefs*. Elsevier Press, Amsterdam. 497 pp.
62. Jordán-Dahlgren, E. y Rodríguez-Martínez, R. E. 2004. Coral Diseases in Gulf of México Reefs Cap. 4:105-118. *In*: Rosenberg, E. & Y. Loya (Ed.). *Coral health and Disease*. Springer- Verlag. 485pp.
63. Kanehisa, M., Sato, Y., & Morishima, K. (2016). BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences. *Journal of molecular biology*, 428(4), 726-731.
64. Kennedy, E. V., Perry, C. T., Halloran, P. R., Iglesias-Prieto, R., Schönberg, C. H., Wisshak, M., ... & Mumby, P. J. (2013). Avoiding coral reef functional collapse requires local and global action. *Current Biology*, 23(10), 912-918.
65. Keegan, K. P., Glass, E. M., & Meyer, F. (2016). MG-RAST, a metagenomics service for analysis of microbial community structure and function. In *Microbial Environmental Genomics (MEG)* (pp. 207-233). Humana Press, New York, NY.

66. Kelly, L. W., Haas, A. F., & Nelson, C. E. (2018). Ecosystem Microbiology of Coral Reefs: Linking Genomic, Metabolomic, and Biogeochemical Dynamics from Animal Symbioses to Reefscape Processes. *MSystems*, 3(2), e00162-17.
67. Kirkwood, D. S. (1994). Sanplus segmented flow analyzer and its applications. *Seawater analysis. Skalar*, 51.
68. Kimes, N. E., Van Nostrand, J. D., Weil, E., Zhou, J., & Morris, P. J. (2010). Microbial functional structure of *Montastraea faveolata*, an important Caribbean reef- building coral, differs between healthy and yellow- band diseased colonies. *Environmental microbiology*, 12(2), 541-556.
69. Kursar, T. A., & Alberte, R. S. (1983). Photosynthetic unit organization in a red alga: relationships between light-harvesting pigments and reaction centers. *Plant Physiology*, 72(2), 409-414.
70. Lalli, C.M. and T.R. Parsons. 1995. Biological Oceanography: An Introduction. Oxford, UK: Butterworth-Heinemann Ltd. pp. 220-233.
71. Lesser, M. P., Falcón, L. I., Rodríguez-Román, A., Enríquez, S., Hoegh-Guldberg, O., & Iglesias-Prieto, R. (2007). Nitrogen fixation by symbiotic cyanobacteria provides a source of nitrogen for the scleractinian coral *Montastraea cavernosa*. *Marine Ecology Progress Series*, 346, 143-152.
72. Li, D., Liu, C. M., Luo, R., Sadakane, K., & Lam, T. W. (2015). MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics*, 31(10), 1674-1676.
73. Lighty, R. G., Macintyre, I. G., & Stuckenrath, R. (1982). *Acropora palmata* reef framework: a reliable indicator of sea level in the western Atlantic for the past 10,000 years. *Coral reefs*, 1(2), 125-130.
74. Lirman, D. (1999). Reef fish communities associated with *Acropora palmata*: relationships to benthic attributes. *Bulletin of Marine Science*, 65(1), 235-252.
75. Littler, M. M., & Littler, D. S. (1985). Factors controlling relative dominance of primary producers on biotic reefs.
76. Macgeachy, J. K., & Stearn, C. W. (1976). Boring by macro- organisms in the coral *Montastrea annularis* on Barbados Reefs. *Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie und Hydrographie*, 61(6), 715-745.
77. McConnaughey, T. A., Burdett, J., Whelan, J. F., & Paull, C. K. (1997). Carbon isotopes in biological carbonates: respiration and photosynthesis. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 61(3), 611-622.
78. Moreno-Sánchez, X. G. (2009). *Estructura y organización trófica de la ictiofauna del arrecife de Los Frailes, Baja California Sur, México* (Doctoral dissertation, PhD thesis. CICIMAR-IPN: La Paz, Baja California Sur, México).
79. Mukherjee, S., Huntemann, M., Ivanova, N., Kyrpides, N. C., & Pati, A. (2015). Large-scale contamination of microbial isolate genomes by Illumina PhiX control. *Standards in genomic sciences*, 10(1), 18.
80. Mumby, P. J., Hastings, A., & Edwards, H. J. (2007). Thresholds and the resilience of Caribbean coral reefs. *Nature*, 450(7166), 98.
81. Muyzer, G., & Stams, A. J. (2008). The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature reviews microbiology*, 6(6), 441.
82. National Marine Fisheries Service (NMFS), National Oceanic and Atmospheric Administration. 2001. Diseases of Reef-building Corals Web site. [http://www.nmfs.noaa.gov/prot\\_res/PR/coraldiseases.html](http://www.nmfs.noaa.gov/prot_res/PR/coraldiseases.html).
83. Negri AP, Nicole S. Webster\*, Sven Uthicke, Emanuelle S. Botté, Florita Flores (2013). Ocean acidification reduces induction of coral settlement by crustose coralline algae. *Global Change Biology*, 19: 303–315. doi: 10.1111/gcb.12008

84. Negri AP, Webster NS<sup>1</sup>, Smith LD, Heyward AJ, Watts JE, Webb RI, Blackall LL, (2004). Metamorphosis of a scleractinian coral in response to microbial biofilms. doi: 10.1128/AEM.70.2.1213-1221.2004Appl. Environ. Microbiol.vol. 70 no. 21213-1221.
85. Nithyanand, P., & Pandian, S. K. (2009). Phylogenetic characterization of culturable bacterial diversity associated with the mucus and tissue of the coral *Acropora digitifera* from the Gulf of Mannar. *FEMS microbiology ecology*, 69(3), 384-394.
86. Nurk, S., Meleshko, D., Korobeynikov, A., & Pevzner, P. A. (2017). metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. *Genome research*, 27(5), 824-834.
87. Paerl, H. W. (2001). Bacterially mediated precipitation in marine Stromatolites. *Environmental Microbiology* 3(2):123-30.
88. Perry, C. T., & Hepburn, L. J. (2008). Syn-depositional alteration of coral reef framework through bioerosion, encrustation and cementation: taphonomic signatures of reef accretion and reef depositional events. *Earth-Science Reviews*, 86(1-4), 106-144.
89. Perry, C. T., Murphy, G. N., Kench, P. S., Smithers, S. G., Edinger, E. N., Steneck, R. S., & Mumby, P. J. (2013). Caribbean-wide decline in carbonate production threatens coral reef growth. *Nature communications*, 4, 1402.
90. Pester, M., Schleper, C., & Wagner, M. (2011). The Thaumarchaeota: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology. *Current opinion in microbiology*, 14(3), 300-306.
91. Peng, Y., Leung, H. C., Yiu, S. M., & Chin, F. Y. (2012). IDBA-UD: a de novo assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth. *Bioinformatics*, 28(11), 1420-1428.
92. Raina, J. B., Dinsdale, E. A., Willis, B. L., & Bourne, D. G. (2010). Do the organic sulfur compounds DMSP and DMS drive coral microbial associations?. *Trends in microbiology*, 18(3), 101-108.
93. Randall, J. E. (1963). The spawning and early development of the Atlantic parrot fish, *Sparisoma rubripinne*, with notes on other scarid and labrid fishes. *Zoologica*, 48, 49-60.
94. Ramos-Silva, P., Kaandorp, J., Herbst, F., Plasseraud, L., Alcaraz, G., Stern, C., & Marin, F. (2014). The skeleton of the staghorn coral *Acropora millepora*: molecular and structural characterization. *PLoS One*, 9(6), e97454.
95. Richards, T. A., Jones, M. D., Leonard, G., & Bass, D. (2012). Marine fungi: their ecology and molecular diversity. *Annual review of marine science*, 4, 495-522.
96. Richier, S., Merle, P. L., Furla, P., Pigozzi, D., Sola, F., & Allemand, D. (2003). Characterization of superoxide dismutases in anoxia-and hyperoxia-tolerant symbiotic cnidarians. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1621(1), 84-91.
97. Riding, R., & TomÁS, S. (2006). Stromatolite reef crusts, Early Cretaceous, Spain: bacterial origin of in situ- precipitated peloid microspar?. *Sedimentology*, 53(1), 23-34.
98. Riding, R. (2011). Reefal microbial crusts. *Encyclopedia of Modern Coral Reefs: Structure, Form and Process*, 911-915.
99. Rioja-Nieto, R., & Álvarez-Filip, L. (2019). Coral reef systems of the Mexican Caribbean: status, recent trends and conservation. *Marine pollution bulletin*, 140, 616-625.
100. Rogers, C. S., Suchanek, T. H., & Pecora, F. A. (1982). Effects of hurricanes David and Frederic (1979) on shallow *Acropora palmata* reef communities: St. Croix, US Virgin Islands. *Bulletin of Marine Science*, 32(2), 532-548.
101. Rodríguez-Martínez RE, Banaszak AT, McField MD, Beltrán-Torres AU, Álvarez-Filip L (2014) Assessment of *Acropora palmata* in the Mesoamerican Reef System. *PLoS ONE* 9(4): e96140. doi:10.1371/journal.pone.0096140

102. Rohwer, F, M Breitbart, J Java, F Azam, N Knowlton. 2001 Microbial diversity of scleractinian corals. *Coral Reefs*. 20 (1). 85-95.
103. Scoffin, T. P. (1992). Taphonomy of coral reefs: a review. *Coral reefs*, 11(2), 57-77.
104. Sheppard, C., Davy, S., Pilling, G., & Graham, N. (2017). *The biology of coral reefs*. Oxford University Press.
105. Scheufen, T., Krämer, W. E., Iglesias-Prieto, R., & Enríquez, S. (2017). Seasonal variation modulates coral sensibility to heat-stress and explains annual changes in coral productivity. *Scientific reports*, 7(1), 4937.
106. Shinzato C, Inoue M, Kusakabe M (2014) A Snapshot of a Coral “Holobiont”: A Transcriptome Assembly of the Scleractinian Coral, *Porites*, Captures a Wide Variety of Genes from Both the Host and Symbiotic Zooxanthellae. *PLoS ONE* 9(1): e85182. doi:10.1371/journal.pone.0085182
107. Schuhmacher, H. (1978). *Arrecifes coralinossu extensión, mundo animal y ecología* (No. 577.789 S2).
108. Stal, L. J., 2000. Cyanobacterial Mats and Stromatolites. En: B. A. Whitton and M. Potts (eds). *The ecology of cyanobacteria*. 61-120. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
109. Stolz, J. F. (2000). Structure of microbial mats and biofilms. *Microbial Sediments*:1-8.
110. Sumich, J.L. 1996. *An Introduction to the Biology of Marine Life*, sixth edition. Dubuque, IA: Wm. C. Brown. pp. 255-269.
111. Sweet MJ, Croquer A, Bythell JC. 2011. Development of Bacterial Biofilms on Artificial Corals in Comparison to Surface-Associated Microbes of Hard Corals *PLoS One*. 2011;6(6):e21195. doi: 10.1371/journal.pone.0021195. Epub 2011 Jun 24.
112. Sweet, M. J., Croquer, A., & Bythell, J. C. (2011). Bacterial assemblages differ between compartments within the coral holobiont. *Coral Reefs*, 30(1), 39-52.
113. Tunnell, J. W., Jr. 1992. Natural versus human impacts to Southern Gulf of Mexico coral-reef resources. *Proc. 7th Int. Coral Reef Symp., Guam* 1: 300-306.
114. Turchyn, A. V. (2005). *Oxygen isotopes in marine sulfate and the sulfur cycle over the last 140 million years* (Doctoral dissertation, Harvard University).
115. Uthicke S, Kriwy P. (2011a). Microbial diversity in marine biofilms along a water quality gradient on the Great Barrier Reef. *Systematic and Applied Microbiology* Volume 34, Issue 2, April 2011, Pages 116–126. DOI: 10.1016/j.syapm.2011.01.003
116. Uthicke S, Verena Witt, Christian Wild, Kenneth R. N. Anthony, Guillermo Diaz-Pulido. (2011b), Effects of ocean acidification on microbial community composition of, and oxygen fluxes through, biofilms from the Great Barrier Reef. *Environmental Microbiology*, 13: 2976–2989. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02571.x
117. Valderrama JC. 1981. The simultaneous analysis of total nitrogen and total phosphorus in natural waters. *Marine Chemistry*, 10: 109–122
118. Vollmer, S. V., & Kline, D. I. (2008). Natural disease resistance in threatened staghorn corals. *Plos one*, 3(11), e3718.
119. Warne, J. E. (1977). *Carbonate Borers--Their Role in Reef Ecology and Preservation: Reef Biota*.
120. Weber, L., Gonzalez- Díaz, P., Armenteros, M., & Apprill, A. (2019). The coral ecosphere: A unique coral reef habitat that fosters coral–microbial interactions. *Limnology and Oceanography*.
121. Webster, N. S., Smith, L. D., Heyward, A. J., Watts, J. E., Webb, R. I., Blackall, L. L., & Negri, A. P. (2004). Metamorphosis of a scleractinian coral in response to microbial biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(2), 1213-1221.
122. Wingender J., Flemming Hans-Curt. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* 8:623.
123. Witzany, G. (Ed.). (2017). *Biocommunication of archaea*. Springer.

124. Wooldridge, S. A. (2012). A new conceptual model of coral biomineralisation: hypoxia as the physiological driver of skeletal extension. *Biogeosciences Discussions*, 9(9).
125. Wuchter, C., Abbas, B., Coolen, M. J., Herfort, L., van Bleijswijk, J., Timmers, P., & Schouten, S. (2006). Archaeal nitrification in the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(33), 12317-12322.
126. Yang, S. H., Tandon, K., Lu, C. Y., Wada, N., Shih, C. J., Hsiao, S. S. Y., ... & Denis, V. (2019). Metagenomic, phylogenetic, and functional characterization of predominant endolithic green sulfur bacteria in the coral *Isopora palifera*. *Microbiome*, 7(1), 3.
127. Young, C. N., Schopmeyer, S. A., & Lirman, D. (2012). A review of reef restoration and coral propagation using the threatened genus *Acropora* in the Caribbean and Western Atlantic. *Bulletin of Marine Science*, 88(4), 1075-1098.
128. Zhu, T., & Dittrich, M. (2016). Carbonate Precipitation through Microbial Activities in Natural Environment, and Their Potential in Biotechnology: A Review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 4, 4. <http://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00004>
129. Zinjarde S, Devendra H, Dusane<sup>a</sup>, Vinay S, Pawar<sup>a</sup>, Y. V. Nancharaiiah<sup>b</sup>, V. P. Venugopalan<sup>b</sup>, Ameeta Ravi Kumar. (2011). Anti-biofilm potential of a glycolipid surfactant produced by a tropical marine strain of *Serratia marcescens*. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research* Volume 27, Issue 6, pages 645-654. DOI:10.1080/08927014.2011.594883.

**Vo.Bo Tutor**

*Luisa I. Falcón Q.*

**Dra. Luisa I. Falcón Álvarez**

## ANEXO I

Tabla Suplementaria 1 (S1). Resultados metagenómicos para el metabolismo del metano, el metabolismo del nitrógeno, el metabolismo del azufre, la fijación de carbono y la fotosíntesis. Esta tabla contiene: rutas, genes buscados (el número de hits por códigos KO), total de aciertos por rutas y la presencia de microorganismos asociados por rutas. Los KO se cuantificaron dentro de la anotación MG-RAST. Los organismos predominantes se obtuvieron dentro de la anotación GHOST-KOALA.

<b>Energy metabolism</b>	Searched genes	KO code (#of hits in the metagenome)	Total hits per pathway	Predominant organisms (Phylum or Class: Genus)
<b>Methane metabolism</b>				

Methanotrophy	<i>pmoA-amoA-Cmmo-X,Y,Z,B,C,D,mdh1,mdh2,MOX</i>	K10944(10), K10945(27), K10946(115), K16157(0), K16158(0), K16159(0), K16160(0), K16161(0), K16162(0), K14028(317), K14029(9)  K17066(0)	478	Thaumarchaeota: Methylomicrobium, Methylococcus and Candidatus Nitrosomarinus
Methanogenesis	<i>mcrA, B, G, C, D</i>	K00399(3), K00401(0), K00402(0), K03421(0), K03422(0)		Euryarchaeota:Methanopyrus,Methanobacterium, Methanosphaera, Methanopyrus and Methanothermus
CO <sub>2</sub> →methane	<i>fwdA,B,C,D,E,F,G,H,fr,mch, mtd, hmd and mer</i>	K00200(2347), K00201(506), K00202(187), K00203(8), K11261(36), K00205(0), K11260(0), K00204(0), K00672(1368), K01499(1163), K00319(2), K13942(0),		Euryarchaeota: Methanotorris and Methanocaldococcus



		K00320(3302)	90,478	
acetate→methane	<i>acs</i>	K01895(66488)		Euryarchaeota: Methanococcoides and Methanoculleus
methanol→methane	<i>mtaA</i> ,  <i>mtaB</i> , <i>mtaC</i>	K14080(0), K04480(17), K14081(0)		Euryarchaeota: Methanomassiliicoccus and Methanosarcina
methylamine/dimethylamine/trimethylamine→methane	<i>mtbA</i> , <i>mtmC</i> , <i>mtbC</i> , <i>mttC</i> , <i>mtmB</i> , <i>mtbB</i> , <i>mttB</i>	K14082(2), K16177(0), K16179(0), K14084(210), K16176(0), K16178(0), K14083(14839)		Euryarchaeota: Methanomassiliicoccus, Candidatus Methanomethylophilus and Methanosarcina
<b>Nitrogen Metabolism</b>				

Assimilatory nitrate reduction	<i>nasA, nasB, narB, NR, nirA, NIT-6</i>	K00372(8262), K00360(1000), K00367(267), K10534(10), K00366(1085), K17877(0)	10,624	Bacteroidetes, Cyanobacteria, Nitrospirae, Chloroflexi, Planctomycetes and Euryarchaeota: Nitrospira, Herpetosiphon, Rhodothermus, Phycisphaera
Dissimilatory nitrate reduction	<i>nirB, nirD, nrfA, nrfH</i>	K00362(9720), K00363(739), K03385(0), K15876(0)	10,459	Gamma proteobacteria, Actinobacteria, Planctomycetes, Deltaproteobacteria, Nitrospirae, Betaproteobacteria, Alpha proteobacteria, Bacteroidetes and Firmicutes: Planctomyces, Nitrospira and Cobetia.
Denitrification	<i>nirK, nirS, norB, norC, nosZ</i>	K00368(2181), K15864(0), K04561(3170), K02305(477), K00376(1796)	5,828	Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria, Bacteroidetes, Deltaproteobacteria: Rhodothermus, Phenyllobacterium, Gallionella, Methylobacterium, Methylomonas.
Nitrification	<i>hao, PmoA-amoA-C</i>	K10535(497), K10944(10), K10945(27), K10946(115)	649	Gamma proteobacteria, Alphaproteobacteria, Thaumarchaeota, Actinobacteria, Betaproteobacteria, Nitrospirae, Firmicutes:

				Candidatus Nitrosomarinus, Nitrosomonas, Nitrobacter, Nitrospira, Nitrosopumilus
Nitrogen fixation	<i>nifD, nifK, nifH, anfG, vnfD, vnfk, vnfG, vnfH</i>	K02586(262), K02591(244), K02588(155), K00531(0), K22986(0), K22987(0), K22898(0), K22899(0)	661	Proteobacteria: Clostridium, Geobacter and Bradyrhizobium
Anammox	<i>hdh</i>	K20935(0)	0	not found
<b>Sulfur Metabolism</b>				
Assimilatory sulfate reduction	<i>cysC, cysH, cysJ, cysI, Sir</i>	K00860(6469), K00390(7154), K00380(821), K00381(15205), K00392(1222)	30,871	Gamma proteobacteria, Actinobacteria, Deltaproteobacteria, Thaumarchaeota, Cyanobacteria, Alphaproteobacteria, Bacteroidetes, Betaproteobacteria, Nitrospirae, Firmicutes, Ascomycetes: Conexibacter, Haliangium, Nitrospira, Nitrosopumilus, Halomicronema, Candidatus Nitrosomarinus, Cobetia

Dissimilatory sulfate reduction and oxidation	<i>aprA, aprB, dsrA, dsrB</i>	K00394(4412), K00395(1044), K11180(1210), K11181(920)	7,586	Gamma proteobacteria, Firmicutes, Euryarchaeota, Alphaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Thermodesulfobacteria: Archaeoglobus, Candidatus Thioglobus, Desulfofundulus, Syntrophobacter, Pseudodesulfobacterium, Thiohalobacter and Sulfuricoccus
<b>Carbon fixation</b>				
3-hydroxypropionate bi-cycle	<i>accA, accB, accC, accD, mcr, mct, meh, smtA1, smtB</i>	K01962(12939), K02160(3914), K01961(27913), K01963(11863), K14468(52), K14469(239), K15052(0), K14470(1270), K09709(921), K14471(266), K14472(714)	60,091	Chloroflexi
Dicarboxylate-hydroxybutyrate cycle	<i>4hbl</i>	K14467(12)	12	Crenarchaeota: Thermoproteus

Reductive citrate cycle (Arnon-Buchanan cycle)	<i>pycA, pycB, pyc, frdA, frdB, frdC, frdD, frdE, aclA, aclB, ccsA, ccsB, ccl</i>	K01959(6329), K01960(6939), K01958(14627), K18556(0), K18557(0), K18558(0), K18559(0), K18560(0), K15230(0), K15231(0), K15232(0), K15233(0), K15234(0)	27,895	Alphaproteobacteria, Nitrospirae, Deltaproteobacteria, Chlorobi: Nitrospira
Calvin cycle	<i>prkB, rbcL, rbcS, GAPA, K01100</i>	K00855(2663), K01601(937), K01602(110), K05298(56), K01100(2)	3,768	Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Green algae, Cyanobacteria: Coccomyxa, Chondrus, Planctopirus and Chlorella
Hidroxypropionate-hidroxybutylate	K15039, K15018, K15019, K15020, K14466	K15039(0), K15018(0), K15019(0), K15020(0), K14466(6)	6	Crenarchaeota: Metallospira, Sulfurisphaera and Sulfolobus
Reductive-CoA (Wood-lungdahl)	<i>cooS, fdhA, fdhB, metF, acsE, acsB</i>	K00198(244), K05299(0), K15022(0), K00297(8901), K15023(0), K14138(11)	9,156	Deltaproteobacteria, Euryarchaeota, Planctomycetes and Spirochaetes: Methanotherix
<b>Photosynthesis</b>				

Photosystem I	<i>psaA,psaB,psaC,psaD,psaE,psaF,psaG</i>	K02689(616), K02690(688), K02691(49), K02692(55), K02693(18), K02694(60), K08905(0)	1,486	Green algae, Cyanobacteria, red algae and Stramenopiles: Chondrus, Coccomyxa, Chlorella, Chlamydomonas, Ostreococcus, Aureococcus, Prochlorococcus
Photosystem II	<i>psbA,psbB,psbC,psbD,psbE,psbF,psbF</i>	K02703(0), K02704(554), K02705(327), K02706(407), K02707(132), K02708(40), K02703(0)	1,460	Green algae, Cyanobacteria, red algae and Stramenopiles: Chondrus, Coccomyxa, Chlorella, Chlamydomonas, Ostreococcus, Aureococcus, Prochlorococcus
Allophycocyanin	<i>apcA,apcB,apcC,apcD,apcE,apcF</i>	K02092(0), K02093(114), K02094(2), K02095(45), K02096(247), K02097(26)	434	Cyanobacteria:Thermosynechococcus,Synechococcus,Pleurocapsa,Gloeobacter,Synechococcus,Stanieria, Pseudanabaena and Microcystis
Phycocyanin	<i>cpcA,cpcB,cpcC,cpcD,cpcE,cpcF,cpcG,pecA,pecB,pecC,pecE,pecF</i>	K02284(48), K02285(73), K02286(59), K02287(0), K02288(37), K02289(5), K02290(71), K02628(0), K02629(0), K02630(0), K02631(4), K02632(0)	297	Cyanobacteria:Thermosynechococcus,Synechococcus,Pleurocapsa,Gloeobacter, Synechococcus, Stanieria, Pseudanabaena and Microcystis

Phycocerythrin	<i>cpeA, cpeB, cpeC, cpeD, cpeE, cpeR, cpeS, cpeT, cpeU, cpeY, cpeZ</i>	K05376(48), K05377(45), K05378(60), K05379(54), K05380(30), K05381(3), K05382(16), K05383(28), K05384(17), K05385(16), K05386(16)	333	Cyanobacteria:Thermosynechococcus, Synechococcus, Pleurocapsa, Gloeobacter, Synechococcus, Stanieria, Pseudanabaena and Microcystis
LHC-antenna	<i>Lhca1, lhca2, lhca3, lhca4, lhca5, lhcb1, lhcb2, lhcb3, lhcb4, lhcb5, lhcb6, lhcb7</i>	K08907(4), K08908(0), K08909(0), K08910(5), K08911(0), K08912(4), K08913(2), K08914(2), K08915(0), K08916(0), K08917(0), K14172(0)	17	Chlorophyta: Micromonas

## ANEXO 2

```
java -jar -Xmx 200G trimmomatic-0.36.jar PE -threads 30 -quiet -validatePairs
PM2_forward.fastq PM2_reverse.fastq PM2_forward.Tp3.fastq PM2_forward.Tu3.fastq
PM2_reverse.Tp3.fastq PM2_reverse.Tu3.fastq
ILLUMINACLIP:/home/guitos/Trimmomatic-0.36/adapters/TruSeq3-PE.fa:2:30:10
TRAILING:3 LEADING:3 SLIDINGWINDOW:4:15 MINLEN:36
```

```
./guitos/idba_ud --num_threads 32 -r reads_PM2.fa --mink 64--maxk 64 -o
PM_k64_assembly --pre_correction &
```

```
./guitos/prodigal -i Ensamble_IDBA_Tp_contig.fa -o Prodigal_PM2.genes -a
Prodigal_PM2.proteins.faa -p meta &
```

```
./guitos/cd-hit -i .proteins.faa -o cd_hit_.fna.proteins -c 0.9 -n 5 -M 0 -d 0 -T 20 &
```

## RESEARCH ARTICLE

# Metagenome of *Acropora palmata* coral rubble: Potential metabolic pathways and diversity in the reef ecosystem

Andrés Sánchez-Quinto<sup>1,2</sup> , Luisa I. Falcón<sup>2\*</sup>

**1** Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, Ciudad de México, México, **2** Laboratorio de Ecología Bacteriana, Instituto de Ecología, UNAM, CDMX, México

✉ Current address: UNAM, Parque Científico y Tecnológico de Yucatán, Sierra Papacal, México.

\* [falcon@ecologia.unam.mx](mailto:falcon@ecologia.unam.mx)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Sánchez-Quinto A, Falcón LI (2019) Metagenome of *Acropora palmata* coral rubble: Potential metabolic pathways and diversity in the reef ecosystem. PLoS ONE 14(8): e0220117. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220117>

**Editor:** Erik Caroselli, University of Bologna, ITALY

**Received:** December 10, 2018

**Accepted:** July 9, 2019

**Published:** August 8, 2019

**Copyright:** © 2019 Sánchez-Quinto, Falcón. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** Sequences obtained in this study are available in MG-RAST under the accession number (mgs696720). Also in NCBI under the accession number PRJNA529185.

**Funding:** Funding for this project was granted through SEP-CONACYT (<https://www.conacyt.gob.mx/>) (La Secretaría de Educación Pública-Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) No. 254962 (L.I.F.) and PAPIIT-UNAM No. IN 202016-3 (<https://www.gob.mx/sep>) (L.I.F.). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Abstract

Over the past 30 years, the stony coral *Acropora palmata* has experienced an excessive loss of individuals showing few signs of recovery throughout the Mexican Caribbean, resulting in long stretches of coral rubble structures. When the coral dies, the skeleton begins to be colonized by algae, sponges, virus, bacteria and other microorganisms, forming a new community. Here we analyze, using a metagenomic approach, the diversity and biogeochemical cycles associated to coral rubble in La Bocana (Puerto Morelos, Q Roo, Mexico). This study provides the first broad characterization of coral rubble associated communities and their role in biogeochemical cycling, suggesting a potential view of a world where coral reefs are no longer dominated by corals.

## Introduction

Tropical coral reef ecosystems are often referred to as the rainforests of the oceans since they comprise only a small fraction of the bottom surface area, yet are estimated to provide habitat for over 25% of all marine species [1]. They are complex ecosystems consisting of a vast array of animals, plants, microorganisms, and viruses [2]. Coral reefs are formed by calcium carbonate skeletons secreted by stony corals. Other organisms such as algae and sponges, may play critical roles in the construction of these ecosystems [3]. They are extremely important for nutrient cycling in shallow, oligotrophic, tropical waters [4]. Hence, coral reefs are amongst the most biologically diverse and economically important ecosystems on the planet. They can provide ecosystem services including fisheries, coastal protection, building materials, new biochemical compounds, tourism, habitat and shelter for many organisms [5]. Reef productivity is largely dependent on the capture and recycling of nutrients and trace elements by reef-associated bacterial communities [4]. Moreover, healthy reefs are important for carbon and nitrogen fixation, providing sources of essential nutrients for the marine food chain [4]. Coral reef bacterial communities occupy a range of different habitats including the sediment, overlying water column, and benthic invertebrates such as corals and sponges [4].

Unfortunately, the impact of overfishing, coral bleaching and diseases, ocean acidification and other environmental change combinations are affecting the fitness of corals [5]. There are



**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

different perspectives on how degradation and loss of biological diversity affect the functions of coral reef ecosystems and their generation of system services. However, the ecological services of reef ecosystems are poorly understood and information related to these are scarce [6], especially in the Mexican Caribbean.

Over the past 30 years one coral genus (*Acropora* spp.) in particular has experienced dramatic declines in abundance, with few areas showing signs of recovery to date [7]. This decline in several areas of the Caribbean has been related to bleaching events, storms, neglectful tourism and diseases affecting the productivity, nutrient cycles, and health of the reefs [8–12]. Acroporids decline has great consequences in the functioning and structure of the reefs of the Mexican Caribbean since *Acropora palmata* combines branching morphology with high rates of calcification [13]. Currently, several dead *Acropora* rubble patches are abundant in the Mexican Caribbean [14].

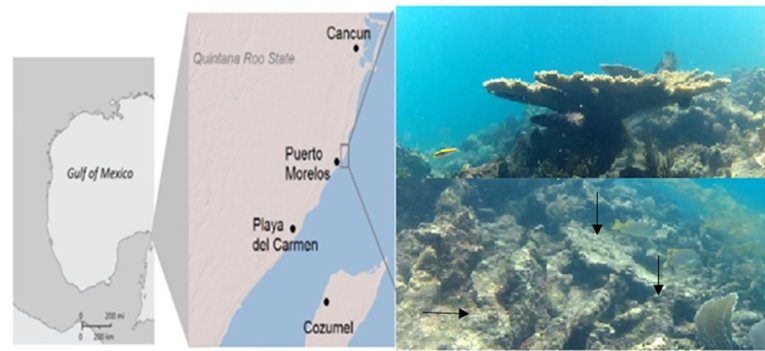
Coral rubble is often composed of material derived from the dead branches that originate from the reef front. When coral breaks it can accumulate *in situ* and be transported by currents to form rubble ridges in the reef lagoon, resulting in a permanent cycle of coral destruction and regeneration [15]. Lithification by either biological or physical cement stabilizes the secondary reef structure and is involved in the composition and preservation of the rubble [16]. The role of coral rubble in reef development is not only the contribution of a significant amount of carbonate to the primary reef structure but also aiding in stabilization (binding) of the reef framework. This process begins to create a new reef structure that increases in extension according to the deterioration of healthy *Acropora palmata* corals. Beltrán et al [17] suggested that microbial calcification in *Acropora* rubble can be induced in biofilms composed of extracellular polymeric substances (e.g. polysaccharides, proteins, lipids, nucleic acids) and a variety of microorganisms attached to coral rubble, becoming an important cementing agent. They also reported microbial diversity differences between the coral rubble biofilms and adjacent biotypes such as the water column, a microbial mat, the sediment and healthy *A. palmata* [17].

The colonization of coral rubble biofilms may have enormous relevance in the ecological processes within the ecosystem and biogeochemical cycles, although there is not enough knowledge regarding the composition or the function of the coral rubble biofilms [18]. The importance of genomic research of coral rubble may help understand this new feature that is becoming more abundant in coral reef ecosystems. This study presents the first metagenomic survey of *A. palmata* rubble in La Bocana (Puerto Morelos, Mexico) aiming to determine its composition and potential ecological role in an emerging coral reef ecosystem.

## Materials and methods

### Study area

The Puerto Morelos reef is part of the reef barrier called "Mesoamerican Reef System", which is the second largest in the world [19] located north of the state of Quintana Roo, approximately 33 km south of Cancun and 35 km north of Playa del Carmen. The climate is warm sub-humid with an average annual temperature of 26.3°C, a maximum in the summer of 35.5°C and a minimum in winter of 13°C. It is characterized by a reef lagoon located at 20° 52' 32" N and 86° 51' 37.79" W [19, 20]. The lagoon is defined by a coastline and by a coastal reef barrier of around 5.5 km in length; the distance varies between 350 and 1600 m from the coastline [21]. Lagoon depth ranges from 2–8 m with an average of 3.5 m [20]. The water inside the lagoon maintains a temperature between 31 °C and 32 °C in summer (August-September) and in winter it drops to 24 °C - 25°C (December-January). The average salinity is 35.7 and the water remains approximately at a pH of 8.19 [20].



**Fig 1. Geographic location (left) of sampling points within the study area "La Bocana" in the reef system of Puerto Morelos, Quintana Roo (Upper-right inset shows a healthy *A. palmata* and in the lower-right *A. palmata* coral rubble structures). Samples were collected using hammer and chisel.**

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220117.g001>

This study focuses on the coral rubble of *A. palmata* which is a common feature in the reef formation called "La Bocana Grande" [17], located ~3 km north of the Academic Reefs Systems Unit (RSU) UNAM (Puerto Morelos, Q Roo) (Fig 1). This reef has been identified as a region of high mortality of *A. palmata* and has the lowest living coral coverage in the National Park of Puerto Morelos [8, 22].

### Sample collection

All samples were obtained between July and August of 2015 from 9:00 h to 13:00 h using the Academic Reefs Systems Unit (RSU) boat. All samples were collected every 10 m in a single line transect to the north, from the starting point of 20° 52' 32" N and 86° 51' 02" W with scuba diving equipment using a hammer, chisel and gloves. Samples of 6 different points were 3 replicates from the coral rubble of the "Bocana Grande" were collected from a 3–7 m depth (Fig 1). Part of the samples were kept on ice during the trip and at -20 °C after arrival to the Reef Systems Unit, UNAM (RSU), while the other part were kept in water from the "Bocana Grande" for nitrogen fixation and methanogenesis assays.

### Nutrients

Six water samples for dissolved nutrient determinations were taken with sterile syringes. Samples were divided into two groups. For the first set of samples, 30 ml of pre-filtered water with nitrocellulose membranes (0.22 μm) were used, to which three drops of chloroform were added and kept frozen until analysis. The determination of the concentration of soluble reactive phosphorus (SRP), Ammonium, Nitrate and Nitrite was determined for this first set of samples, using a continuous flow analyzer (Skalar San Plus, Skalar) with the standard methods adapted by Grashoff et al [23] following the circuits of Kirkwood [24]. The second set of samples (not filtered water) were used for total nitrogen and total phosphorus analysis according to the Valderrama method [25]. The analyses were carried out with the support of the Laboratory of Aquatic Biogeochemistry, at the Institute of Marine Sciences and Limnology, UNAM.

### Elemental analysis (C, N and P) of coral rubble

For the elemental analysis of the coral rubble, superficial sections of approximately 1 cm<sup>3</sup> were extracted and kept frozen and in the dark until their analysis. Subsequently, the samples were dried at 12 °C with vacuum in the Savant SpeedVac drier (Whaltham, MA, USA) for at least 3

hours. Once dry, they were macerated with mortar and pestle to a fine powder. We obtained 20 mg of this mixture ( $n = 3$  for each coral rubble sub-sample) to estimate the elemental composition of C and N using a PerkinElmer 2400 elemental Analyzer. For phosphorus estimation, an oxidation with persulfate at high temperature using the Valderrama [25] method was performed. To estimate the elemental composition of the organic component of the coral rubble, the carbonates were removed, incubating approximately 150 mg of the dry and macerated mixture of each rubble fragment with 1.5 N hydrochloric acid in test tubes. These were placed in grills at 40°C inside the extraction hood. Once all the liquid was evaporated, the samples were resuspended in deionized water and centrifuged for 20 minutes at 4000 g at room temperature. The supernatant was recovered to analyze dissolved and particulate forms of N and P. The pellets were dried at 50°C and kept in a desiccator until analysis. The pellets of the organic component (~15 mg) were used for elemental analysis of C and N, as well as for the analysis by the Valderrama method of total nitrogen and total phosphorus. The analyses were carried out with the support of the Laboratory of Aquatic Biogeochemistry, at the Institute of Marine Sciences and Limnology, UNAM.

### Genomic extraction

Approximately 5 g of triplicate samples from six sites were extracted for total genomic content. Samples were macerated with liquid nitrogen and resuspended with extraction buffer (EDTA 0.25 M, NaCl 1.5 M, TRIS-HCl pH 8) and SDS (10%) repeating the freeze/thaw cycle three times, then incubated with lysozyme (30 mg/ml) for 30 minutes. Nucleic acids were extracted twice with phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25: 24: 1) and once with chloroform: isoamyl alcohol (24: 1), recovering the supernatant after each centrifugation (13,000 rpm for 15 min). Subsequently, the aqueous phase of each sample was transferred to a sterile tube and a volume of isopropanol, 10% sodium acetate 3 M and 2  $\mu$ l glycoblue was used to precipitate DNA o.n. at -20°C. Samples were centrifuged for 15 minutes at 13,000 rpm at room temperature. The supernatant was decanted and the pellet mixed with one mL of 70% ethanol, centrifuged at 13,000 rpm at room temperature for 5 minutes. The supernatant was decanted allowing the pellet to dry and resuspended in 30  $\mu$ l of 1x TE buffer. All samples were run on 1% agarose gels to determine the quality of total DNA and all extractions were collected in a single 1.5 ml eppendorf tube reaching ~30 micrograms/mL. Concentration was measured using Qubit 2.0 Fluorometer.

### Metagenomic analysis

After the extraction, all samples were pooled to prepare a single metagenomic library with the Nextera DNA Flex library prep kit (Illumina, San Diego, CA) where fragments of total DNA (1  $\mu$ g) were inserted into vectors and sequenced with whole genome sequencing technology (HiSeq 2 x 150), at the Yale Keck Center for Genome Analysis. We used two annotation strategies: MG-RAST [26] portal (<https://www.mg-rast.org/index.html?stay=1>) for taxonomical annotation and metabolic pathways and a “manual strategy” for identifying the organisms related to specific metabolic pathways. A total of 168,585,058 reads were recovered and 146,635,889 remained after quality filtering within MG-RAST. We removed all sequences from Enterobacteria phage phiX174 *sensu lato* since it is a common contamination in Illumina NGS [27]. Sequences obtained in this study are available in MG-RAST under the accession number (mgs696720).

For the “manual strategy” the quality of the sequences was evaluated with FASTQC [28]. Cuttings were made with Trimmomatic [29] to optimize the quality and they were reevaluated with FASTQC. Subsequently, the best assembly was compared using kmer from -22 to -99

with the programs: MEGAHIT [30], IDBA-UD [31] and metaSPAdes [32]. We decided to continue the next steps with the best quality assembly (IDBA-UD-1,952,389 contigs) evaluated by QUAST [33]. For gene prediction and read clustering, Prodigal (1,895,953 sequences) and CD-HIT (1,771,109 clusters) were used respectively [34, 35]. The annotation was performed using Ghost-Koala [36] (<https://www.kegg.jp/ghostkoala/>). To identify the organisms implicated in the pathways of interest in this study, which are those involved in biogeochemical cycling, we followed the annotation of “energy metabolism” classification within KEGG-pathways (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>).

Moreover, a classification into pathways by unique genes of each biogeochemical pathway (nitrogen metabolism, sulfur metabolism, methane metabolism, carbon fixation and photosynthesis) was implemented (Table 1). Hence, genes found in another module from the same metabolic pathway were discarded. For example: for dissimilatory nitrate reduction. First, we searched for all genes per module using KO’s codes for NarGHI, NapAB, NirBD and NrfAH in the Ghost-Koala annotation to confirm that the route was complete. Then, using KEGG “nitrogen metabolism- Reference pathway” we selected only the specific genes (in this case only NirBD and NrfAH since NarGHI and NapAB are genes shared with the denitrification module). Finally, once having the specific genes per module, the abundance of each KO code were identified within the Ghost-Koala annotation to select the predominant organisms. For the dissimilatory nitrate reduction: Gammaproteobacteria, Planctomycetes and Nitrospirae were the abundant phyla, and *Planctomyces*, *Nitrospira* and *Cobetia* were the abundant genus.

Potential pathways related to carbonate precipitation were searched within the metagenome. The pathways searched were: photosynthesis, ureolysis, denitrification, ammonification, sulfate reduction and methane oxidation [37]. These pathways were identified from the KO’s code already obtained from the KEGG portal within the MG-RAST annotation. The microorganisms associated to each pathway were incorporated by the Ghost-Koala annotation.

## Nitrogen fixation and methanogenesis assays

To estimate the nitrogen fixation rates produced by *A. palmata* coral rubble, we included samples from the same points used for metagenomic analysis and blank controls to compare the production. Each of the replicates remained submerged inside incubation chambers (4.5 cm by 10 cm) in a tub (1.5 m diameter by 60 cm high) with constant water flow from the coastal lagoon maintaining *in situ* temperature and light conditions. The chambers had an aqueous section in the base (160 ml), where the samples were located, and a gaseous section in the surface (20 ml) that was sealed with rubber plugs and silicone. Once the chambers were sealed, nitrogenase activity was estimated with the acetylene reduction assay [38]. Each replicate was subjected to atmospheric saturation (20% of gas phase) with acetylene, which is reduced to ethylene by nitrogenase ( $C_2H_2 \rightarrow C_2H_4$ ). Nitrogenase activity was monitored every 6 hours for 24 hours (5 total measurements counting initial measure). For measuring methanogenesis, same experiment as nitrogen fixation was performed but only air was added to evaluate methane accumulation.

Three milliliters of the gas phase were collected and injected into vacuum tubes (triplicates), for later analysis with gas chromatography [39]. The gas samples obtained from the acetylene reduction assays and methanogenesis experiment were analyzed in a gas chromatograph (Varian 3300), provided with a flame ionization detector, with which the amount of ethylene ( $C_2H_4$ ) or methane ( $CH_4$ ) were determined. No methane was detected. Nitrogen fixation rates were calculated as a function of the proportion of the area under the curve between the sample and the standard (100 ppm), adjusted to minutes and the slope of the gas standard curve. Then

**Table 1. Metabolic pathways analyzed following the energy metabolism proposed by KEGG pathways.**

Energy metabolism	Searched genes	KO code
<b>Methane metabolism</b>		
Methanotrophy	<i>pmoA-amoA-C,mmo-X,Y,Z,B,C,D, mdh1, mdh2, MOX</i>	K10944,K10945,K10946,K16157,K16158,K16159,K16160,K16161,K16162,K14028,K14029,K17066
Methanogenesis	<i>mcrA, B, G, C, D</i>	K00399, K00401, K00402, K03421, K03422
CO <sub>2</sub> →methane	<i>fwdA,B,C,D,E,F,G,H, fir, mch, mtd, hmd and mer</i>	K00200, K00201, K00202, K00203, K11261, K00205, K11260, K00204, K00672, K01499, K00319, K13942, K00320
Acetate→methane	<i>acs</i>	K01895
Methanol→methane	<i>mtaA, mtaB, mtaC</i>	K14080, K04480, K14081
Methylamine/dimethylamine/trimethylamine→methane	<i>mtbA, mtmC, mtbC, mttC, mtmB, mtbB, mttB</i>	K14082, K16177, K16179, K14084, K16176, K16178, K14083
<b>Nitrogen Metabolism</b>		
Assimilatory nitrate reduction	<i>nasA,nasB, narB, NR, nirA,NIT-6</i>	K00372, K00360, K00367, K10534, K00366, K17877
Dissimilatory nitrate reduction	<i>nirB, nirD, nrfA, nrfH, nirk, nirS, norB, norC, nosZ</i>	K00362, K00363, K03385, K15876, K00368, K15864, K04561, K02305, K00376
Denitrification	<i>nirk, nirS, norB, norC, nosZ</i>	K00368, K15864, K04561, K02305, K00376
Nitrification	<i>hao, PmoA-amoA-C</i>	K10535, K10944, K10945, K10946
Nitrogen fixation	<i>nifD,nifK, nifH, anfG, vnfD, vnfK, vnfG, vnfH</i>	K02586, K02591, K02588,K00531,K22986, K22987, K22898, K22899
Anammox	<i>hdh</i>	K20935
<b>Sulfur Metabolism</b>		
Assimilatory sulfate reduction	<i>cysC,cysH, cysJ, cysI,Sir</i>	K00860, K00390, K00380, K00381,K00392
Dissimilatory sulfate reduction and oxidation	<i>aprA, aprB,dsrA,dsrB</i>	K00394, K00395,K11180, K11181
<b>Carbon fixation</b>		
3-hydroxypropionate bi-cycle	<i>accA, accB, accC, accD,mcr,mct,meh,smtA1, smtB</i>	K01962, K02160, K01961, K01963, K14468, K14469, K15052, K14470, K09709, K14471, K14472
Dicarboxylate-hydroxybutyrate cycle	<i>4hbl</i>	K14467
Reductive citrate cycle (Arnon-Buchanan cycle)	<i>pycA,pycB, pyc, frdA, frdB, frdC, frdD,frdE, aclA, aclB, ccsA, ccsB, ccl</i>	K01959, K01960, K01958, K18556, K18557, K18558, K18559, K18560, K15230, K15231, K15232, K15233, K15234
Calvin cycle	<i>prkB, rbcL, rbcS, GAPA, K0110</i>	K00855, K01601, K01602, K05298, K01100
Hidroxypropionate-hidroxybutylate	K15039, K15018, K15019, K15020, K14466	K15039, K15018, K15019, K15020, K14466
Reductive-CoA (Wood-lungdahl)	<i>cooS, fdhA, fdhB, metF, acsE, acsB</i>	K00198, K05299, K15022, K00297, K15023, K14138
<b>Photosynthesis</b>		
Photosystem I	<i>psaA,psaB,psaC, psaD,psaE,psaF, psaG</i>	K02689, K02690, K02691, K02692, K02693, K02694, K08905
Photosystem II	<i>psbA,psbB,psbC, psbD,psbE,psbF, psbL</i>	K02703, K02704, K02705, K02706, K02707, K02708, K02703
Allophycocyanin	<i>apcA,apcB,apcC, apcD,apcE,apcF</i>	K02092, K02093, K02094, K02095, K02096, K02097
Phycocyanin	<i>cpcA,cpcB,cpcC, cpcD,cpcE,cpcF,cpcG, pecA, pecB,pecC, pecE,pecF</i>	K02284, K02285, K02286, K02287, K02288, K02289, K02290, K02628, K02629, K02630, K02631, K02632
Phycocerythrin	<i>cpeA, cpeB, cpeC,cpeD,cpeE,cpeR, cpeS,cpeT, cpeU,cpeY, cpeZ</i>	K05376, K05377, K05378, K05379, K05380, K05381, K05382, K05383, K05384, K05385, K05386
LHC-antenna	<i>Lhca1,lhca2,lhca3,lhca4,lhca5,lhcb1,lhcb2, lhcb3, lhcb4, lhcb5,lhcb6,lhcb7</i>	K08907, K08908, K08909, K08910, K08911, K08912, K08913, K08914, K08915, K08916, K08917, K14172

Genes associated to each pathway and KO code are listed.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220117.t001>

the values of the blanks were subtracted to correct planktonic rates of nitrogen fixation. The units obtained are in nanomoles of nitrogen per hour, which were normalized by organic carbon. All measurements were carried out in the Eukaryotic Functional Genomics Laboratory of the Genomics Sciences Center, UNAM.

## Extraction of pigments

Samples were macerated using mortar and pestle with liquid nitrogen and kept in the dark. To obtain phycobiliproteins, a volume (1:1) of 0.1 M potassium phosphate buffer was used, vortexed and incubated at 4°C for at least 2 hours. The tubes were centrifuged for 10 minutes at 8,000 rpm the supernatant was removed and deposited in a new 50 ml tube covered with aluminum foil. One volume of 90% cold acetone was added and samples were incubated at 4°C overnight and centrifuged again for 10 minutes at 8,000 rpm. The calibration for the readings of the samples was elaborated from the potassium phosphate buffer and acetone respectively. The absorbances were read with a USB4000 mini-spectrophotometer (Ocean Optics, USA) and a SpectraSuite software. To perform the calculation of phycobiliprotein and chlorophyll concentrations, organic carbon were used to standardize the data samples. The equation of Kursar et al. [40] and Jeffrey & Humphrey [41] was followed for each sample respectively. The analysis focused on the absorption variation between 400 nm to 750 nm. All pigment determinations were carried out in the Photobiology Laboratory of the Academic Reefs Systems Unit (RSU), UNAM (Puerto Morelos, QRoo).

## Results

The Puerto Morelos reef is characterized on the basis of its physicochemical variables as a typical Caribbean location with average salinity (36.34 UPS) and circumneutral pH (8.1). Dissolved nutrients are similar to those reported in other studies for the region (Table 2).

Coral rubble was initially characterized based on biogeochemical parameters to understand their organic matter and elemental proportions (Table 2). We now show that coral rubble is rich in C, N, organic matter and P. The quantification of pigments and chlorophylls indicates

**Table 2. Physicochemical characterization of the surface water and coral rubble biofilm (average of 3 subsamples).**

	Surface Water	Coral rubble biofilm
Salinity (UPS)	36.35 ± 0.05	-
pH	8.11 ± 0.02	-
N-NH <sub>4</sub> (μM)	1.23 ± 0.16	-
N- NO <sub>3</sub> (μM)	0.9 ± 0.104	-
N-NO <sub>2</sub> (μM)	0.06 ± 0.003	-
P-PO <sub>4</sub> (μM) = SRP	0.21 ± 0.002	-
SiO <sub>2</sub> (μM)	2.86 ± 0.878	-
DIN(μM)	2.2 ± 0.104	-
TN(μM)	10.211 ± 5.2	-
TP(μM)	4.51 ± 1.61	-
DIN: SRP	10.47	-
TN:TP	2.26	-
N organic (mg/g)	-	0.063 ± 0.007
C organic(mg/g)	-	0.702 ± 0.024
C organic: N organic	-	11.14
TP (mg/g)	-	0.33 ± 0.07
TN (mg/g)	-	33.41 ± 0.40
TC (mg/g)	-	371.36 ± 1.28
TN:TP	-	10.124
TC:TN	-	11.11
TC:TP	-	1125.33

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220117.t002>



Table 3. Pigments and chlorophylls concentration in coral rubble biofilms.

Coral rubble	Phycoerythrin (µg/g)	Phycocyanin (µg/g)	Allophycocyanin (µg/g)	Equation for calculation
	585.31 (±77.26)	165.15 (±50.94)	198.34 (±70.51)	Kursar et al (1983)
biofilms	Chla (µg/g)	Chlb (µg/g)	Chlc (µg/g)	Equation for calculation
	208.13 (±55.87)	37.14 (±1.5)	24.94 (±7.36)	Jeffrey and Humphrey et al (1975)

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220117.t003>

the presence of phycoerythrin, phycocyanin and allophycocyanin (Table 3). Phycoerythrin is in greater concentration in the coral rubble followed by phycocyanin and allophycocyanin. Chlorophyll *a* was the most abundant pigment, followed by *chl b* and *chl c*.

### Metagenomic composition of coral rubble

Metagenomic analysis recovered initially 168,585,058 sequences, of which 146,635,889 remained after quality filtering, which have an average length of approximately 151 bp and an average GC-content of 50.6%. Of the total sequences, about 11% were classified as unknown, 13% did not pass the quality control and 76% were annotated. Of the annotated sequences 1,153,764 (~ 1%) were associated with ribosomal RNA genes; 47,791,606 (~ 37.3%) were predicted protein sequences with known functions and 79,190,216 (~ 61.80%) were protein sequences with unknown function.

The metagenomic sequence dataset was dominated by Bacteria with 87.37% (11,048,161 sequences), followed by Eukaryota with 8.12% (1,026,844 sequences), Archaea 3.39% (428,679) and Viruses with 0.73% (92345). Around 0.39% were unclassified sequences.

Within Bacteria, Gammaproteobacteria 33.56% was the most abundant class, followed by Alphaproteobacteria 21.36%, Actinobacteria 6.95%, Deltaproteobacteria 4.25%, Betaproteobacteria 3.98%, Candidatus Poribacteria 3.84%, Planctomycetacia 3.28%, Clostridia 2.32%, Cyanobacteria 1.93%, Bacteroidia 1.89%, Bacilli 1.65%, Nitrospira 1.59%, Sphingobacteria 1.55% and 1.37% unclassified bacteria. The most abundant genus in Bacteria were unclassified organisms from *Candidatus Poribacteria* 5.39%. Then *Chromohalobacter* 3.66%, *Halomonas* 2.84%, *Nitrospira* 2.00%, *Pseudomonas* 1.55%, *Prevotella* 1.46%, *Candidatus Solibacter* 1.19%, *Planctomyces* 1.17%, *Burkholderia* 1.15% and *Rhodothermus* 1.10% (Fig 2A).

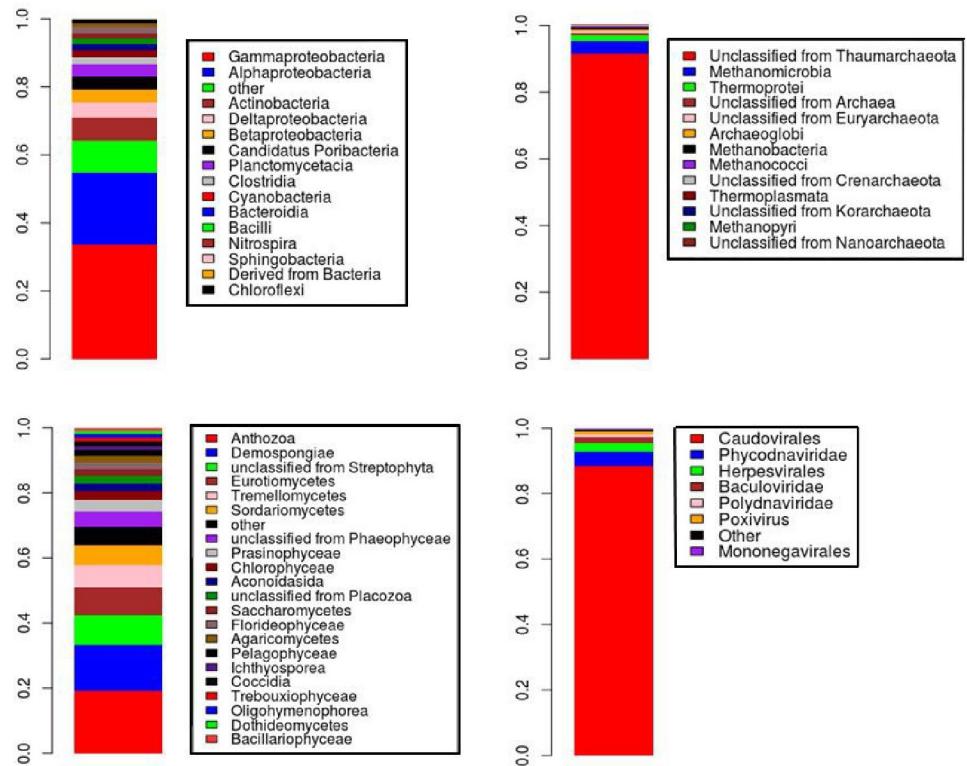
The most abundant class in the Archaeal domain were unclassified Thaumarchaeota 91.54% (354,552), followed by Methanomicrobia 3.69% and Thermoprotei 1.75% (Fig 2B). The most abundant genus were *Nitrosopumilus*, *Cenarchaeum*, unclassified Thaumarchaeota, *Methanosarcina*, among others.

The most abundant Eukaryotes were Anthozoa 19.00% and Demospongiae 14.25%. Then followed by Streptophyta 9.07%, Eurotiomycetes 8.51%, Tremellomycetes 6.81%, Sordariomycetes 6.31%, Phaeophyceae 4.64%, Prasinophyceae 3.24%, Chlorophyceae 2.67%, Aconoidasida 2.45%, Placozoa 2.34%, Saccharomycetes 2.2%, Florideophyceae 1.99%, Agaricomycetes 1.92%, Pelagophyceae 1.75%, Ichthyosporea 1.41%, Coccidia 1.26%, Trebouxiophyceae 1.19%, Oligohymenophorea 1.16%, Dothideomycetes 0.97% and Bacillariophyceae 0.95%. The most abundant genus were *Filobasidiella*, *Monosiga*, *Ectocarpus* and *Penicillium* (Fig 2C).

The most abundant dsDNA bacteriophages in the coral-rubble metagenome were *Caudovirales* (88.26%) followed by Phycodnaviridae with 4.70% and Herpesvirales 2.63% (Fig 2D). The most abundant virus were *Microvirus*, Myoviridae, Siphoviridae and T4-like viruses.

### The potential metabolic role of the coral rubble from a metagenomic approach

The metabolic potential of the coral rubble was dominated by a clustering based subsystem (13.37%) and genes coding for core metabolic functions such as carbohydrate utilisation



**Fig 2. Phylogenetic composition of coral rubble for each domain.** Bacteria 87.37% (A), Archaea 3.39% (B), Eukaryota 8.12% (C) and Virus 0.73% (D). A: Bacteria were dominated by Gammaproteobacteria (33.56%) and Alphaproteobacteria (21.36%). B: Archaea were dominated by unclassified Thaumarchaeota (91.54%). C: Eukaryotes were dominated by Anthozoa (19.00%) and Demospongiae (14.25%). D: Virus were dominated by Caudovirales (88.26%).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220117.g002>

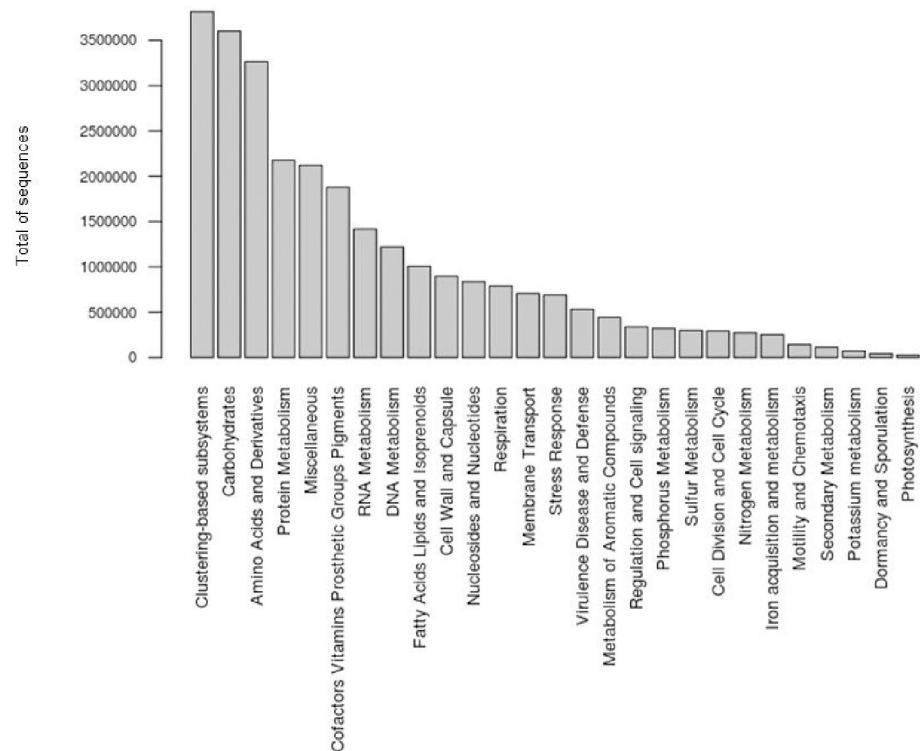
(12.6%), Amino Acids and Derivatives (11.44%), protein metabolism (7.62%), Miscellaneous (7.43%), Cofactors, Vitamins, Prosthetic Groups, Pigments (6.57%), RNA Metabolism (4.96%) and DNA metabolism (4.27%) (Fig 3).

Coral rubble harbors a great diversity of bacteria which are associated to the elemental cycling of N, S, and C. Results suggest (S1 Table) that these communities are reducing nitrate and are involved in denitrification. Nitrogen fixation was quantified in coral rubble (Fig 4) with maximum activities between midnight and early morning. Although the same assays were carried for methanogenesis, no production was recorded. The identity of microorganisms associated to each genetic pathway are shown in S1 Table.

Photosynthetic potential was considered as the sum of the annotated sequences obtained from photosystems I and II in conjunction with the type of pigment that organisms possess (Phycobilisome: Allophycocyanin, Phycocyanin, Phycoerythrin vs LHC antenna—photosynthesis). The most abundant organisms were green algae, cyanobacteria, red algae and Stramenopiles. The most abundant genus were *Chondrus*, *Coccomyxa*, *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Ostreococcus*, *Aureococcus*, *Prochlorococcus*, among others (S1 Table).

The most abundant metabolisms related to carbonate precipitation were ammonification, sulfate reduction, denitrification, ureolysis, photosynthesis and methane oxidation (Table 4). Some microbial examples found per pathway were *Cobetia* and *Nitrospira* for ammonification. For sulfate reduction, *Archaeoglobus* and *Candidatus Thioglobus* were relevant. *Nitrosopumilus* and *Gallionella* within denitrification, *Campylobacter* in ureolysis and *Synechococcus*,





**Fig 3. Metabolic potential of coral rubble.** The metabolic potential of coral rubble is dominated by clustering-based subsystems (3,816,880 sequences) and carbohydrates (3,601,705 sequences). Amino acids and Derivatives, Protein metabolism and Miscellaneous (3,266,144; 2,177,104 and 2,122,139 sequences respectively) are also highly represented. Sequences coding for Potassium metabolism, Dormancy and Sporulation and Photosynthesis were represented by > 100,000 sequences.

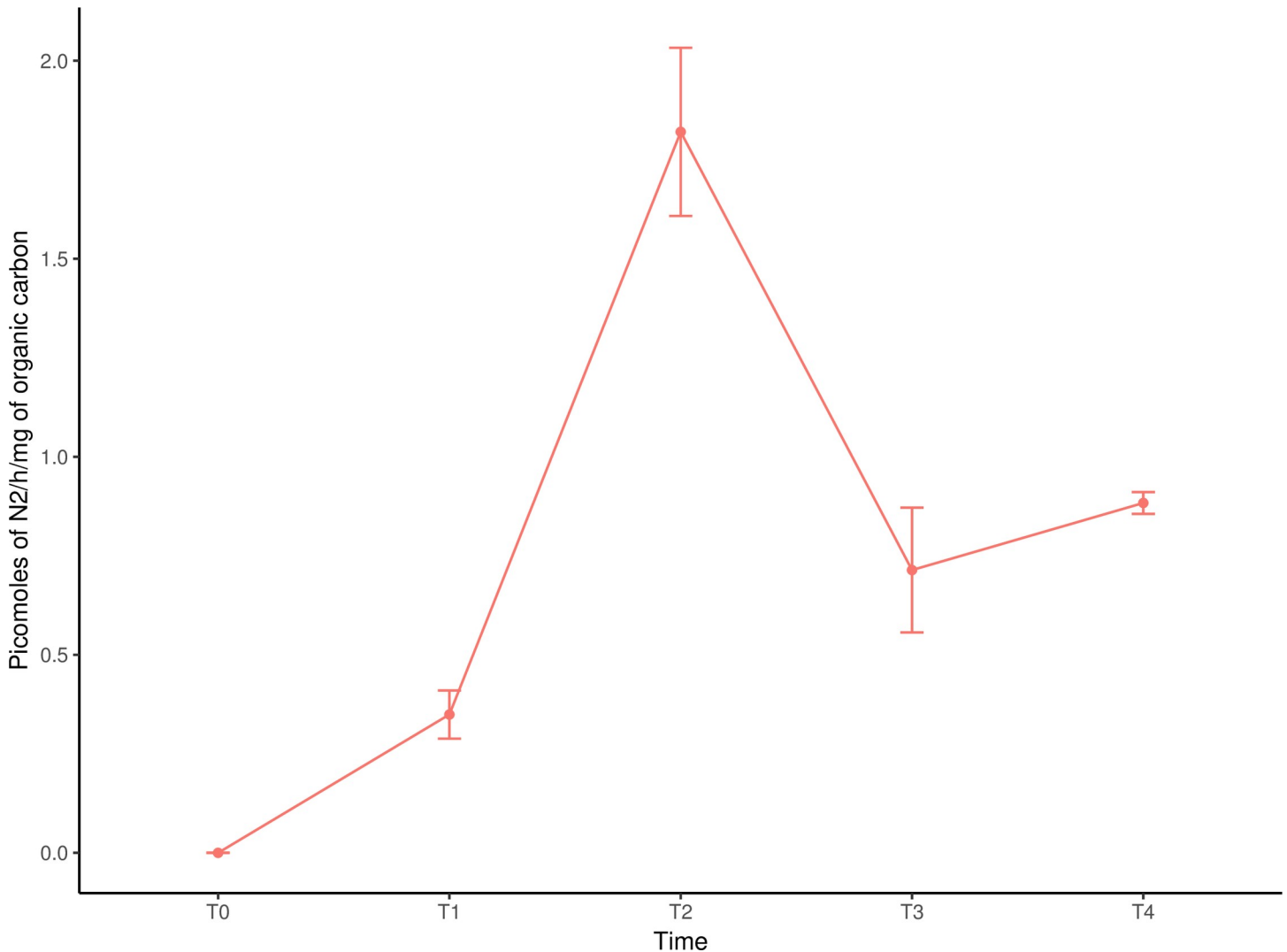
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220117.g003>

Microcystis and Micromona in the photosynthetic pathway. Finally, Methylomicrobium was identified in the methane oxidation pathway.

## Discussion

Current studies on coral rubble are scarce [17]. So far the coverage of dead coral rubble is a parameter seldom quantified in coral reef studies [7]. Nonetheless, these biofilm-covered structures are becoming conspicuous in certain reefs [7, 8, 12]. In the Mexican Caribbean, coral rubble has become a common sight of the reef landscape and so far, this is the first attempt to clarify their potential role in the environment. Previous reports have suggested that the microbial diversity of coral rubble is specific and different from healthy corals, surrounding water or sediment [17]. However, the potential role of coral rubble within the reef ecosystem had not been fully analyzed.

Reef biofilms are important as settlement cues for a variety of marine invertebrates, including corals [42, 43]. Nonetheless, coral rubble dominated- reefs such as La Bocana Grande in Mexico, do not sustain the settlement of coral larvae [22]. The potential role of coral rubble in reefs is poorly understood, this study represents an effort to deepen current knowledge on these fragile and highly vulnerable ecosystems. The data here reported consists of one metagenomic library, which was built from several subsamples representing the coral rubble diversity within La Bocana grande reef. We are aware that since samples were not separately indexed before pooling, the obtained results are less informative and may contain bias of the analysis.



**Fig 4. Nitrogen fixation quantified in coral rubble with the acetylene reduction assay over a 24h cycle.** Assay started at 12:00h; T1 = 18:00h; T2 = 24:00h; T3 = 6:00h; T4 = 12:00h.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220117.g004>

However, to our knowledge, this is the first metagenomic attempt to describe these communities and valuable information has been obtained. The functional role of microbes in coral reefs is becoming a new topic for investigation, since they play a fundamental role in the cycling of nutrients and energy on our planet [44]. The present metagenomic results point out the relevance of bacteria within the coral rubble, through their high abundance and involvement in several metabolic pathways.

Core metabolic functions including carbohydrate and protein metabolism dominated the coral rubble community. Carbohydrates and Protein metabolisms have an important role in energy storage within the coral rubble. Most microorganisms and algae can biosynthesize amino acids which have high representation in the metabolic results. Carbon, nitrogen and sulfur are essential and limiting nutrients for organisms in oceanic ecosystems [45]. Therefore, the ability for uptake of these nutrients may allow for marine organisms to survive in coral rubble ecosystems.

**Table 4. Metabolic pathways and organisms present in the coral rubble biofilms that have been associated with carbonate precipitation.**

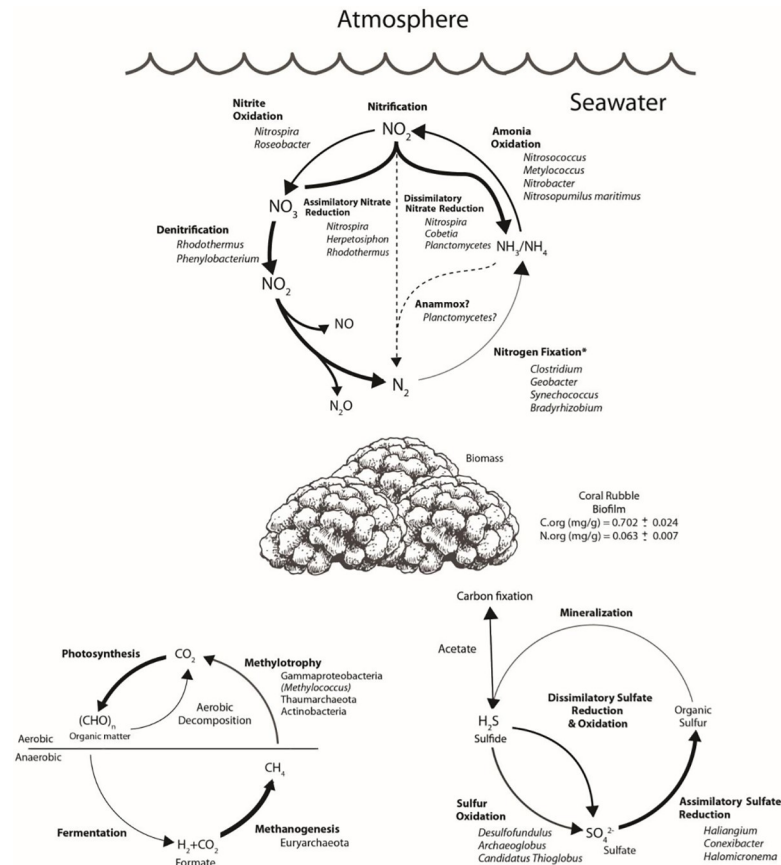
Metabolism	Number of hits in metagenome	Microbial groups	Identified groups	Example
Photosynthesis	4,027	photosynthetic organisms	Cyanobacteria & Algae	<i>Synechococcus</i> , <i>Microcystis</i> and <i>Micromonas</i>
Ureolysis	4,462	Ureolytic bacteria	Alphaproteobacteria & Epsilonproteobacteria	<i>Campylobacter</i>
Denitrification	5,828	Nitrate-reducing bacteria and archaea	Thaumarchaeota & Betaproteobacteria	<i>Nitrosopumilus</i> & <i>Gallionella</i>
Ammonification	53,660	Dissimilatory nitrate reduction bacteria	Gammaaproteobacteria & Nitrospirae	<i>Cobetia</i> & <i>Nitrospira</i>
Sulfate reduction	38,457	Sulfate reduction bacteria and archaea	Proteobacteria, Firmicutes, Euryarchaeota	<i>Archaeoglobus</i> & <i>Candidatus Thioglobus</i>
Methane oxidation	478	Methanogens	Gammaaproteobacteria	<i>Methylomicrobium</i> & <i>Methylococcus</i>

No carbonate precipitation measurements were done as part of this study. Hits from each pathway were obtained from MG-RAST annotation and organism from the Ghost-Koala annotation.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220117.t004>

Results suggest that coral rubble communities have an important role in nitrogen cycling through multiple pathways, where denitrification (5,928 hits), assimilatory and dissimilatory nitrate reduction (10,624 and 10,459 hits respectively) were more abundant. According to the metagenome total number of sequences, no apparent N limitation in the coral rubble is suggested (S1 Table and Fig 5). Hence, the incorporation of organic N and its remineralization stand out in this community. Archaea and Bacteria are likely to perform nitrification, in fact, according to Wuchter [46] *Nitrosopumilus maritimus* may dominate this process in seawater environments. According to the sequences obtained, nitrogen fixation is not a very abundant pathway. The *in situ* measurements of nitrogen fixation (Fig 4) revealed more nitrogenase activity between midnight and early morning, which coupled to the high numbers of nitrogenase-associated Alphaproteobacteria, suggests the role of heterotrophic diazotrophs in the coral rubble.

Recent studies have shown that coral reefs are likely to have an important role in biogeochemical cycling of sulfur [47–49]. Sulfur is found in seawater or sedimentary rocks, including calcium and magnesium carbonates [50]. Assimilatory sulfate reduction (30,871 hits) is the main pathway for the sulfur cycle in the assembled metagenome (S1 Table and Fig 5). This suggests that most sulfur is metabolized into organic compounds which are an essential component of proteins. The presence of sulfate-oxidizing bacteria, sulfate-reducing bacteria, sulfate reducing archaea (Euryarchaeota orders) and sulfur-dependent chemosynthesizer Crenarchaeota in the taxonomic metagenome annotation, implies a possible role for the coral rubble microbial community in the organic and inorganic sulfur cycling. Other organisms such as Actinobacteria, which was the third most abundant bacterial class, are related to the assimilation of sulphate, dissimilation of nitrate and methane metabolisms (data not shown). According to Anandan [51], Actinobacteria can also have an important role in the decomposition of organic matter and recycling of nutrients [51]. Thaumarchaeota, the most abundant phyla in Archaea, harbor ammonia-oxidizing chemolithotrophic organisms [52, 53] which were associated with nitrogen and carbon cycles. Anthozoa, Demospongiae and Streptophyta were the most abundant Eukaryotes which form part of the common reef diversity. Eurotiomycetes (Ascomycota) and Tremellomycetes (Basidiomycota) were fourth and fifth most abundant Eukaryota in the metagenomic assembly and have been reported to have potential roles in sulfur and nitrogen metabolism in coral reefs and marine environments [54–56].



**Fig 5. Model of the proposed functional role of bacteria in coral rubble assessed through metagenomics, indicating biogeochemical pathways associated to the nitrogen, sulfur and methane cycles.** Arrows (bold) represent direction of pathway, sequence abundance, and (dotted) missing pathways. Phylogenetic identity and metabolic pathway genes were obtained from the MG-RAST and Ghost-Koala annotations.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220117.g005>

Coral rubble is important in carbon cycling through methane transformations (S1 Table and Fig 5), where Euryarchaeota have a key role for methanogenesis. In fact, methanogenesis is only present in Archaea within the assembled metagenome. The rubble-associated methanotrophic archaea may play a role in methane transformation and C fixation. The presence of methanotrophs such as Euryarchaeota, Gammaproteobacteria and Thaumarchaeota suggests multiple methane transformation strategies within the community. Methane emission was not detectable *in situ*, although significantly more sequences hits were identified for methanogenesis than methane oxidation (S1 Table).

Microorganisms are fundamental in carbon cycling and they have important roles in different ecosystems. In coral rubble, all carbon fixation pathways were present in the assembled metagenome, indicating that these communities can fix CO<sub>2</sub> and assimilate C under variable conditions. Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Cyanobacteria and Green algae are the main oxygenic photosynthesizers, although we can not discard the presence of anoxygenic phototrophs because they were part of the microbial diversity (S1 Table).

The coral rubble in La Bocana is a lithified biofilm formed by the action of coralline algae and microbes, that creates a secondary reef structure [17] where fragments of dead *A. palmata* are bound together through mineral precipitation. Metabolic pathways associated to carbonate minerals precipitation were identified in the coral rubble (Table 4). According to Riding [57]

microorganisms can induce carbonate precipitation by altering solution chemistry or by serving as crystal nucleus [58]. In marine systems, photosynthetic microbes are responsible for triggering calcite precipitation [59]. Microbial carbonates produced by bacterial communities [16] and coralline algae, are important for the fixation of substrates [60] like coral rubble. Previous evidence has suggested that the surface of microbial biofilms can trap sediments and provide a medium for  $\text{CaCO}_3$  precipitation [17, 61]. The main carbonate mineralogies in shallow marine tropical waters are Mg-calcites, which are more abundant than aragonite in reefs [62]. Microbes can favor carbonate precipitation through different metabolic pathways. Within these metabolisms are photosynthesis, ureolysis, ammonification, denitrification, sulfate reduction, anaerobic sulfide oxidation, and methane oxidation [37]. These secondary reef structures could serve as substrate for corals or coralline algae to grow, although low coral coverage and renewal has been reported for La Bocana in Puerto Morelos [7, 22]. The rate and mechanisms of carbonate mineral precipitations in coral rubble merit future research.

## Conclusions

Coral rubble associated communities may play a significant role in coral reef environments through the remineralization of nitrogen, sulfur and carbon. Bacteria have a major role in coral-rubble, being the most abundant domain, where proteobacteria were the most abundant phylum and present in the majority of metabolic pathways. For future investigations, coral rubble from different reefs should be studied to understand if diversity is site-specific or if the metabolisms present in the coral rubble of La Bocana are a common feature in reefs that have high coral mortality. More comprehensive studies are required in order to discern the relative contributions of these rubble communities to the ecosystem. Understanding the diversity associated to coral rubble and the interactions in biogeochemical processes is essential to predict the functional changes occurring on coral reefs after coral death.

## Supporting information

**S1 Table. Metagenomic results for methane metabolism, nitrogen metabolism, sulfur metabolism, carbon fixation and photosynthesis.** This table contains: pathways, searched genes (the number of hits per KO codes), total of hits per pathways and the presence of associated microorganisms per pathway. The KO's were quantified within the MG-RAST annotation. The Predominant organisms were obtained within the GHOST-KOALA annotation. (DOCX)

## Acknowledgments

This manuscript is part of the degree requirements of the Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, UNAM (ASQ), who has a graduate student fellowship awarded by CONACyT. We thank technical assistance from O. Gaona and S. Castillo. R. Vasquez and S. Enriquez are acknowledged for support in the chlorophyll and pigment analysis. A. Leijas is acknowledged for support in the nitrogen fixation assays. F. Negrete Soto for fieldwork and transportation support in La Bocana. R. Iglesias and S. Enriquez for providing instruments for fieldwork, laboratory facilities and guidance over the PhD project. The Ecogenomics laboratory at the Parque Científico y Tecnológico de Yucatán, UNAM, Mérida provided facilities. Funding for this project was granted through SEP-CONACyT No. 254962 (L.I.F.) and UC MEXUS CN116. All sampling was done under collector permit No. PPF/DGOPA.033/2013 (L.I.F.).

## Author Contributions

**Conceptualization:** Andrés Sánchez-Quinto, Luisa I. Falcón.

**Data curation:** Andrés Sánchez-Quinto.

**Formal analysis:** Andrés Sánchez-Quinto.

**Funding acquisition:** Luisa I. Falcón.

**Investigation:** Andrés Sánchez-Quinto.

**Methodology:** Andrés Sánchez-Quinto.

**Project administration:** Luisa I. Falcón.

**Resources:** Luisa I. Falcón.

**Software:** Andrés Sánchez-Quinto.

**Supervision:** Luisa I. Falcón.

**Visualization:** Andrés Sánchez-Quinto.

**Writing – original draft:** Andrés Sánchez-Quinto.

**Writing – review & editing:** Luisa I. Falcón.

## References

1. Mulhall M. Saving the Rainforests of the Sea: an Analysis of International Efforts To Conserve Coral Reefs. Duke Environ Law Policy Forum [Internet]. 2009; 19 (2):321–51. Available from: [http://heinonlinebackup.com/hol-cgi-bin/get\\_pdf.cgi?handle=hein.journals/delp19&section=17](http://heinonlinebackup.com/hol-cgi-bin/get_pdf.cgi?handle=hein.journals/delp19&section=17)
2. Sebens KP. Biodiversity of coral reefs: What are we losing and why? Integr Comp Biol. 1994; 34 (1):115–33.
3. Sumich JL, Morissey JF. Introduction to the biology of marine life. 2004; 8:1–449.
4. Bourne DG, Webster NS. Coral reef bacterial communities. Prokaryotes Prokaryotic Communities Ecolophysiol. 2012;163–87.
5. Hoegh-Guldberg O, Mumby PJ, Hooten AJ, Steneck RS, Greenfield P, Gomez E, et al. Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. Science. 2007; 318 (5857):1737–42. <https://doi.org/10.1126/science.1152509> PMID: 18079392
6. Moberg F, Folke C. Ecological goods and services of coral reef ecosystems. Ecol Econ. 1999; 29 (2):215–33.
7. Rodríguez-Martínez RE, Banaszak AT, McField MD, Beltrán-Torres AU, Álvarez-Filip L. Assessment of *Acropora palmata* in the mesoamerican reef system. PLoS One. 2014; 9(4).
8. Alvarez-Filip L, Dulvy NK, Gill JA, Côté IM, Watkinson AR. Flattening of Caribbean coral reefs: Region-wide declines in architectural complexity. Proc R Soc B Biol Sci. 2009; 276(1669):3019–25.
9. Grober-Dunsmore R, Bonito V, Frazer TK. Potential inhibitors to recovery of *Acropora palmata* populations in St. John, US Virgin Islands. Mar Ecol Prog Ser. 2006; 321:123–32.
10. Thompson A, Costello P, Davidson J, Logan M, Schaffelke B, Uthicke S, et al. Reef rescue marine monitoring program. Rep AIMS Act coral reef Monit. 2011;128.
11. Baker DM, Rodríguez-Martínez RE, Fogel ML. Tourism's nitrogen footprint on a Mesoamerican coral reef. Coral Reefs. 2013; 32(3):691–9.
12. Rioja-Nieto R, Álvarez-Filip L. Coral reef systems of the Mexican Caribbean: Status, recent trends and conservation. Mar Pollut Bull. 2018
13. Young CN, Schopmeyer SA, Lirman D. A review of reef restoration and coral propagation using the threatened genus *Acropora* in the Caribbean and Western Atlantic. Bull Mar Sci. 2012; 88(4):1075–98.
14. Jordán-Dahlgren Eric R-MRE. Latin American Coral Reefs (Google eBook). 2003; 508. Available from: <http://books.google.com/books?id=LLwoNsqxI0C&pgis=1>
15. Blanchon P, Jones B, Kalbfleisch W. Anatomy of a fringing reef around Grand Cayman: Storm rubble, not coral framework. J Sediment Res. 1997; 67(1):1–16.



16. Rasser MW, Riegl B. Holocene coral reef rubble and its binding agents. *Coral Reefs*. 2002; 21(1):57–72.
17. Beltrán Y, Cerqueda-García D, Taş N, Thomé PE, Iglesias-Prieto R, Falcón LI. Microbial composition of biofilms associated with lithifying rubble of *Acropora palmata* branches. *FEMS Microbiol Ecol*. 2016; 92(1).
18. Ainsworth TD, Thurber RV, Gates RD. The future of coral reefs: a microbial perspective. *Trends Ecol Evol*. 2010; 25(4):233–40. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.11.001> PMID: 20006405
19. Instituto Nacional de Ecología. Programa De Manejo Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos, México. 2000;224.
20. Coronado C, Candela J, Iglesias-Prieto R, Sheinbaum J, López M, Ocampo-Torres FJ. On the circulation in the Puerto Morelos fringing reef lagoon. *Coral Reefs*. 2007; 26(1):149–63.
21. Jordan-Dahlgren E. El Ecosistema Arrecifal Coralino del Atlantico Mexicano. *Rev Soc Mex Hist Nat*. 1993;157–75.
22. Álvarez-Filip L, Banaszak A. Diagnostico y estado de conservación de las poblaciones de *Acropora* en el Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos. 2014
23. Grasshoff K, Ehrhardt M, Kremling K, Anderson LG. *Methods of Seawater Analysis*. 1999
24. Kirkwood DS. Sanplus segmented flow analyzer and its applications. *Seawater analysis*. Skalar. 1994
25. Valderrama JC. The simultaneous analysis of total nitrogen and total phosphorus in natural waters. *Mar Chem*. 1981; 10(2):109–22.
26. Keegan KP, Glass EM, Meyer F. MG-RAST, a metagenomics service for analysis of microbial community structure and function. *Methods Mol Biol*. 2016; 1399:207–33. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3369-3\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3369-3_13) PMID: 26791506
27. Mukherjee S, Huntemann M, Ivanova N, Kyrpides NC, Pati A. Large-scale contamination of microbial isolate genomes by illumina Phix control. *Stand Genomic Sci*. 2015; 10(APRIL2015)
28. Andrews S. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. Babraham Bioinforma [Internet]. 2010;<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/>. Available from: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:FastQC+a+quality+control+tool+for+high+throughput+sequence+data.#0>
29. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible read trimming tool for Illumina NGS data. *Bioinformatics* [Internet]. 2014; 30(15):2114–20. Available from: <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/30/15/2114>
30. Li D, Liu CM, Luo R, Sadakane K, Lam TW. MEGAHIT: An ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics*. 2015; 31(10):1674–6. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv033> PMID: 25609793
31. Peng Y, Leung HCM, Yiu SM, Chin FYL. IDBA-UD: A de novo assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth. *Bioinformatics*. 2012; 28(11):1420–8. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts174> PMID: 22495754
32. Nurk S, Meleshko D, Korobeynikov A, Pevzner PA. MetaSPAdes: A new versatile metagenomic assembler. *Genome Res*. 2017; 27(5):824–34. <https://doi.org/10.1101/gr.213959.116> PMID: 28298430
33. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. 2013; 29(8):1072–5. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086> PMID: 23422339
34. Hyatt D, Chen GL, LoCascio PF, Land ML, Larimer FW, Hauser LJ. Prodigal: Prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics*. 2010;11.
35. Fu L, Niu B, Zhu Z, Wu S, Li W. CD-HIT: Accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics*. 2012; 28(23):3150–2. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts565> PMID: 23060610
36. Kanehisa M, Sato Y, Morishima K. BlastKOALA and Ghost-KOALA: KEGG Tools for Functional Characterization of Genome and Metagenome Sequences. *J Mol Biol*. 2016; 428(4):726–31. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.11.006> PMID: 26585406
37. Zhu T, Dittrich M. Carbonate Precipitation through Microbial Activities in Natural Environment, and Their Potential in Biotechnology: A Review. *Front Bioeng Biotechnol* [Internet]. 2016; 4. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fbioe.2016.00004/abstract>
38. Capone DG. Determination of nitrogenase activity in aquatic samples using the acetylene reduction procedure. *Handbooks Methods Aquat Microb Ecol*. 1993;621–31.
39. Falcón LI, Cerritos R, Eguiarte LE, Souza V. Nitrogen fixation in microbial mat and stromatolite communities from Cuatro Ciénegas, Mexico. *Microb Ecol*. 2007; 54(2):363–73. <https://doi.org/10.1007/s00248-007-9240-3> PMID: 17450393

40. Kursar TA, Alberte RS. Photosynthetic Unit Organization in a Red Alga: Relationships between Light-Harvesting Pigments and Reaction Centers. *Plant Physiol* [Internet]. 1983; 72(2):409–14. Available from: <http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.72.2.409>
41. Jeffrey SW, Humphrey GF. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem und Physiol der Pflanz* [Internet]. 1975; 167(2):191–4. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015379617307783>
42. Negri AP, Webster NS, Hill RT, Heyward AJ. Metamorphosis of broadcast spawning corals in response to bacteria isolated from crustose algae. *Mar Ecol Prog Ser*. 2001; 223:121–31.
43. Webster NS, Smith LD, Heyward AJ, Watts JEM, Webb RI, Blackall LL, et al. Metamorphosis of a Scleractinian Coral in Response to Microbial Biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 2004; 70(2):1213–21. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.2.1213-1221.2004> PMID: 14766608
44. Kevin R. Arrigo. Marine microorganisms and global nutrient cycles. *Nature*. 2005; 437(7057):349–455. <https://doi.org/10.1038/nature04159> PMID: 16163345
45. Hassan R., Scholes R., & Ash N. Ecosystems and human well-being: current state and trends: Chapter 12:Nutrient Cycling. 2005;331–353.
46. Wuchter C, Abbas B, Coolen MJL, Herfort L, van Bleijswijk J, Timmers P, et al. Archaeal nitrification in the ocean. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2006; 103(33):12317–22. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0600756103>
47. Broadbent AD, Jones GB. DMS and DMSP in mucus ropes, coral mucus, surface films and sediment pore waters from coral reefs in the Great Barrier Reef. *Mar Freshw Res*. 2004; 55(8):849–55.
48. Raina J. B., Dinsdale E. A., Willis B. L., & Bourne D. G. Do the organic sulfur compounds DMSP and DMS drive coral microbial associations?. *Trends in microbiology*.2010; 18(3), 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.12.002> PMID: 20045332
49. Turchyn A V. Oxygen isotopes in marine sulfate and the sulfur cycle over the past 140 million years. 2005;(April):1–187.
50. Muyzer G, Stams AJ. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nat Rev*. 2008; 6:441–54.
51. Anandan R, Dharumadurai D, Manogaran GP. An Introduction to Actinobacteria Ranjani. *Actinobacteria—Basics Biotechnol Appl*. 2016; 2:1–37.
52. Pester M, Schleper C, Wagner M. The Thaumarchaeota: An emerging view of their phylogeny and eco-physiology. *Curr Opin Microbiol*. 2011; 14(3):300–6. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.04.007> PMID: 21546306
53. Witzany G. *Biocommunication of archaea*. Springer. 2017. 1–324 p.
54. Kimes NE, Van Nostrand JD, Weil E, Zhou J, Morris PJ. Microbial functional structure of *Montastraea faveolata*, an important Caribbean reef-building coral, differs between healthy and yellow-band diseased colonies. *Environ Microbiol*. 2010; 12(2):541–56. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02113.x> PMID: 19958382
55. Amend AS, Barshis DJ, Oliver TA. Coral-associated marine fungi form novel lineages and heterogeneous assemblages. *ISME J*. 2012; 6(7):1291–301. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.193> PMID: 22189500
56. Richards TA, Jones MDM, Leonard G, Bass D. Marine Fungi: Their Ecology and Molecular Diversity. *Ann Rev Mar Sci* [Internet]. 2012; 4(1):495–522. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-marine-120710-100802>
57. Riding RE, Awramik SM, Awramik SM. *Microbial sediments*. Springer Science & Business Media; 2000 Jan 28.
58. Aloisi G, Gloter A, Krüger M, Wallman K, Guyot F, Zuddas P. Nucleation of calcium carbonate on bacterial nanoglobules. *Geology*. 2006; 34(12):1017–20.
59. Arp G, Reimer A, Reitner J. Photosynthesis-induced biofilm calcification and calcium concentrations in phanerozoic oceans. *Science* (80-). 2001; 292(5522):1701–4.
60. Riding R. Classification of Microbial Carbonates. *Calcareous Algae and Stromatolites* [Internet]. 1991;21–51. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-52335-9\\_2](http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-52335-9_2)
61. Riding R. Reefal microbial crusts. *Encycl Earth Sci Ser*. 2011;Part 2:911–5.
62. Perry CT, Hepburn LJ. Syn-depositional alteration of coral reef framework through bioerosion, encrustation and cementation: Taphonomic signatures of reef accretion and reef depositional events. *Earth-Science Rev*. 2008; 86(1–4):106–44.