



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ESTUDIO DE LA COMUNIDAD BACTERIANA ASOCIADA AL BIOFILM DE RECLUTAS SEXUALES DE *Acropora palmata* EN EL CARIBE MEXICANO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

SANTIAGO MARTÍN RAMÍREZ

ASESORAS:

DRA. ANASTAZIA BANASZAK
DRA. PATRICIA THOMÉ ORTÍZ



Ciudad Universitaria Cd. Mx.

2016



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.

DEDICATORIA

A mis padres.

“El verdadero tiempo no se puede medir por el reloj o el calendario.
Tome las cosas con calma, porque si uno las comienza a tomar seriamente,
llegan a su fin.”

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres, amigos, y a todos los que me ayudaron a realizar este trabajo de investigación.

UNAM, UASA, FMVZ, UMDI Sisal, ICMYL, Dra. Anastazia Banaszak, Dra. Patricia Thomé, Dr. Oscar Rico, Dr. Alonso Morales, Dr. Hugo Montaldo, Dr. Alfredo Sahagún, MC. María Elena Loeza, MC. Luis Parmenio, MC. Raúl Castillo, MC Yizlem Beltrán, MC Yolitzin Rodríguez, MC. Karla Escalante, Víctor Molina, Hugo Mendoza, Santiago Zuñiga, Milou Arts, Miriam Schutter, Kelly Gómez, Sanne Verhoef, Capitán Amauri, Mario, Diego Yacamán, Laura, Sacnité, Serguei, Ana Cerón, Ana Limón, etc...

CONTENIDO

| | Página |
|---------------------------|---------------|
| RESUMEN | 1 |
| INTRODUCCIÓN | 3 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 15 |
| RESULTADOS | 26 |
| DISCUSIÓN | 42 |
| CONCLUSIONES | 46 |
| REFERENCIAS | 48 |

Resumen

MARTÍN RAMÍREZ SANTIAGO. Estudio de la comunidad bacteriana asociada al biofilm de reclutas sexuales de *Acropora palmata* en el Caribe Mexicano. Bajo la dirección de la Dra. Anastazia Banaszak y la Dra. Patricia Thomé Ortiz.

Los corales son colonias de pequeños animales conocidos como pólipos que viven en simbiosis formando al holobionte. Debido a la importancia ecológica del coral escleractinio *Acropora palmata* y a su estatus como especie con protección especial es preponderante entender los problemas que aquejan a este coral del Caribe Mexicano. Será fundamental para nuestra generación descifrar las causas de estos problemas para poder solucionarlos y así conservar la especie. Considerando que la mortalidad debido a enfermedades es uno de los principales motivos en la disminución de sus poblaciones, que además la patogenia y etiología de casi todas estas enfermedades es desconocida y que es probable que las enfermedades sean de origen multifactorial, es esencial entender el papel que juega la comunidad bacteriana asociada a *A. palmata* en el estado de salud del coral huésped y su relación con los demás simbiosiontes presentes en el holobionte. En este trabajo se pretende compilar información sobre la composición y riqueza de la comunidad bacteriana asociada al biofilm de diferentes colonias de *A. palmata* reclutadas sexualmente para observar las disimilitudes entre los genotipos de cada recluta y su *Symbiodinium*. Las muestras de biofilm se obtuvieron a partir de 76 colonias de *A. palmata* producidas en el laboratorio de

reproducción sexual de corales como parte de un programa de restauración de arrecifes del Caribe Mexicano.

Debido a que la comunidad bacteriana presente en los reclutas no fue adquirida en el mar, sino en el laboratorio, debemos determinar si los reclutas pueden ser un vehículo de introducción de bacterias exóticas a poblaciones silvestres.

En este trabajo se pudo observar la riqueza de géneros bacterianos en la comunidad asociada al biofilm de 17 reclutas sexuales producidos en 2011 y 2012, con 5 genotipos de *Symbiodinium*, en 3 diferentes fechas y 2 lugares. Se encontró evidencia, de que la comunidad bacteriana asociada al biofilm tiene una menor disimilitud entre los diferentes genotipos de *Symbiodinium* presentes en el holobionte, que de acuerdo al genótipo de los diferentes reclutas, la fecha de los muestreos o al lugar de colecta. Esto podría ser indicio de que la comunidad bacteriana presente en el biofilm tiene interacción no sólo con los pólipos de cada colonia sino también con el resto de los simbiositos presentes en el holobionte, mostrando que las interacciones entre el coral y todos sus simbiositos son muy complejas y que aún nos falta mucho para poder llegar a descifrar todo lo que ocurre en el holobionte y determinar el papel que tienen todos los simbiositos en el estado de salud o enfermedad de una colonia de coral.

Estudio de la comunidad bacteriana asociada al biofilm de reclutas sexuales de *Acropora palmata* en el Caribe Mexicano

Introducción

Los corales forman la estructura de los arrecifes que son considerados uno de los ecosistemas con mayor riqueza y diversidad de especies siendo imprescindibles para mantener la biodiversidad global (Moberg and Folke, 1999; Cárdenas et al., 2011). Los arrecifes son ecosistemas acuáticos tropicales restringidos a mares ubicados entre las latitudes 30° N y 30° S (Olivares & Severeyn, 2000). Tienen una gran importancia ecológica, ya que juegan un papel esencial en la dinámica costera al prevenir la erosión y disminuir la fuerza del oleaje. Constituyen una barrera de protección contra tormentas tropicales y huracanes al disipar la energía de las olas y corrientes. Crean ambientes favorables para los pastos marinos y manglares. Fungen como sitios de alimentación, desove, crianza, refugio y reproducción para muchas especies marinas. Proveen de servicios ambientales a comunidades que habitan costas cercanas y son clave para actividades como la pesca, el turismo, el comercio de especies para acuario y la obtención de algunos fármacos (Moberg et al., 1999; Cárdenas et al., 2011).

Los corales son animales invertebrados del filo Cnidaria, que pertenecen a la Clase Anthozoa junto con las anémonas y los abanicos de mar (Lalli & Parsons, 1995). Los corales que forman el arrecife son los corales duros, hermatípicos o escleractinios y son la base estructural, fisiológica y ecológica de los arrecifes coralinos (Cárdenas et al., 2011; Kooperman et al., 2007).

Los corales escleractinios están constituidos por una colonia de pólipos que crecen formando un esqueleto de carbonato de calcio (CaCO_3). Los pólipos son organismos tubulares fijos al sustrato formados por una cavidad gastrovascular la cual se abre al exterior en la parte superior para formar una boca rodeada por tentáculos (Lalli & Parsons, 1995; Galloway et al., 2007; Erice et al., 2012). Los pólipos se multiplican y crecen formando colonias. Cada colonia representa a un coral y cada coral esta formado por decenas o hasta miles de pólipos genéticamente iguales (Galloway et al., 2007, National Marine Fisheries Service, 2015).

Los pólipos coexisten con otros organismos en simbiosis formando al holobionte. El holobionte se forma de la relación simbiótica que existe entre los pólipos de una colonia, algas dinoflageladas del género *Symbiodinium* y una diversa comunidad microbiana que incluye bacterias, protistas, archeas, hongos y virus (Douglas, 2003; Reshef et al., 2006; Röthig et al., 2016; Sunagawa et al., 2009; Ainsworth et al., 2010). Esta relación es vital para el pólipo pues le brinda beneficios nutricionales, metabólicos e inmunitarios indispensables para mantener su homeostásis (Douglas, 2003; Reshef et al., 2006; Sunagawa et al., 2009; Ainsworth et al., 2010). *Symbiodinium* es un alga dinoflagelada unicelular que vive dentro de las células de muchos invertebrados marinos entre ellos los corales escleractinios. *Symbiodinium* tiene una gran influencia en la reproducción, el crecimiento y la formación del esqueleto a través del depósito de CaCO_3 . Aporta gran parte de los requerimientos metabólicos del huésped a través de productos fotosintéticos mientras que el huésped le brinda compuestos inorgánicos para la

fotosíntesis (Banaszak et al., 1993; Douglas, 2003; Rosenberg et al., 2007; Schwarz et al., 2008; Yamashita et al., 2012).

Mientras tanto la comunidad bacteriana asociada al holobionte consta de tres poblaciones: una asociada al esqueleto, otra al tejido intersticial y la última al biofilm o mucus producido por células de mucina presentes en la epidermis del pólipo (Ainsworth et al., 2010). Las bacterias asociadas al biofilm tienen un importante rol en la inmunidad y nutrición del huésped, ya sea aportando nutrientes que no son provistos por *Symbiodinium* como nitrógeno y fósforo, o mediante mecanismos de resistencia a patógenos como la producción de enzimas, sustancias antibióticas o simplemente a través de la inhibición de la adhesión de bacterias con potencial patógeno a la superficie coralina (Rohwer et al., 2001; Kooperman et al., 2007; Rosenberg et al., 2007; Röthig et al., 2016; Shnit-Orland & Kushmaro, 2009; Ainsworth et al., 2010; Cárdenas et al., 2011; Lee et al., 2016). La comunidad bacteriana presente en el biofilm ha mostrado diferenciarse según la especie de coral, la profundidad, la ubicación, la intensidad lumínica, la disponibilidad de nutrientes y la presencia de enfermedades (Koren et al., 2006; Weil et al., 2006; Kooperman et al., 2007; Rosenberg et al., 2007; Ainsworth et al., 2010; Mouchka et al., 2010; Cárdenas et al., 2011). Diferentes hongos y virus han sido asociados a corales principalmente en colonias enfermas (Marhaver et al., 2008). A partir de la identificación molecular en muestras de biofilm se han encontrado datos que sugieren una comunidad exclusiva del huésped. Además estos agentes fúngicos y virales podrían no solo infectar al pólipo, sino también a *Symbiodinium* o a la microbiota asociada al holobionte

(Patten et al., 2008; Rajasekar et al., 2012). Sin embargo, no existe suficiente información para entender la compleja y dinámica relación entre todos los integrantes del holobionte y el papel que estos juegan en la homeostasis del huésped (Roder et al., 2014).

Dentro de las principales especies de corales hermatípicos en el Caribe Mexicano se encuentra *Acropora palmata*. El género *Acropora* tiene tres especies de corales en el Caribe: *A. palmata*, *A. cervicornis* y *A. prolifera*. Sin embargo, se considera que *A. prolifera* es un híbrido de las 2 primeras y su abundancia y distribución son muy limitadas (Vollmer et al., 2002). De este modo, *A. palmata* y *A. cervicornis* tienen su rango de distribución en arrecifes que se encuentran a lo largo de todo el mar Caribe. (Vollmer & Palumbi, 2002; Kramer et al., 2000).



Figura 1

Distribución de *Acropora* spp. (National Marine Fisheries Service, 2015).

A. palmata forma colonias que crecen comúnmente en aguas turbulentas de entre 1 y 5 metros de profundidad aunque se han encontrado colonias a profundidades de hasta 30 metros (National Marine Fisheries Service, 2015). *A. palmata* se reproduce de dos formas, la más común es la reproducción asexual. La reproducción asexual ocurre cuando una colonia se fragmenta en uno o varios pedazos los cuales se desplazan y logran adherirse a un nuevo sustrato formando otra colonia. La reproducción sexual solo ocurre una vez al año. *A.palmata* es lo que se denomina un “broadcast spawner”, lo que implica que los pólipos liberan sus gametos directamente en la columna de agua. Al ser hermafroditas simultáneos cada pólipo libera paquetes sexuales con espermatozoides y óvulos. La fertilización y el desarrollo embrionario son exclusivamente externos y culminan con el desarrollo de una larva planctónica conocida como plánula la cual nada y se fija al sustrato transformándose en un nuevo pólipo. Los gametos sexuales provenientes de colonias genotípicamente iguales no se fertilizan por lo que cada nuevo pólipo reclutado forma una nueva colonia genotípicamente única. La producción de reclutas sexuales es la única forma de aumentar la diversidad genética y el éxito reproductivo de la especie (Lirman, 2000; Buckner, 2002; Guest et al., 2013).

A. palmata es la más grande de todas las especies del género. por lo que es el principal formador de hábitat, refugio y áreas de alimentación para muchas especies que residen el arrecife. Su abundancia es de vital importancia para el mantenimiento y función de los arrecifes en el Caribe, por lo que la pérdida o alteración de sus poblaciones podrían resultar en una reducción significativa de la

función y estructura del arrecife poniendo en riesgo a distintas especies (Buckner, 2002; Boulon et al., 2005; Kramer et al., 2000). *A. palmata* fue una de las especies dominantes dentro de los arrecifes del Caribe Mexicano. Era común que formaran colonias masivas ocupando grandes extensiones del arrecife (Buckner, 2002; Harvell et al., 2007). En los años 70's y 80's se inició un deterioro drástico en sus poblaciones debido a mortalidades masivas que continúan hasta hoy (Buckner, 2002; Gardner et al., 2003; Precht et al., 2016). Esta situación coincide con una mayor incidencia de enfermedades a la cuales es susceptible esta especie (Harvell et al., 2007). En el Caribe las enfermedades infecciosas emergentes representan la principal causa de disminución en las poblaciones de corales (Hayes & Goreau, 1998; Harvell et al., 2007).



Figura 2

Colonia de *A. palmata* en el Caribe Mexicano. Foto por: Paul Selvaggio

A. palmata está considerada como especie en peligro crítico de extinción en el libro rojo de Especies Amenazadas elaborado por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza. De acuerdo a la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES) se encuentra dentro del Apéndice II (National Marine Fisheries Service, 2015) y en México existe la NOM-059-SEMARNAT-2001 que establece a *A. palmata* en estatus de protección especial (Norma Oficial Mexicana, 2002).

Las principales amenazas que enfrentan las poblaciones de *A. palmata* en la actualidad son: baja diversidad genética, sedimentación, eventos de blanqueamiento, depredación, desastres naturales, enfermedades, variación en la temperatura y salinidad del mar, daño por factores antropogénicos como sobrepesca, encallamientos y expansión demográfica (Rodríguez-Martínez et al., 2001; Harvell et al., 2007).

En las últimas décadas el aumento en la incidencia de nuevas enfermedades infecciosas coralinas ha causado preocupación dentro de a la comunidad científica (Bourne et al., 2009), sin embargo, a pesar de su impacto y aun cuando el incremento en la mortalidad y prevalencia es sugerente, existe poca información con respecto a la identificación de los agentes causales o en la aplicación de métodos epidemiológicos para poder determinar su impacto o sus mecanismos de transmisión (Harvell et al., 1999; Daszak et al., 2001). Uno o varios de los organismos que forman parte del holobionte podrían tener influencia en la susceptibilidad o resistencia del huésped a enfermedades (Douglas, 2003; Reshef et al., 2006, Sunagawa et al., 2009). Hasta ahora, de las 18 nuevas enfermedades

reportadas a partir de las diferentes lesiones descritas solo se han identificado 6 agentes causales (Bourne et al., 2009).

| Categoría | Humanos | Corales |
|---|----------------|----------------|
| Especies huésped | 1 | 845 |
| Lesiones descritas | >1000 | 18 |
| Agentes causales identificados. | 171 | 6 |
| Enfermedades Bacterianas | 66 | 4 |
| Enfermedades Virales | 43 | 0 |
| Enfermedades Fúngicas | 15 | 1 |
| Enfermedades Parasitarias | 47 | 1 |
| Años invertidos en investigación | >2500 | 13 |
| Primer Patógeno identificado | 1854 | 1996 |
| Número de Investigadores | >1000000 | ≈3500 |

Cuadro 1

Comparación histórica de enfermedades infecciosas entre humanos y corales

(Bourne et al., 2009).

Confirmar que agentes son los causantes de las lesiones ha representado grandes dificultades ya que aun cuando se ha caracterizado la interacción entre el huésped y algún patógeno, no hay consistencia en la detección de dicho patógeno y las lesiones, haciendo que los signos sean inespecíficos complicando el diagnóstico. (Harvell et al., 1999; Willis et al., 2004; Bourne et al., 2009).

En la mayoría de los estudios que contemplan la diversidad bacteriana asociada al holobionte sólo se han utilizado técnicas que requieren métodos de cultivo bacteriológico aun cuando está bien establecido que la mayoría de las bacterias presentes en el holobionte no son cultivables (Rohwer et al., 2001). Existen paradigmas en los que menos del 1% de las bacterias obtenidas a partir de muestras en distintos ambientes se pueden cultivar (Cook et al., 2013).

En los últimos años se ha empezado a recopilar información utilizando métodos moleculares que permiten identificar bacterias independientes de cultivo. Utilizando técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y la Electroforesis en Gel por Gradiente de Desnaturalización (DGGE) es posible identificar con mayor precisión la comunidad bacteriana asociada al huésped e identificarla con éxito ayudando a brindar más información sobre la compleja y dinámica relación entre la comunidad bacteriana asociada a corales y los demás integrantes del holobionte, además de la posible relación entre dicha comunidad o algún agente bacteriano específico con las distintas enfermedades. (Rohwer et al., 2001; Sakai, 2008; Ceh et al., 2012).

La DGGE es un tipo de electroforesis que utiliza alta temperatura (60°C) y un gradiente desnaturizante de urea en un gel de poliacrilamida para separar amplicones de una misma longitud, pero de diferente composición de nucleótidos, resultando en un patrón de bandas definido según el perfil del diferencial de desnaturización de cada especie presente en la muestra, mostrando la

composición genética de una comunidad microbiana con alta sensibilidad y especificidad (Fischer & Lerman, 1983; Muyzer et al., 1993).

Así que aun cuando en las últimas décadas se ha logrado un progreso substancial determinando la composición, abundancia y diversidad de los microorganismos asociados al holobionte la interacción entre estos factores y el estado de salud del huésped sigue sin estar del todo claro. Se sabe que la comunidad bacteriana presente en el biofilm está representada tanto por especies comensalistas, como mutualistas o hasta patógenas invasoras, sin embargo aún se desconoce la composición y riqueza de dicha comunidad en un coral sano. Para poder llegar a entender la patogenia de las diferentes enfermedades se necesita más información sobre la riqueza y composición de la comunidad bacteriana asociada al coral de manera que se pueda observar si existe relación entre estos factores y la ausencia o presencia de enfermedad en una colonia, logrando una mayor comprensión de la relación entre las bacterias presentes en el biofilm, el coral huésped, *Symbiodinium*, todos los demás integrantes del holobionte y las condiciones ambientales prevalentes.

En este trabajo se pretende caracterizar la comunidad bacteriana asociada al biofilm de 76 reclutas sexuales sanos de *A. palmata* producidos en el laboratorio de la Unidad Académica de Sistemas Arrénciales (UASA) en el Estado de Quintana Roo, México. Caracterizando la comunidad bacteriana presente en el biofilm de los diferentes reclutas se podrá conocer la riqueza de géneros bacterianos presentes en cada genotipo recluta y su *Symbiodinium*, en distintos muestreos. Así se

podrán observar las disimilitudes entre los géneros bacterianos encontrados en cada recluta y se aportará información valiosa sobre la composición de dicha comunidad bacteriana . Además con el paso del tiempo se podrá llegar a confirmar que impacto tienen la composición, riqueza y diversidad de géneros bacterianos presentes en el biofilm con el estado de salud o enfermedad de un coral y se empezara a compilar información para poder determinar si la comunidad bacteriana presente en los reclutas producidos en un laboratorio es diferente de la comunidad bacteriana presente en poblaciones silvestres y así determinar si estas diferencias podrían representar algún riesgo de introducción de enfermedades, o especies bacterianas con potencial patógeno en las poblaciones silvestres (Rosenberg et al., 2007; Lee et al., 2016).

Hipótesis

La comunidad bacteriana presente en las muestras con biofilm de *A. palmata* será diferente entre los 76 reclutas producidos en el laboratorio. La comunidad bacteriana asociada al biofilm tendrá una menor disimilitud conforme a la mayor semejanza entre las características intrínsecas de cada holobionte y las condiciones ambientales prevalentes del sitio en el que se encontraban.

Objetivo General

Evaluar la riqueza genética en la comunidad bacteriana asociada al biofilm de 76 reclutas sexuales sanos de *A. palmata* producidos en el laboratorio mediante DGGE utilizando segmentos del gen 16S rRNA en el Caribe Mexicano.

Objetivos Específicos

1. Observar la riqueza de géneros bacterianos presente en la comunidad bacteriana asociada al biofilm de 76 reclutas sexuales sanos de *A. palmata* producidos en el laboratorio y la comunidad bacteriana presente en la columna de agua.
2. Observar las disimilitudes en la riqueza de la comunidad bacteriana asociada al biofilm de reclutas sexuales sanos de *A. palmata*, bajo diferentes condiciones del holobionte (el genotipo del recluta, el genotipo de *Symbiodinium*, la fecha de muestreo y el sitio).
3. Compilar información para determinar si la comunidad bacteriana presente en el biofilm de los reclutas producidos en el laboratorio es distinta a la comunidad bacteriana en el biofilm de los corales silvestres.

Material y Métodos

Reclutas de *Acropora palmata*

Las muestras de biofilm se obtuvieron a partir de 76 reclutas sexuales de *A. palmata*. Los reclutas fueron producidos en 2011 y 2012 como parte del proyecto de reproducción sexual de corales en el laboratorio de la Dra. Anastazia Banaszak en la Unidad Académica de Sistemas Arrénciales (UASA) como parte de un programa de restauración de arrecifes del Caribe Mexicano.



Figura 3

Recluta sexual de *A. palmata* producido en 2011

Se tomaron muestras de 76 reclutas, 30 fueron producidos en 2011 y 46 en 2012. Los gametos fueron recolectados en el arrecife, después fertilizados y cultivados

en el laboratorio hasta el asentamiento e inoculación con simbiontes. Después, los reclutas se trasladaron a una Granja de Corales en el Acuario de Xcaret hasta que en marzo de 2014 se trasladaron a 2 viveros marinos y posteriormente en 2015 a un arrecife dañado por encallamiento.

Los reclutas se dividieron en tres grupos y se movieron a sus respectivos destinos, 30 se trasladaron a un vivero marino ubicado en el Parque Nacional Arrecifes de Puerto Morelos. Otros 30 a un vivero marino, en "Las Ruinas" frente al EcoParque Xcaret y los 16 restantes se quedaron en las instalaciones del Acuario de Xcaret, algunos en exhibición al público. En febrero de 2015 todos los reclutas que se encontraban en el sitio frente al EcoParque Xcaret se trasladaron al vivero ubicado en el Parque Nacional Arrecifes de Puerto Morelos (PNAPM). Al mismo tiempo algunos de los reclutas que se encontraban en el vivero del PNAPM se movieron al arrecife "Cuevones" en el Parque Nacional Costa Occidental de Isla Mujeres, Punta Cancún y Punta Nizuc (PNCOIMPCPN), en el Estado de Quintana Roo.

De los reclutas que permanecieron en el Acuario de Xcaret algunos fueron puestos en exhibición y otros tuvieron distintos eventos de desprendimiento de tejido entre agosto de 2014 y enero de 2015. El genotipo de cada recluta y el de su *Symbiodinium* se obtuvieron mediante secuenciación genética (Gómez Campo y Banaszak, datos no publicados). Se muestrearon 17 diferentes genotipos de reclutas "Z61101", "AP1112", "AP1113", "AP1117", "AP1119", "AP1122", "AP1123", "AP1125", "AP1126", "AP1128", "AP1130", "AP1131", "AP1132", "D061116", "D111118", "F061127", "F151129" con 5 genotipos de *Symbiodinium* "F288", "F417", "MA64", "MA65", "MA67".

Muestreos

Los muestreos se realizaron entre abril y junio de 2014 y nuevamente entre enero y abril de 2015. Las fechas de los muestreos coinciden con el traslado de los reclutas a sus diferentes destinos. Además, los muestreos continuaron los primeros meses después del traslado, en el periodo de aclimatación de los reclutas a las condiciones ambientales del sitio nuevo. Los muestreos se hacían cada 2 o 3 semanas dependiendo de las condiciones ambientales, el calendario de salidas y la disponibilidad de equipo y personal tanto del EcoParque Xcaret como en la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales (UASA).

Se tomaron un total de 532 muestras de biofilm y 32 de agua en un total de trece inmersiones y cuatro visitas a las instalaciones del Acuario Xcaret. A partir de enero del 2015 sólo se tomaron muestras del vivero localizado en el PNAPM ya que los reclutas ubicados en el sitio las Ruinas fueron trasladados ahí. Además debido a que varios de los corales que estaban en el vivero PNAPM fueron trasladados al arrecife "Cuevones" no se pudieron tomar el mismo número de muestras. Se tomaron muestras en tres lugares del estado de Quintana Roo: uno en las instalaciones de EcoParque Xcaret y los otros dos en los viveros marinos.

| Lugar de Muestreo | Fecha | Número de Muestras |
|-------------------|-------------|--------------------|
| Xcaret Acuario | 07-abr-14 | 79 |
| Puerto Morelos | 17-abr-14 | 30 |
| Xcaret Acuario | 08-may-14 | 21 |
| Las Ruinas | 08-may-14 | 30 |
| Puerto Morelos | 19-may-14 | 30 |
| Xcaret Acuario | 13-jun-14 | 21 |
| Las Ruinas | 13-jun-14 | 30 |
| Xcaret Acuario | 21-jun-14 | 21 |
| Las Ruinas | 21-jun-14 | 30 |
| Puerto Morelos | 16-ene-15 | 30 |
| Puerto Morelos | 20-ene-15 | 30 |
| Puerto Morelos | 06-feb-15 | 30 |
| Puerto Morelos | 20-feb-15 | 30 |
| Puerto Morelos | 8-marz-15 | 30 |
| Puerto Morelos | 16-marzo-15 | 30 |
| Puerto Morelos | 9-abril-15 | 30 |
| Puerto Morelos | 26-abril-15 | 30 |

Cuadro 2

Calendario de muestreo

Viveros

Cada uno de los dos viveros había sido escogido por sus características de presencia de colonias de *A. palmata*, la profundidad y las condiciones ambientales, además de su cercanía al EcoParque Xcaret y a la UASA.

El vivero localizado dentro del Parque Nacional Arrecifes de Puerto Morelos se encuentra en las coordenadas 20° 52' 48.9" N 86° 50' 59.34" W en el municipio de Puerto Morelos. El sitio es conocido como "El Spa" y se encuentra dentro de la

laguna arrecifal en un lugar somero (4 a 6 metros de profundidad) y cubierto por pastos marinos y algunas colonias de corales.

El vivero que esta frente al EcoParque Xcaret esta en un sitio conocido como “Las Ruinas” se encuentra en las coordenadas $20^{\circ} 34' 49''$ N $87^{\circ} 6' 42''$ W en el municipio de Solidaridad. Es un lugar somero (3 a 4 metros de profundidad) con algunos fragmentos de coral esparcidos en el fondo y sin la protección de un arrecife por lo que la corriente y oleaje suelen ser mucho más fuertes.



Figura 4

Vivero marino “Spa”

Muestreo del Biofilm

Con el propósito de estudiar a la comunidad bacteriana de los reclutas sexuales de *A. palmata* se tomaron muestras de biofilm a través del raspado de la superficie coralina con hisopos estériles bajo el agua.

Previo al muestreo, los hisopos se metieron dentro de tubos Corning de 15 ml en condiciones de esterilidad; como control se tomó una muestra de 60 ml de agua adyacente a los reclutas con una jeringa estéril con tapa (Shnit-Orland & Kushmaro, 2009). Ya en el sitio, los tubos se abrieron de manera invertida bajo la columna de agua, se extrajo el hisopo y se frotó contra la superficie coralina.

Posteriormente se volvió a meter el hisopo al tubo y se cerró dejando la menor cantidad de agua dentro (Kooperman et al., 2007; Shnit-Orland & Kushmaro, 2009). Las muestras se trasladaron en hielo al laboratorio de la UASA donde se procesaron. Las muestras con biofilm se pusieron en 500µl de Buffer de Extracción (Tris-HCl 100mm: EDTA 100mm: NaCl 1.5m pH 8), mientras que las de agua se filtraron a través de una membrana de 22µm la cual se maceró en nitrógeno líquido y se adicionó 500µl de Buffer de Extracción. El macerado se puso en tubos de 2 ml y se almacenó a -80°C (Lyautey et al., 2005; Centeno et al., 2012).



Figura 5

Muestreo de un recluta de *A. palmata*

Análisis de Laboratorio

La caracterización de la comunidad bacteriana presente en el biofilm de *A. palmata* se realizó a través de la técnica de Electroforesis en Gel por Gradiente de Desnaturalización (DGGE por sus siglas en inglés) (Rohwer et al., 2001; Littman et al., 2010) según el protocolo de Riemann y colaboradores (1999) con modificaciones según el manual “DCode™ Universal Mutation Detection System” (1996).

Las condiciones desnaturalizantes se lograron por medio de una solución de urea y formamida (una solución 100% desnaturalizante consiste de urea 7M y 40% formamida). Se prepararon soluciones de alta y baja densidad, se mezclaron con una solución de acrilamida y se vertieron para formar un gradiente lineal de desnaturalización en el gel (Muyzer et al., 2004). Mientras el ADN migra en el gel las dos hebras de ADN se separan a concentraciones específicas de desnaturalizante. Cuando el amplicón llega a su punto de desnaturalización forma una pieza de ADN en forma de Y, la cual detiene por completo su migración en el gel, logrando que los fragmentos con diferentes puntos de desnaturalización permanezcan en diferentes posiciones del gel. Después de teñirlo el número de bandas en el gel es un indicativo de la diversidad genética de la muestra original (Muyzer et al., 1993, 2004; Duarte et al., 2012).

Extracción de ADN

Se extrajo el material genético presente en las muestras utilizando el protocolo de Centeno y colaboradores (2012). Se añadieron 5 μ L de lisozima (20 mg/ml) y 5 μ L de CTAB (al 6%) a la muestra original, se homogeneizó en un vortex y se incubó por 30 minutos a 37°C. Después se añadieron 50 μ L de proteinasa K (50mg/ml) y 5 μ L de SDS (al 20%), se homogeneizaron e incubaron durante 60 minutos a 60°C. Posteriormente, el sobrenadante se cambió de tubo y se mezcló con una solución 25:24:1 de fenol:cloroformo:isoamil-alcohol y se centrifugó por 10 minutos a 10,000 rpm. Después de centrifugarse, la muestra se separó en dos fases, una acuosa donde se encuentra el ADN y otra orgánica en donde están suspendidas

proteínas, polímeros y carbohidratos (López García, 2013). Se tomó el sobrenadante de cada muestra (fase acuosa) y se pasó a otro tubo. Este paso se realizó por duplicado para cada muestra. Después, se añadieron 500 μ L de cloroformo al sobrenadante y se centrifugó por 15 minutos a 6,500 rpm. El ADN se precipitó utilizando 300 μ L de etanol y centrifugando por 10 minutos a 10,000 rpm. Finalmente se lavó el precipitado con etanol al 70%, se volvió a centrifugar a 10,000 rpm por 5 minutos, se quitó el sobrenadante y se dejó secar el pellet por 3 minutos. Finalmente, se re-suspendió el precipitado en 30 μ L de agua y se congeló la muestra a -80°C .

El resultado de cada extracción fue verificado con geles de agarosa al 1% en un trans-iluminador ChemiDoc-It² UVP. Posteriormente se determinó la concentración y pureza del ADN por medio del diferencial de la densidad óptica a 260 y 280nm utilizando un espectrofotómetro BIO-RAD SmartSpec 3000 (Roder et al., 2014). Finalmente, la concentración de ADN en cada muestra se ajustó a 50ng por mililitro.

Amplificación de ADN

Mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se amplificó un segmento de 300 pares de bases (bp) del gen 16S rRNA a través de un PCR anidado utilizando los iniciadores 517R (5' ATTACCGCGGCTGCTGG 3') y 358F (5'CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTAC) con una GC grapa o pinza, (5'GGGAGGCAGCAG-3') según el protocolo de Riemann y colaboradores (1999) con modificaciones a partir de un PCR en

gradiente utilizando distintas temperaturas de alineamiento. Siendo que 62°C fue la temperatura de alineamiento más eficiente.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (BIO-RAD T100 Thermal Cycler). El producto y tamaño de todas las amplificaciones se verificó en un trans-iluminador ChemiDoc-It² UVP con geles de agarosa al 1% y un Marcador de Peso Molecular (MPM, Quick-Loas 100 bp DNA Ladder). El DNA se visualizó tiñendo con colorante fluorescente Gel-red (Biotum).

Huella Genética (DGGE)

Las DGGEs se hicieron utilizando dos concentraciones de Bis-Acrilamida (37:5:1) en el gel 6 y 8%. Además de 2 gradientes de Urea (7M) y formamida desionizada, 30-70% y 40-70%. Cada pozo del gel se cargó con 90µL del producto amplificado de ADN y 30µL de buffer de carga. Cada DGGE se corrió durante 20 horas a 60V, en un DCode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Laboratories). Todos los geles se tiñeron con colorante fluorescente Gel-red (Biotum) y se observaron en un trans-iluminador ChemiDoc-It² UVP, se fotografiaron y las bandas se analizaron en el VisionWorks®LS software. El proceso de análisis en cada gel consistió de los siguientes pasos: definir el área del gel que se iba a analizar, corregir la interferencia en la imagen (background noise), normalizar los parámetros al definir las bandas, fotografiarlo, buscar y analizar las bandas; cortar las más evidentes, re-suspenderlas en 30 µL de agua durante una noche, obtener el sobrenadante y congelarlo a -80°C. Finalmente, el material genético obtenido en

dicho sobrenadante se re-amplificó con los iniciadores 517R y 358F para verificar si eran viables para secuenciación (Rademaker et al., 2004; Duarte et al., 2012).

Análisis Estadístico

Cada banda o grupo de bandas encontradas en una misma posición dentro del gel fueron consideradas un mismo género bacteriano. A partir de esta información se generó una base de datos con la identidad genética de cada recluta, la identidad genética de sus respectivos *Symbiodinium*, el sitio de muestreo, la fecha, la identidad genética de todos los géneros bacterianos encontrados y su presencia o ausencia en cada una de las muestras. Finalmente, se obtuvo la abundancia de cada género bacteriano, se determinó la riqueza (S) según las diferentes condiciones de cada recluta y se calculó la distancia de Jaccard entre la abundancia de los géneros bacterianos en las diferentes variables para observar las disimilitudes entre la riqueza de géneros bacterianos en cada recluta según las variables (Gardener, 2014; Duarte et al., 2012; Crawley, 2007).

Resultados

Análisis de Laboratorio

El trabajo de laboratorio se realizó en el Laboratorio de Microbiología Marina en la UASA y el Laboratorio Central de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación en Sisal. Se extrajo exitosamente el material genético presente en 258 muestras, el resto dieron resultados negativos o no fueron procesadas debido a problemas durante su almacenamiento a -80°C . De las 258 extracciones exitosas se obtuvieron 206 amplificaciones positivas, 179 con material genético bacteriano extraído de las muestras con biofilm y 19 con el material genético extraído de las muestras con agua. Las amplificaciones se utilizaron para hacer 8 DGGE de los cuales solo 6 pudieron someterse al análisis de bandas. Se identificaron 55 géneros bacterianas en 17 genotipos de reclutas de *A. palmata*, con 5 genotipos diferentes de *Symbiodinium*, en 2 sitios y 3 muestreos (M1: 06 de febrero, M2: 9 de abril y M3: 26 de abril del 2015). Además 14 géneros bacterianos encontrados en las muestras de biofilm, también se encontraron en las muestras de agua.

Extracciones de ADN

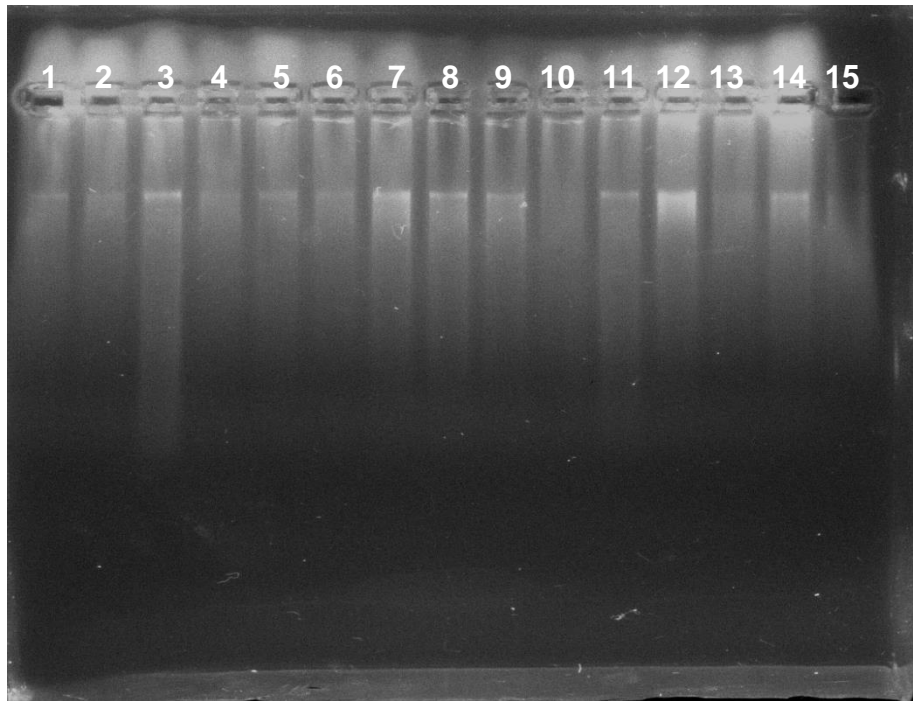


Figura 6.

Electroforesis del producto de las extracciones de material genético de las muestras con agua y biofilm utilizando el método de Centeno y colaboradores (2012). En los pozos 1 a 14 se cargaron 5 μ L del producto de la extracción 3 μ L de buffer de carga y 1 μ L de gel red. El pozo 15 se usó para el control negativo.

Amplificación ADN

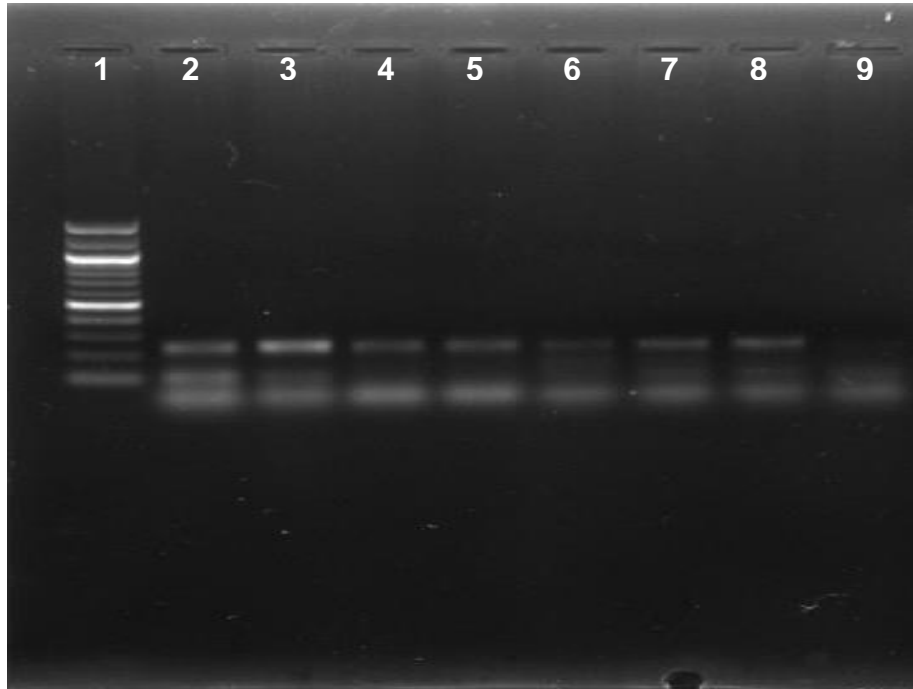


Figura 7.

Electroforesis del producto de la amplificación del gen 16S ribosomal con el producto de las extracciones de la comunidad bacteriana presente en el biofilm de *A. palmata* y en la columna de agua. El pozo 1 se cargó con 3 μ L de MPM 100bp. En el resto de los pozos se cargó una mezcla de 5 μ L del producto de la amplificación, 2 μ L de buffer de carga y 1 μ L de gel red. El pozo 9 se usó para el control negativo.

DGGE

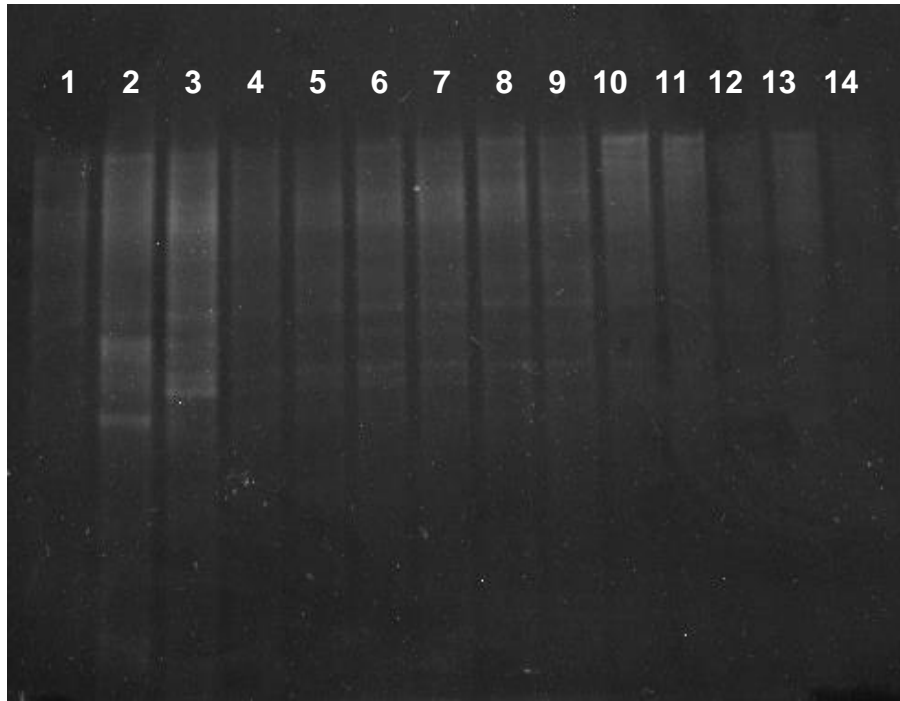


Figura 8.

Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización según el protocolo de Riemann y colaboradores (1999) con modificaciones según el manual “DCode™ Universal Mutation Detection System” (1996) utilizando un gel al 6% de acrilamida y un gradiente de urea y formamida del 30 al 70%. Cada pozo se cargó con 90 μ L del producto de la amplificación de una muestra y 30 μ L de buffer de carga.

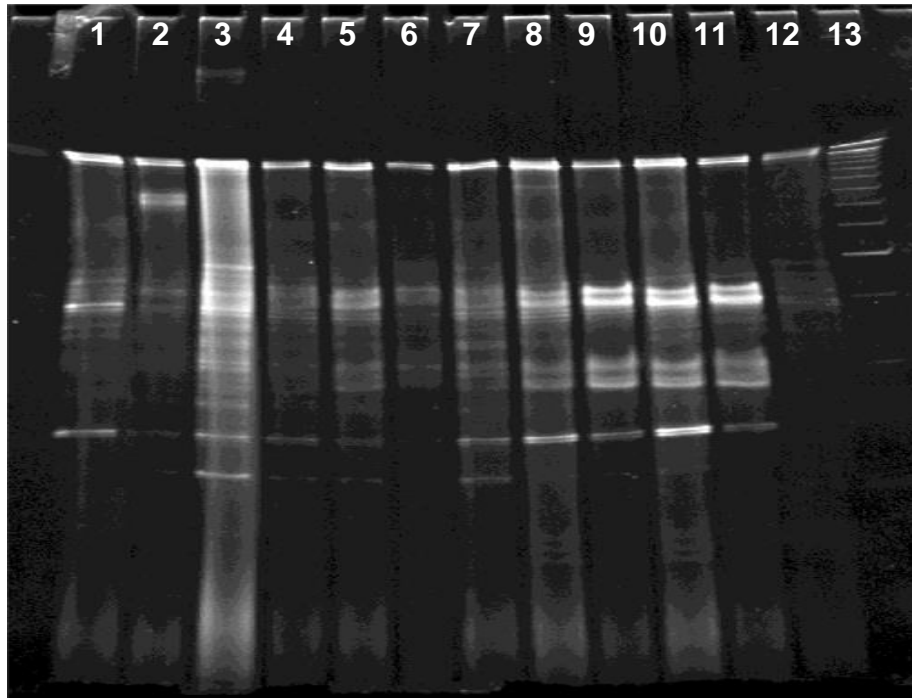


Figura 9.

Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización según el protocolo de Riemann y colaboradores (1999) con modificaciones según el manual “DCode™ Universal Mutation Detection System” (1996) utilizando un gel al 8% de acrylamida y un gradiente de urea y formamida del 40 al 70%. Cada pozo se cargó con 90 μ L del producto de la amplificación de una muestra y 30 μ L de buffer de carga.

Análisis de bandas usando VisionWorks®LS software.

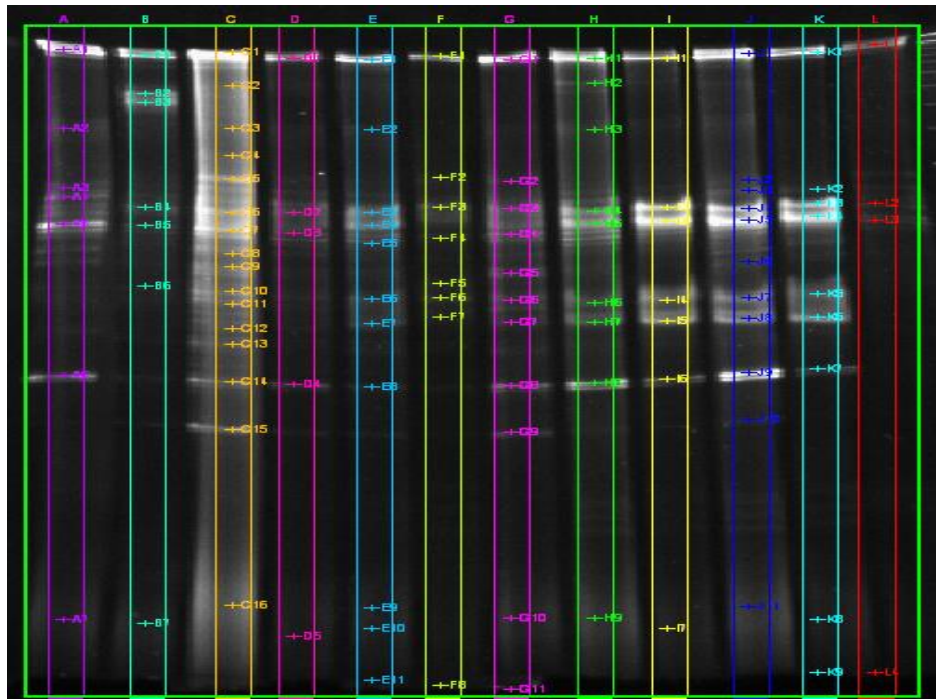


Figura 10.

Análisis de bandas de una Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización utilizando el VisionWorks®LS software. El recuadro verde representa el área del gel analizada, cada letra y color distinto representan a un recluta diferente y cada número a una unidad taxonómica bacteriana.

Análisis Estadístico

Con los 55 géneros bacterianos encontrados se generó una base de datos con 3080 observaciones y 6 variables (genotipo de recluta, genotipo *Symbiodinium*, sitio, fecha y presencia o ausencia de cada uno de los géneros bacterianos). Estos datos se utilizaron para realizar una prueba de normalidad Shapiro-Wilk utilizando Rstudio en donde encontramos que debíamos rechazar la hipótesis nula con valores menores de p a 0.1 solamente en el caso de la riqueza (S) de géneros bacterianos según genotipo de cada recluta ($p= 0.002662$) mientras tanto en el caso de la riqueza (S) de géneros bacterianos asociada a *Symbiodinium* ($p= 0.1246$) y al muestreo ($p= 0.7017$) no se rechazó la hipótesis nula por lo que la riqueza de la comunidad bacteriana asociada según la fecha de muestreo y el *Symbiodinium* no tienen una distribución normal. En el caso de la variable sitio, la prueba no se pudo realizar ya que el tamaño de muestra debe ser mayor a tres y en el estudio sólo se pudo caracterizar la comunidad bacteriana asociada a reclutas que se encontraban en dos sitios (Crawley, 2007).

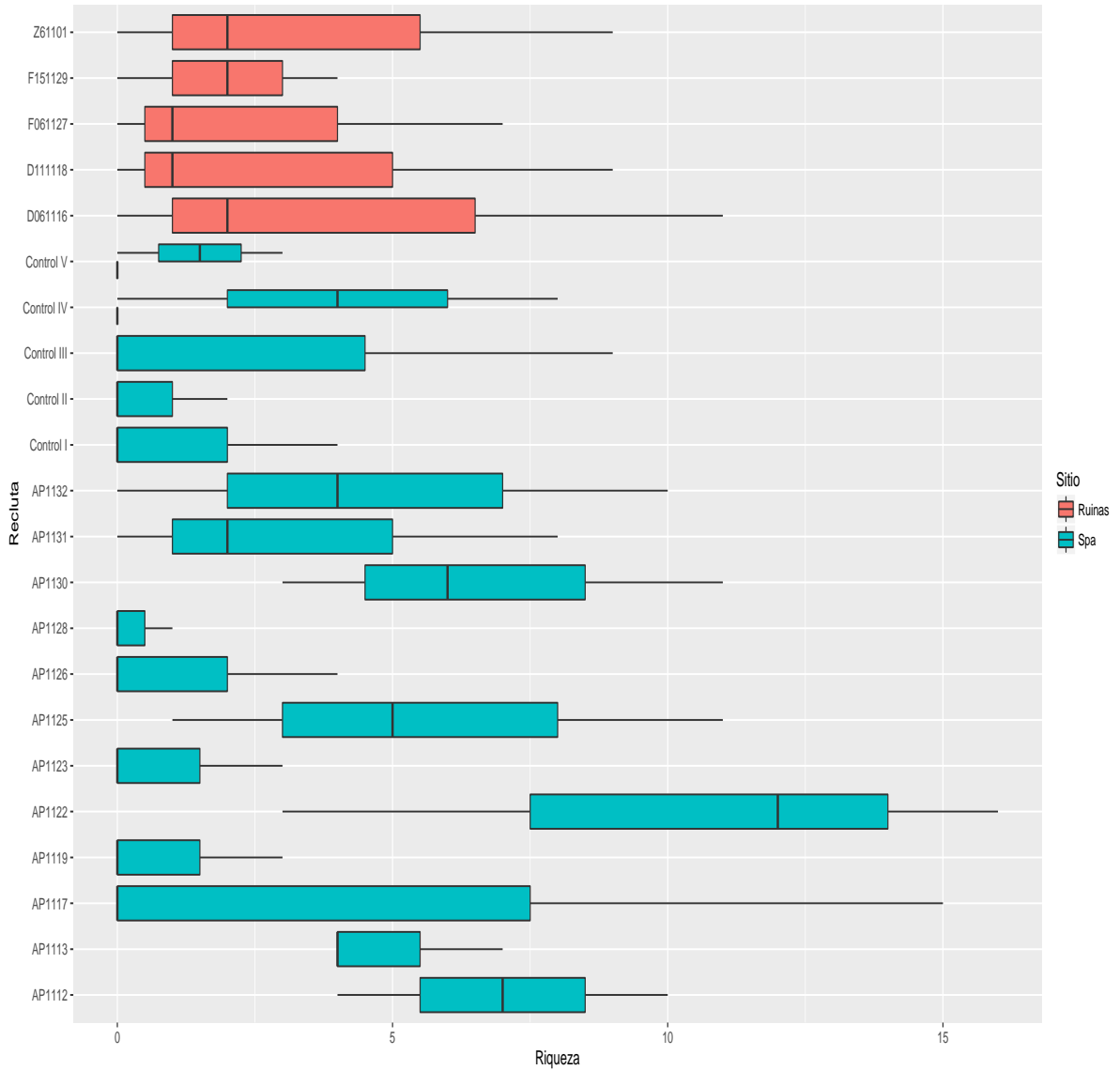


Figura 11.

Gráfica de caja de la Riqueza (S) de géneros bacterianos presentes en el biofilm de los diferentes reclutas sexuales de *A. palmata*. En el eje “y” se encuentra la identificación de cada recluta y en el eje “x” la riqueza (S) de géneros bacterianos encontrados. El color de la caja indica el sitio de donde se obtuvieron las muestras (azul Spa, rojo Ruinas). Los bigotes representan los valores máximos y mínimos

encontrados, y la caja abarca los datos presentes entre el primer y tercer cuartil donde se ubican el 50% de todos los datos. La línea transversal dentro de la caja representa la mediana.

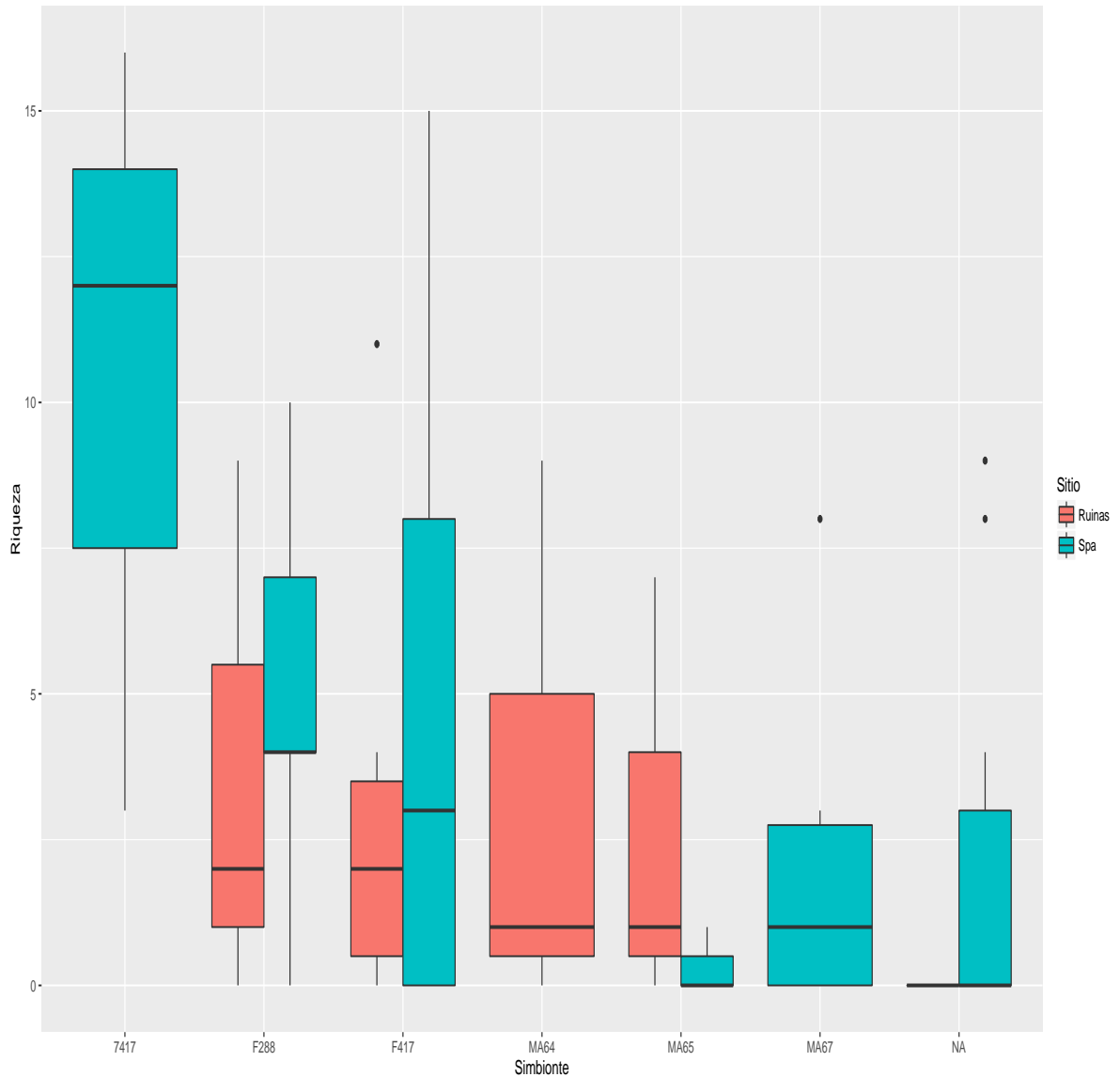


Figura 12.

Gráfica de caja de la Riqueza (S) de géneros bacterianos presentes en el biofilm de los diferentes reclutas sexuales de *A. palmata* de acuerdo al genotipo del

Symbiodinium .En el eje de "x" se encuentra la identificación de cada *Symbiodinium* y marcados como NA los controles. En el eje "y" le riqueza (S) de géneros bacterianos. El color de cada caja representa el sitio de donde se obtuvieron las muestras (azul Spa, rojo Ruinas). Los bigotes representan los valores máximos y mínimos encontrados, los puntos los datos atípicos. La caja abarca los datos presentes entre el primer y tercer cuartil donde se ubican el 50% los datos y la línea transversal dentro de la caja representa la mediana.

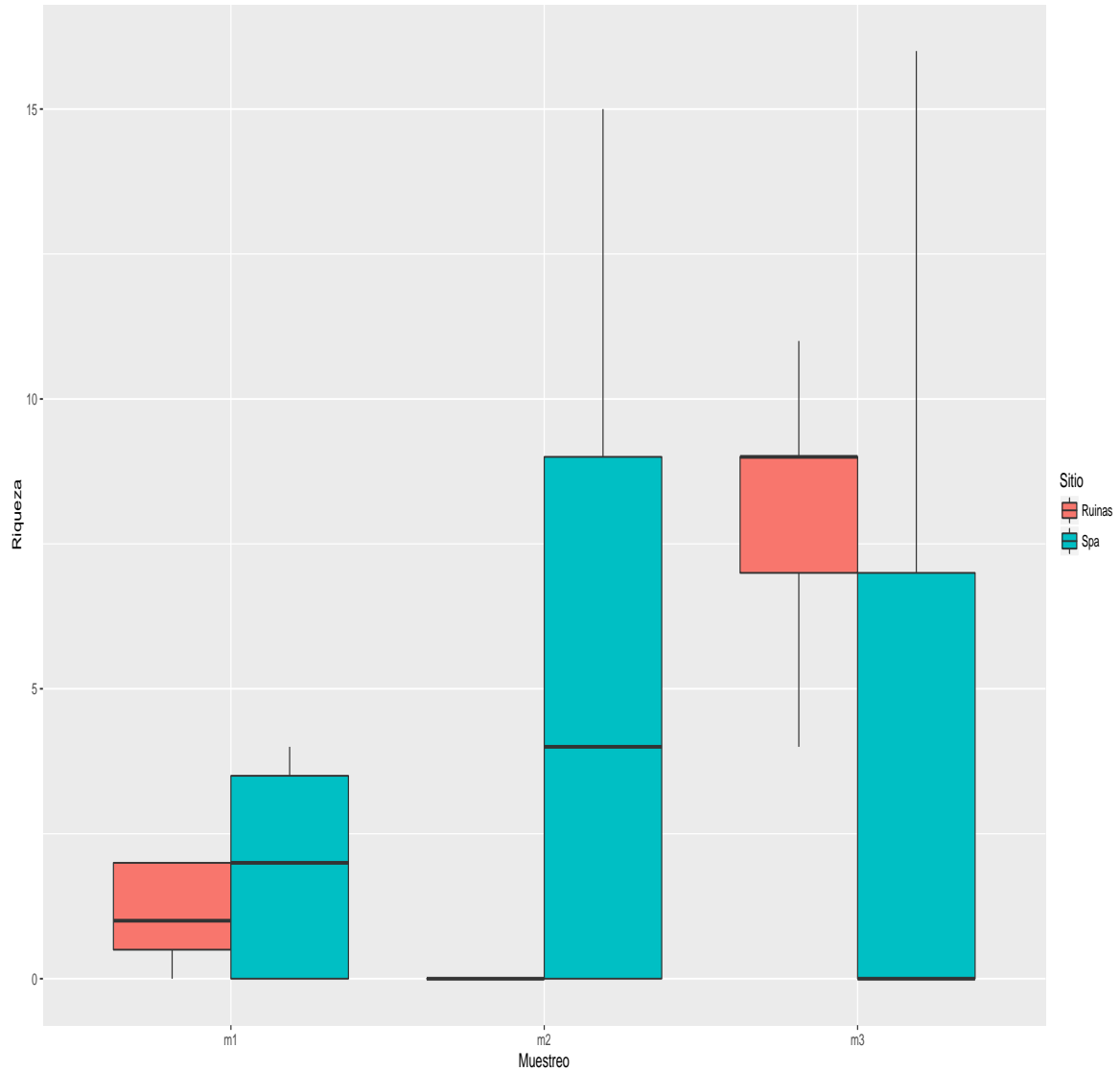


Figura 13.

Gráfica de caja de la Riqueza (S) de géneros bacterianos presentes en el biofilm de los diferentes reclutas sexuales de *A. palmata* de acuerdo a la fecha de muestreo. En el eje de “x” se encuentra el muestreo en el cual se obtuvieron las muestras (M1: 06 de febrero, M2: 9 de abril y M3: 26 de abril del 2015) y en el eje “y” la riqueza de géneros bacterianos encontrada. El color de de cada caja representa el sitio de donde se obtuvieron las muestras (azul Spa, rojo Ruinas).

Los bigotes representan los valores máximos y mínimos encontrados. La caja abarca los datos presentes entre el primer y tercer cuartil donde se ubican el 50% los datos y la línea transversal dentro de la caja representa la mediana.

Coeficiente de Jaccard

Finalmente se obtuvo el índice o coeficiente de Jaccard para medir el grado de similitud entre la riqueza (S) de la comunidad bacteriana presente en el biofilm de los diferentes reclutas, *Symbiodinium* y muestreos.

El índice de Jaccard es una prueba estadística que se usa para comparar la similitud y la diversidad de los conjuntos de una muestra. Para ello se utiliza el coeficiente de Jaccard que es una medida de similitud entre conjuntos de muestras finitas, y se define como el tamaño de la intersección dividido por el tamaño de la unión de los conjuntos de la muestra. Para poder expresar los resultados visualmente se usaron dendrogramas de asociación en los que se mostraba la distancia de Jaccard que es el inverso al coeficiente de Jaccard obtenido, por lo que en este análisis en el agrupamiento jerárquico se observó la disimilitud de la comunidad bacteriana presente en el biofilm de acuerdo al conjunto de diferencias de los objetos agrupados. Inicialmente a cada objeto se le asignó su propio clúster y luego el algoritmo une a los dos grupos más similares, continuando hasta que no haya un solo grupo (Crawley, 2007).

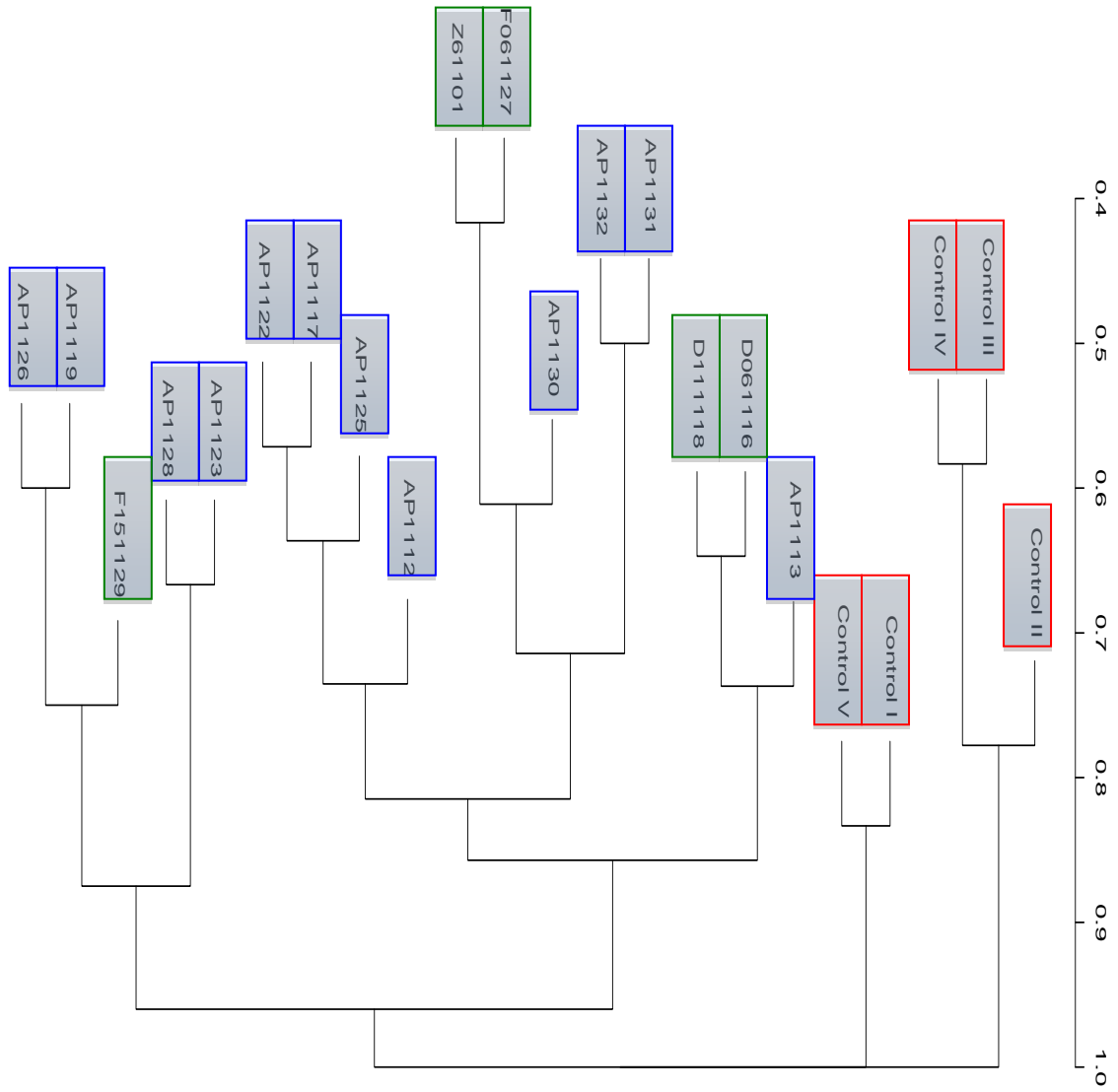


Figura 14.

Dendrograma de asociación utilizando la distancia de Jaccard para observar la disimilitud entre la riqueza de géneros bacterianos en los diferentes genotipos de reclutas sexuales de *A. palmata* muestreados durante el estudio. En la línea con valores del lado derecho se muestra el índice de Jaccard expresado de .04 a 1. Donde los valores cercanos a 0 muestran una menor disimilitud que los valores que se aproximen a 1, siendo que 0 representaría una comunidad bacteriana igual

entre los dos objetos. Las líneas representan como se agrupan los objetos según su disimilitud. Al final de cada línea del dendrograma se encuentra la identificación de cada recluta. Los colores azul y rojo representan el lugar de donde provenía el recluta (azul Spa, verde Ruinas) y el color rojo indica que esa era una muestra control.

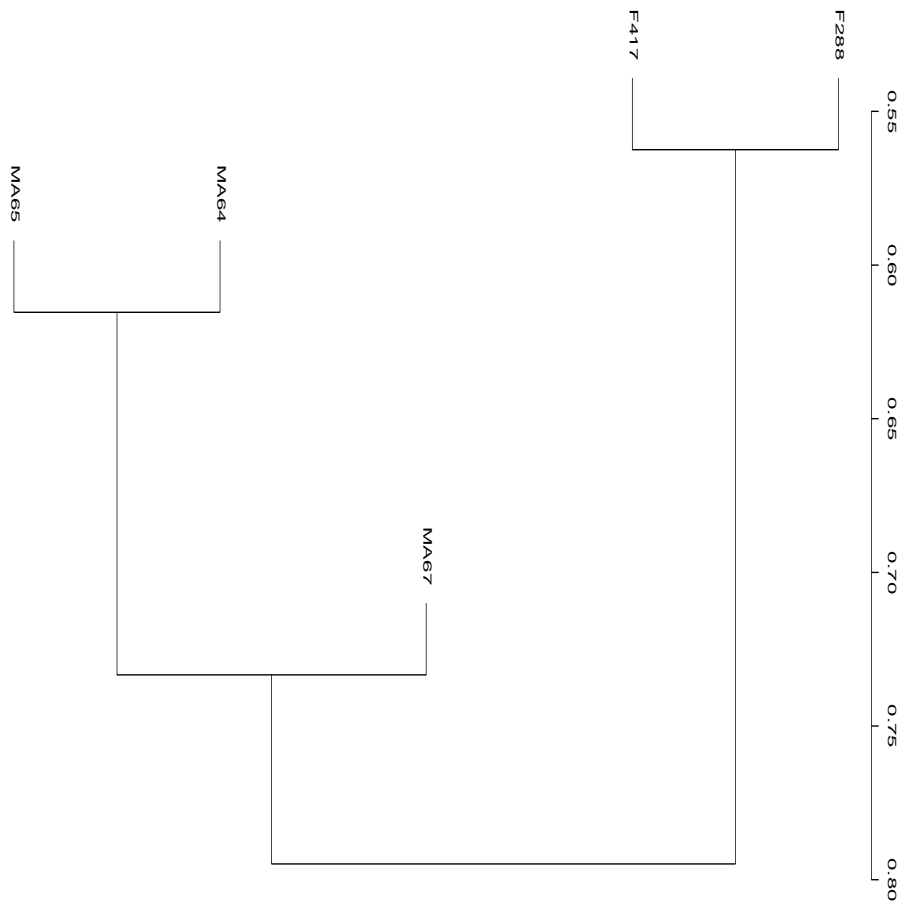


Figura 15.

Dendrograma de asociación utilizando la distancia de Jaccard para observar la disimilitud entre la riqueza de géneros bacterianos en los diferentes genotipos de *Symbiodinium* muestreados durante el estudio. En la línea de valores del lado

derecho se muestra el índice de Jaccard expresado de .055 a .80. Donde los valores cercanos a 0 muestran una menor disimilitud que los valores que se aproximen a 1, siendo que 0 representaría una comunidad bacteriana igual entre los dos objetos. Las líneas representan como se agrupan los objetos según su disimilitud y al final de cada línea del dendrograma se encuentra la identificación de cada *Symbiodinium*. Todos los clados de *Symbiodinium* muestreados estaban presentes en ambos sitios con excepción del MA64.

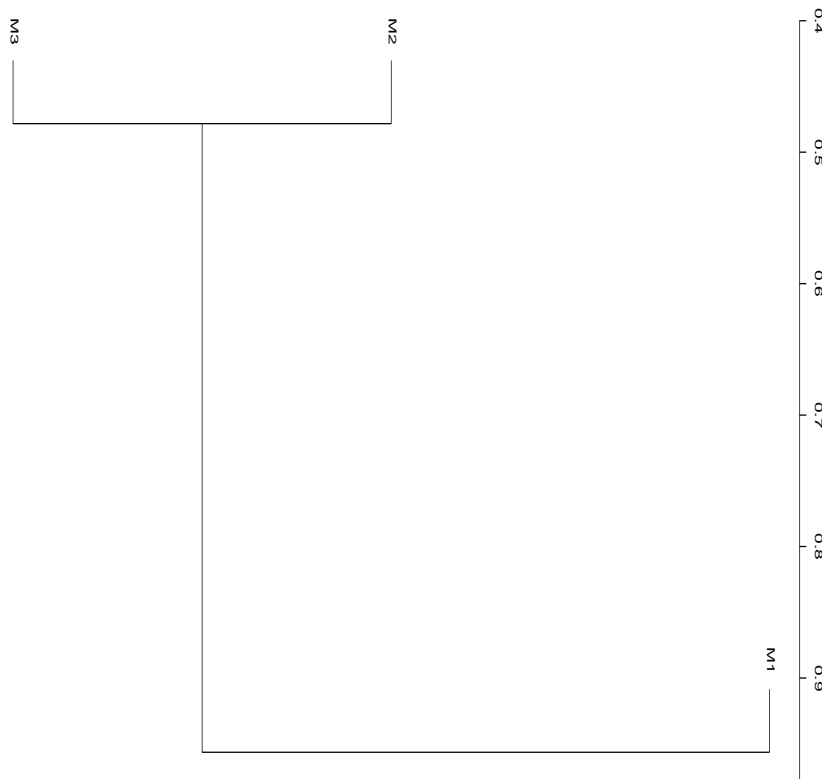


Figura 16.

Dendrograma de asociación utilizando la distancia de Jaccard para observar la disimilitud entre la riqueza de géneros bacterianos en los diferentes muestreos realizados durante el estudio. En la línea de valores del lado derecho se muestra

el índice de Jaccard expresado de .4 a .9. Donde los valores cercanos a 0 muestran una menor disimilitud que los valores que se aproximen a 1, siendo que 0 representaría una comunidad bacteriana igual entre los dos objetos. Las líneas representan como se agrupan los objetos según su disimilitud y al final de cada línea del dendrograma se encuentra la identificación de cada muestreo (M1: 06 de febrero, M2: 9 de abril y M3: 26 de abril del 2015).

Discusión

La comunidad bacteriana presente en las muestras con biofilm de los 76 reclutas sexuales de *A. palmata* producidos en el laboratorio mostró tener gran variabilidad según las diferentes condiciones de cada recluta. Las medidas de tendencia central de los datos mostraron un gran cambio entre las observaciones de cada variable. Además el rango de dispersión de los datos tuvo una gran variación entre los diferentes reclutas, *Symbiodinium* y muestreos.

A través de las pruebas de normalidad se pudo constatar que el modelo de estudio podría mejorar si se aumenta el número de *Symbiodinium* muestreados ó el número de muestreos. Sin embargo el modelo para los reclutas mostró ser bastante adecuado y se ajustó bien para representar los datos normales de una población, por lo que el problema de la poca representatividad de los datos asociados a *Symbiodinium* y a cada uno de los muestreos se atribuyó a la baja efectividad de las pruebas de laboratorio sobre todo la DGGE.

La comunidad bacteriana presente en el biofilm mostró una menor disimilitud entre la riqueza de géneros bacterianos de algunos reclutas como "AP1131" y "AP1132" ó "Z61101" y "F061127" ó "AP1122" y "AP1117". Aún así no se encontró evidencia de que exista asociación entre la disimilitud de la comunidad bacteriana del biofilm y la procedencia de cada recluta, ya que reclutas como el "F151129" el cual estuvo presente en el sitio Ruinas tenía una comunidad bacteriana más semejante a reclutas como "AP1119" y "AP1126" los cuales se encontraban en el sitio Spa y no en el mismo sitio como otros reclutas que tuvieron una mayor disimilitud como

"D061116" y "D111118". La riqueza de la comunidad bacteriana asociada a los 5 genotipos de *Symbiodinium* mostraron una menor disimilitud entre los genotipos "F288" y "F417" mientras que los "MA64", "MA65" y "MA67" mostraron ser más parecidos entre ellos siendo "MA64", "MA65" más parecidos entre ellos y "MA67" mas desigual.

La disimilitud de la comunidad bacteriana en los muestreos fue menor entre el muestreo 2 y 3 siendo que el muestreo 1 mostró una mayor disimilitud con los otros dos, lo cual se atribuyó a las fechas de cada muestreo.

Esto concuerda con los resultados obtenidos en estudios previos y reafirma que la comunidad bacteriana asociada al biofilm cambia de acuerdo a muchos factores como la ubicación geográfica, las condiciones ambientales, el genotipo de cada coral y el de sus simbioses (Koren et al., 2006; Weil et al., 2006; Rosenberg et al., 2007; Kooperman et al., 2007; Ainsworth et al., 2010; Mouchka et al., 2010; Cárdenas et al., 2011). Aunque también muestra que existe una posible relación entre la comunidad bacteriana presente en el coral, el coral mismo y los demás simbioses involucrados en el holobionte. Sin embargo debido a la poca representatividad del modelo serían necesarios más estudios sobre el tema.

Al evaluar la riqueza genética en la comunidad bacteriana asociada al biofilm de los reclutas se encontró que existe una gran diferencia entre la abundancia de géneros bacterianos entre cada recluta, cada *Symbiodinium* y cada muestreo. Esto podría deberse a una variación natural en la riqueza y abundancia de géneros bacterianos dentro de cada holobionte, ó a errores durante las pruebas de laboratorio, ya fuese por la perdida o degradación del material genético bacteriano presente en las muestras durante la extracción, la amplificación o la DGGE.

La riqueza de géneros bacterianos presente en cada uno de los reclutas mostró ser por lo general mayor que la riqueza de géneros bacterianos presentes en las muestras control. Además todas las muestras control mostraron una menor disimilitud entre ellas que con respecto a los reclutas aportando más evidencias sobre la existencia de una comunidad bacteriana específica propia del biofilm y con mayor diversidad que la presente en la columna de agua (Rosenberg et al., 2007).

A pesar de haber empezado a compilar información sobre las características de composición abundancia y riqueza de la comunidad bacteriana asociada a los reclutas producidos en el laboratorio no será posible determinar las diferencias entre esta comunidad bacteriana y las poblaciones silvestres de *A.palmata*. Para ello se necesita identificar a las especies bacterias presentes en la comunidad de ambas poblaciones a través de estudios genéticos más específicos determinar su composición, abundancia, riqueza y diversidad para finalmente observar las diferencias y determinar si pudiera existir algún riesgo de introducción de agentes bacterianos exóticos o patógenos.

Las diferencias en riqueza y disimilitud de las diferentes comunidades bacterianas podría sugerir que la comunidad bacteriana asociada al biofilm tiene una relación dinámica con los demás microorganismos asociados al holobionte, las condiciones ambientales locales y el coral huésped. Sugiriendo que el holobionte es un organismo en constante adaptación que cambia su composición y riqueza según las diferentes condiciones, seleccionándose ciertas especies sobre otras según el

contexto de las condiciones medioambientales prevalentes y las características intrínsecas de cada coral. Es posible que las alteraciones en la estructura y composición de la comunidad microbiana residente en el coral ayude a lograr una adaptación con mayor velocidad y versatilidad a las diferentes condiciones medio ambientales aportando ventajas adaptativas al coral huésped y ayudando a mantener su homeostasis en un ambiente en constante cambio (Rosenberg et al., 2007).

Conclusiones

Si las condiciones ambientales junto con el estado fisiológico del huésped, determinan la comunidad bacteriana asociada (Kooperman et al, 2007), y la protección contra patógenos, es una importante contribución por parte de las bacterias asociadas al huésped (Mills et al., 2013) otorgando inmunidad a través de barreras físicas como el mucus o impidiendo la adhesión de bacterias con potencial patógeno a la superficie coralina mediante la producción de sustancias bactericidas (Rosenberg et al., 2007). Podemos decir que, cualquier desviación en el equilibrio dinámico de estas comunidades podría incrementar la susceptibilidad a enfermedades por parte del huésped o la proliferación de bacterias oportunistas aumentando así la mortalidad de los corales de una comunidad debido a enfermedades. Por ello la modificación en la estructura o densidad relativa en las comunidades microbianas podrían tener un rol crítico en la adaptación de los corales a rápidos cambios ambientales o en la aparición o mecanismos de resistencia a enfermedades (Cárdenas et al., 2011).

La primera mención de alguna enfermedad en corales escleractinios ocurrió en 1970 (Richardson, 1998). Desde entonces se han reportado un sin número de nuevas enfermedades que afectan a por lo menos a 102 especies de corales (Green & Bruckner, 2000). Basados en la variedad de patógenos que afectan a otros animales los corales probablemente son susceptibles a una amplia gama de agentes bacterianos, fúngicos y virales, los cuales pueden afectar directamente al pólipo, a su *Symbiodinium*, a cualquiera de los demás simbiositos del holobionte o a una combinación de estos (Bourne et al., 2009). Por ello es necesario identificar

y conocer a la comunidad bacteriana asociada al biofilm tanto en corales sanos como enfermos de modo que logremos entender la influencia de dicha comunidad en los mecanismos de salud o enfermedad de los corales. Identificar de forma puntual a todas las especies bacterianas presentes en el holobionte nos permitirá entender su interacción y dinámica dentro de este, arrojando información sobre la relación entre el pólipo, todos sus simbioses y el papel que estos juegan en el estado de salud del coral huésped.

Si consideramos que el cambio climático es una realidad científica y que su impacto en los océanos incluye el aumento en la temperatura del agua, mayor exposición a luz ultravioleta, disminución de la capacidad productiva, alteración de las cadenas tróficas, acidificación del agua, disminución en la abundancia relativa de especies formadoras de hábitat, cambios en la distribución de especies y mayor incidencia de enfermedades, y que los océanos están bajo el impacto constante de actividades antropogénicas (Huegh-Guldberg & Bruno, 2010), el rápido cambio ecológico en los océanos representa un gran reto para el manejo de los arrecifes coralinos por lo que entender y reducir los factores de riesgo de las poblaciones de corales se volverá cada vez más importante para la gestión ambiental, ya que los cambios ambientales alrededor del mundo tenderán a incrementarse en el futuro cercano (Morse, 1995).

Entender la diversidad microbiana y la interacción de esta diversidad con un ambiente tan complejo y variable como el del holobionte, es esencial no sólo para entender el rol de las comunidades microbianas en la respuesta del huésped a los cambios ambientales y la influencia de estos en el estado de salud o enfermedad del holobionte sino también para lograr un manejo efectivo en las poblaciones de

corales y con ello asegurar su conservación en los océanos (Kooperman et al., 2007).

Referencias

1. Ainsworth T.D.; Thurber R.B. & Gates R. D. (2010). **The future of coral reefs: a microbial perspective.** Trends in Ecology and Evolution, 25: 233–240
2. Banaszak A.T.; Iglesias-Prieto R. & Trench R.K. (1993). **Scrippsiella velellae sp. nov. (Peridiniales) and Gloeodinium viscum sp. nov. (Phyodinales), dinoflagellate symbionts of two hydrozoans (Cnidaria).** Journal of Phycology, 29: 517 -528.
3. Boulon R.; Chiappone M.; Halley R.; Jaap W.; Keller B.; Kruczynski B.; Miller M. & Rogers C.(2005). Acropora Biological Review Team. **Atlantic Acropora Status Review Document.** Report to National Marine Fisheries Service, Southeast Regional Office.
4. Bourne D.G.; Garren M.; Work, T. M.; Rosenberg E.; Smith G. W. & Harvell D.C. (2009). **Microbial disease and the coral holobiont.** Trends in Microbiology, 17: 554–562.
5. Buckner A.W. (2002). **Proceedings of the Caribbean Acropora Workshop. Potential Application of the U.S. Endangered Species Act as a Conservation Strategy.** Miami Florida. U.S. Department of Commerce National Oceanic and Atmospheric Administration National Marine Fisheries.
6. Cárdenas A.; Rodríguez-R L.M.; Pizarro V.; Cadavid L.F. & Arévalo-Ferro C. (2011). **Shifts in bacterial communities of two caribbean reef-building coral species affected by white plague disease.** The ISME Journal, 6: 502–512.
7. Ceh J.; Raina J-B.; Soo R.M.; vanKeulen M. & Bourne D.G. (2012). **Coral-Bacterial Communities before and after a Coral Mass Spawning Event on Ningaloo Reef.** BIOLOGICAL SCIENCES Marine and Estuarine Ecology. Australian Institute for Marine Science, Murdoch University, Western Australian Marine Science Institute.
8. Centeno C. M.; Legendre P.; Yislem B.; Alcántara-Hernández R. J.; Lidström U. E.; Ashbey M. N. & Falcón L. I. (2012). **Microbialite genetic diversity and composition relate to environmental variables.** FEMS Microbiology Ecology, 82: 724–735.
9. Cook G. M.; Rothenberger J. P.; Sikaroodi M.; Gillevet P. M.; Peters E. C. & Jonas R. B. (2013). **A comparison of culture-dependent and culture-independent techniques used to characterize bacterial communities on healthy and white plague-diseased corals of the Montastraea annularis species complex.** Coral Reefs, 32: 375-388.

10. Crawley Michael J. (2007) **The R Book**. Imperial College London at Silwood Park, UK. John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England
11. Daszak P.; Cunningham A.A. & Hyatt, A.D. (2001). **Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife**. *Acta Tropica*, 78:103–116.
12. DCodeTM Universal Mutation Detection System.. <http://www.biorad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/M1709080C.pdf>. Catalog Numbers 170-9080 through 170-9104. 1996. Bio-Rad Laboratories.
13. Douglas A.E., (2003). **Coral bleaching—how and why?** *Marine Pollution Bulletin*, 46: 385–392.
14. Duarte S.; Cassio F. & Pascoal C. (2012). **Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) in Microbial Ecology - Insights from Freshwaters, Gel Electrophoresis - Principles and Basics**, Dr. Sameh Magdeldin (Ed.)
15. Erice Zuñiga E.V., Gonzalez Mandujano J.A. 2012. Clasificación e inventario de la vida en la Tierra. *Biología la ciencia de la vida*. 2. Ciudad de México. McGraw Hill. Capitulo 9. 290-339.
16. Fischer S. G. & Lerman L. S. (1983). **DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: Correspondence with melting theory**. (screening for mutation/gel electrophoresis/helix-coil transition/A phage/restriction fragment). *Proc. NatL Acad. Sci*, 80: 1579-1583.
17. Galloway SB, Work TM, Bochsler VS, Harley RA, Kramarsky-Winters E, McLaughlin SM, Meteyer CU, Morado JF, Nicholson JH, Parnell PG, Peters EC, Reynolds TL, Rotstein DS, Sileo L, and Woodley CM. 2007. **Coral Disease and Health Workshop: Coral Histopathology II**. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 56 and NOAA Technical Memorandum CRCP 4. National Oceanic and Atmospheric Administration, Silver Spring, MD. 84p.
18. Gardener M. (2014). **Community Ecology: Analytical Methods Using R and Excel**. Pelagic Publishing. Chapter 1.2.1 Diversity.
19. Gardner T. A.; Côté I.M.; Gill J.A.; Grant A.& Watkinson A.R. (2003). **Long-Term Region-Wide Declines in Caribbean Corals**. *Science*, 301: 958-960
20. Green E.P ; Bruckner A. W.(2000) **The significance of coral disease epizootiology for coral reef conservation**. *Biological Conservation*. 96:3:347–361
21. Guest J.R. Baria M.V. Gomez E.D. Heyward A. J. Edwards A. J. 2014. **Closing the circle: is it feasible to rehabilitate reefs with sexually propagated corals?** *Coral Reefs*. 33:45–55
22. Harvell C. D.; Jordán-Dahlgren E.; Merkel S.; Rosenberg E.; Raymundo L.; Smith G.; Weil E. & Willis B. (2007). **Coral disease, enviromental drivers and the balance between coral and microbial associates**. *Oceanography*, 20: 58-81
23. Harvell C. D.; Kim K.; Burkholder J. M.; Colwell R. R.; Epstein P.R.; Grimes, D. J.; Hofmann E. E.; Lipp E. K.; Osterhaus A.D.M.E.; Overstreet R. M.; Porter J. W.; Smith G. W. & Vasta G.R. (1999). **Emerging Marine**

- Diseases--Climate Links and Anthropogenic Factors.** Science, 285: 1505-1510.
24. Hayes R. L. & Goreau N. I. (1998). **The significance of emerging diseases in the tropical coral reef ecosystem.** Revista de Biología Tropical, 46: 173-185
 25. Hoegh-Guldberg O & Bruno J.F.(2010) **The Impact of Climate Change on the World's Marine Ecosystems.** Science, 328: 1523 -1528.
 26. Kooperman N.; Ben-Dov E.; Kramarsky-Winter E.; Barak Z. & Kushmaro A. (2007). **Coral mucus-associated bacterial communities from natural and aquarium environments.** FEMS Microbiology Letters, 276: 106–113.
 27. Koren O. & Rosenberg E. (2006). **Bacteria associated with mucus and tissues of the coral *Oculina patagonica* in summer and winter.** Applied and Environmental Microbiology, 72: 5254-5259.
 28. Kramer P. R. ; Arias-Gonzalez, E. & McField, M. (2000). **Status of Coral Reefs of the World: 2000.** C. R. Wilkinson. Global Coral Reef Monitoring Network and Australian Institute of Marine Science, Townsville, Australia. Chapter 16 Status of Coral Reefsof Northern Central America: México, Belize, Guatemala, Honduras, Nicaragua and el Salvador: 261-286.
 29. Lalli, C.M. & Parsons T.R. 1995. **Biological Oceanography: An Introduction.** Chapter 2: 220-233.
 30. Lee S. T. M.; Davy S. K.; Tang S-L & Knech P. S. (2016). **Mucus Sugar Content Shapes the Bacterial Community Structure in Thermally Stressed *Acropora muricata*.** Frontiers in Microbiology, 7:371-389.
 31. Littman R. A.; Bourne D. G.; & Willis B. L. (2010). **Responses of coral-associated bacterial communities to heat stress differ with Symbiodinium type on the same coral host.** Molecular Ecology, 19: 1978–1990.
 32. Lirman D. 2000. **Fragmentation in the branching coral *Acropora palmata* (Lamarck): growth, survivorship, and reproduction of colonies and fragments.** Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 251. 41–57
 33. López Garcia E. (2013). **Estudio de la Abundancia de Cuatro Clados de Dinoflagelados Simbiontes del Genero Symbiodinium Presentes en el Coral *Montastrea faveolata* del Arrecife de Puerto Morelos Q.Roo.** Tesis para Maestría en Ciencias. Mexico D.F.
 34. Lyautey E.; Jackson C.R.; Cayrou J.; Rols J.L. & Garabétian F. (2005). **Bacterial Community Succession in Natural River Biofilm Assemblages.** Microbial Ecology, 50: 589-601.
 35. Marhaver Kristen L.; Edwards Robert A., Rohwer Forest. (2008) **Viral communities associated with healthy and bleaching corals.** Environmental Microbiology, 10: 1462-2920.
 36. Mills Elad, Shechtman Karina, Loya Yossi, Rosenberg Eugene (2013) **Bacteria appear to play important roles in both causing and preventing the bleaching of the coral *Oculina patagónica*.** Marine Ecology Progress Series 489(48):155-152.
 37. Moberg F. & Folke C. (1999). **Ecological goods and services of coral reef ecosystems .** Ecological Economics, 29: 215–233.

38. Morse S. Stephen (1995) **Factors in the Emergence of Infectious Diseases**. Rockefeller University, New York, USA, 1 :1.
39. Mouchka M.E.; Hewson I. & Harvell C.D. (2010). **Coral-associated bacterial assemblages: Current Knowledge and the potential for Climate-Driven Impacts**. Integrative and comparative biology, 50: 662-674.
40. Muyzer G.; Brinkoff T.; Nübel U.; Santegoeds C.; Schäfer H. & Wawer C. (2004). **Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology**. Molecular Microbial Ecology Manual, 2nd ed: 743-770.
41. Muyzer G.; de Waal E.C. & Uitterlinden A.G. (1993). **Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA**. Applied and Environmental Microbiology, 59: 695-700.
42. National Marine Fisheries Service. (2015). **Recovery Plan for Elkhorn (*Acropora palmata*) and Staghorn (*A. Cervicornis*) Corals**. Prepared by the Acropora Recovery Team for the National Marine Fisheries Service, Silver Spring, Meriland.
43. **Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001 Protección Ambiental- Especies Nativas de México de Flora y Fauna Silvestres- Categoría de Riesgo y Especificaciones para su Inclusión, Exclusión o Cambio- Lista de Especies en Riesgo**. Diario Oficial, Segunda Sección Marzo 2002.
44. Olivares I. & Severeyn H. (2000). **Registro preliminar de corales escleractinios hermatípicos del Cenozoico y su ocurrencia actual, en áreas costeras del estado Falcón, Venezuela**. CIENCIA, 8: 145-154
45. Patten N.L., Harrison P.L., Mitchell J.G. (2008). **Prevalence of virus-like particles within a staghorn scleractinian coral (*Acropora muricata*) from the Great Barrier Reef**. Coral Reefs. 27:569-580.
46. Preechta William F., Gintert Brooke E., Robbart L. M., Fura Ryan & van Woesik Robert (2016). **Unprecedented Disease-Related Coral Mortality in Southeastern Florida**. Nature Scientific Reports. 6:31374.
47. Rademaker J.L.W. & de Bruijn, F.J. (2004). **Computer-assisted analysis of molecular fingerprint profiles and database construction**. Molecular Microbial Ecology Manual, 2nd ed: 1397-1446.
48. Rajasekar T., Balaji S., Kumaran S., Deivasigamani B. & Pugzhavendhan. S. R.(2012). **Isolation and characterization of Merine fungal metabolites against clinical pathogens**. Asian Pacific Journal of Tropical Disease. S387-S392.
49. Reshef L.; Koren O.; Loya Y.; Zilber-Rosenberg I. & Rosenberg E. (2006). **The Coral Probiotic Hypothesis..** Environmental Microbiology . Departments of Molecular Microbiology and Biotechnology, and 2Zoology, Tel Aviv University, Ramat Aviv, Israel 69978. 3Open University of Israel, Raanana, Israel 43107.
50. Richardson Laurie L. 1998. **Coral diseases: what is really known?** Trends in Microbiology. 13: 438–443
51. Riemann L.; Steward G. F.; Fandino L. B.; Campbell L.; Landry M. R. & Azam F. (1999). **Bacterial community composition during two consecutive NE Monsoon periods in the Arabian Sea studied by**

- denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of rRNA genes.** Deep-Sea Research, 2: 1791-1811.
52. Roder C.; Chatchanit A.; Daniels C.; Weil E. & Voolstra C.R. (2014). **Bacterial profiling of White Plague Disease across corals and oceans indicates a conserved and distinct disease microbiome.** Molecular Ecology, 23: 965–974.
 53. Rodríguez-Martínez R. E.; Banaszak A. T. & Jordán-Dahlgreen E. (2001). **Necrotic patches affect Acropora palmata (Scleractinia: Acroporidae) in the Mexican Caribbean.** Diseases of Aquatic Organisms, 47: 229–234.
 54. Rohwer F.; Breitbart M.; Jara J.; Azam F. & Knowlton N. (2001). **Diversity of bacteria associated with the Caribbean coral Montastraea franksi.** Coral Reefs, 20. Pages 85-91.
 55. Rosenberg, E.; Koren, O.; Reshef, L.; Efrony R and Zilber-Rosenberg I. (2007). **The role of microorganisms in coral health, disease and evolution.** Nature Reviews Microbiology, 5: 355-62.
 56. Röthig T.; Ochsenkühn M. A.; Roik A.; van der Merwe R. & Voolstra C.R.(2016). **Long-term salinity tolerance is accompanied by major restructuring of the coral bacterial microbiome.** Molecular Ecology, 25: 1308–1323
 57. Sakai K. (2008). **Denaturing Gradient Gel Electrophoresis(DGGE) -its applications, limitations, and perspectives in microbial ecological studies.** Laboratory of Soil Biology & Biochemistry, Division of Soil Science & Plant Production, Department of Plant Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Japan.
 58. Schwarz J. A.; Brokstein P.B.; Voolstra C.; Terry A.Y.; Miller D.J.; Szmant A.M.; Coffroth M.A. & Medin M.(2008). **Coral life history and symbiosis: Functional genomic resources for two reef building Caribbean corals, Acropora palmata and Montastraea faveolata.** BMC Genomics, 9:97.
 59. Shnit-Orland, M. and Kushmaro, A. (2009). **Coral mucus - associated bacteria: a possible first line of defense.** FEMS Microbiology Ecology, 67: 371–380.
 60. Sunagawa S.; DeSantis T. Z.; Piceno Y. M.; Brodie E. L.; DeSalvo M. K.; Voolstra C.R.; Weil E.; Andersen G. L. & Medina M. (2009). **Bacterial diversity and White Plague Disease-associated community changes in the Caribbean coral Montastraea faveolata. .** The ISME Journal, 3: 512–521.
 61. Vollmer S. V. and Palumbi S.R. (2002). **Hybridization and the Evolution of Reef Coral Diversity.** Science 14. Vol. 296, Issue 5575, pp. 2023-2025.
 62. Weil E.; G. Smith & D.L.Gil-Agudelo. (2006). **Status and progress in coral reef disease research.** Disease of aquatic organisms, 69:1-7.
 63. Willis B.L.; Page C.A. & Dinsdale E.A. (2004). **Coral Health and Disease.** Chapter 3, **Coral Disease on the Great Barrier Reef:** 69-104.
 64. Yamashita H.; Suzuki G.; Hayashibara T.; Koike. K. 2012. **Acropora recruits harbor “rare” Symbiodinium in the environmental pool.** Coral Reefs. 32 : 355–366.