



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**ANÁLISIS DE LA MICROBIOTA ASOCIADA A LA
ENFERMEDAD DE PÉRDIDA DE TEJIDO DE CORALES
PÉTREOS EN *Pseudodiploria strigosa* EN EL CARIBE
MEXICANO.**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biotecnología)

P r e s e n t a

Jesús Eduardo Aguayo Leyva

La Paz, Baja California Sur, enero de 2023.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10:00 horas del día 2 del Mes de Diciembre del 2022, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"ANÁLISIS DE LA MICROBIOTA ASOCIADA A LA ENFERMEDAD DE PÉRDIDA DE TEJIDO DE CORALES PÉTREOS EN *Pseudodiploria strigosa* EN EL CARIBE MEXICANO"

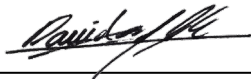
Presentada por el alumno:

Jesús Eduardo Aguayo Leyva

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **BIOTECNOLOGÍA**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

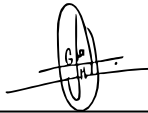
LA COMISIÓN REVISORA



Dr. David Arturo Paz García
Co-Director de Tesis



Dr. Eduardo Francisco Balart Páez
Co-Director de Tesis



Dr. José Quinatzin García Maldonado
Co-Tutor de Tesis

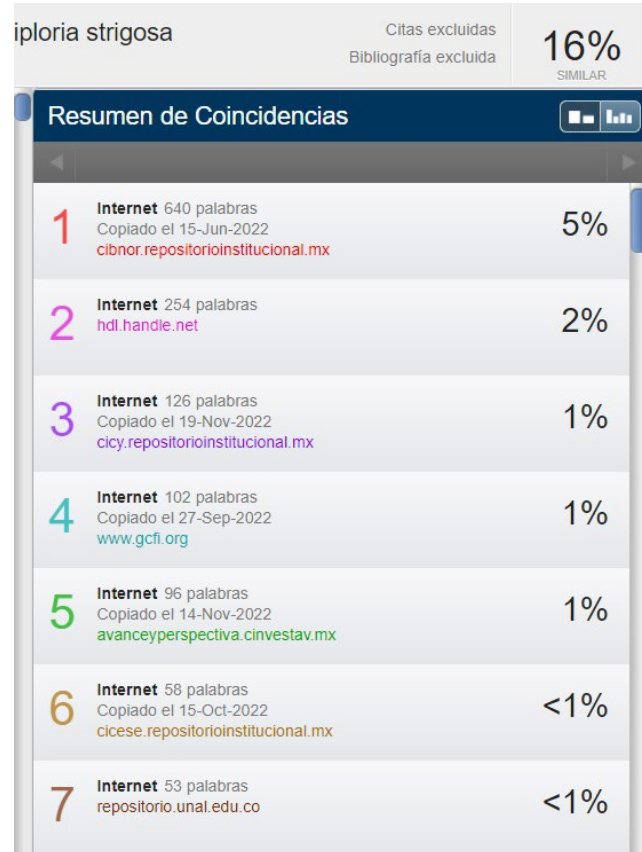


Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos.

La Paz, Baja California Sur, a 02 de diciembre de 2022

Los miembros del comité de tesis del estudiante Jesús Eduardo Aguayo Leyva del Programa de Maestría en Ciencias en el Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales con orientación en Biotecnología, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el Vo.Bo. dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio:
iThenticate
- Filtros utilizados:
Citas y bibliografías excluidas
- Porcentajes de similitud: 16%
Se muestra captura de pantalla.



iploria strigosa Citas excluidas Bibliografía excluida 16% SIMILAR

Resumen de Coincidencias

Rank	Source	Words	Percentage
1	Internet Copiado el 15-Jun-2022 cibnor.repositorioinstitucional.mx	640 palabras	5%
2	Internet hdl.handle.net	254 palabras	2%
3	Internet Copiado el 19-Nov-2022 cicy.repositorioinstitucional.mx	126 palabras	1%
4	Internet Copiado el 27-Sep-2022 www.gcfi.org	102 palabras	1%
5	Internet Copiado el 14-Nov-2022 avanceyperspectiva.cinvestav.mx	96 palabras	1%
6	Internet Copiado el 15-Oct-2022 cicese.repositorioinstitucional.mx	58 palabras	<1%
7	Internet repositorio.unal.edu.co	53 palabras	<1%

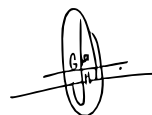
Firmas del comité



Dr. David Arturo Paz García
Co-Director de Tesis



Dr. Eduardo Francisco Balart Páez
Co-Director de Tesis



Dr. José Quinatzin García Maldonado
Co-Tutor de Tesis

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dr. David Arturo Paz García
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Director de Tesis

Dr. Eduardo Francisco Balart Páez
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Director de Tesis

Dr. José Quinatzin García Maldonado
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad
Mérida
Co-Tutor de Tesis

Comité Revisor de Tesis

Dr. David Arturo Paz García
Dr. Eduardo Francisco Balart Páez
Dr. José Quinatzin García Maldonado

Jurado de Examen

Dr. David Arturo Paz García
Dr. Eduardo Francisco Balart Páez
Dr. José Quinatzin García Maldonado

Suplente

Dr. Fausto Valenzuela Quiñonez

Resumen


Los arrecifes coralinos han sido afectados como consecuencia del cambio climático, presiones antropogénicas y por la aparición de nuevas enfermedades. La pérdida de tejido en corales pétreos (SCTLD), es una enfermedad reportada por primera vez en 2018 para las costas de Quintana Roo, México, que se caracteriza por la aparición de lesiones focales y multifocales producto del desprendimiento de tejido, y que, generalmente causa altas mortalidades. *Pseudodiploria strigosa* es una especie constructora de arrecifes abundante en la región del Caribe mexicano y está catalogada como una especie de coral medianamente susceptible a esta enfermedad. El objetivo del presente estudio fue analizar la estructura y composición de las comunidades microbianas asociadas a *P. strigosa* en colonias aparentemente sanas (S) y en colonias afectadas por la SCTLD de regiones cercanas (ECL) y lejanas a la lesión (ELL), en muestras recolectadas en los años 2018 y 2019 en dos localidades del Caribe Mexicano a partir de secuencias del gen 16S ARNr. El análisis de varianza permutacional (PERMANOVA) mostró diferencias en la estructura de la comunidad microbiana con respecto al año y condición de salud de las colonias. Los análisis de composición indicaron que Flavobacteriales fue el Orden con mayores abundancias relativas en muestras de 2018 y Vibrionales para las de 2019. A niveles taxonómicos más bajos, los géneros *Roseimarinus*, *Halodesulfovibrio*, *Tepidibacter*, *Halarcobacter*, *Fusibacter*, *Valitalea*, *Malaciobacter* y *Salinivibrio* tuvieron abundancias diferenciales para las muestras de condición ECL de 2018; mientras que, en 2019, además de los taxa ya mencionados, también se detectaron los géneros *Vibrio*, *Aquimarina*, *Acinetobacter* y el clado JTB215 como diferencialmente abundantes. Los resultados obtenidos en este estudio muestran diferencias en la estructura de las comunidades microbianas de las muestras de condición ECL con respecto a las condiciones ELL y S para ambos años.

Palabras clave: SCTLD, microbioma, 16S ARNr, *Pseudodiploria strigosa*, Caribe Mexicano

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3048-6630>

Vo. Bo. Co-Directores de Tesis


Dr. David A. Paz García


Dr. Eduardo F. Balart Páez

Summary


Coral reefs have been affected as a consequence of climate change, anthropogenic pressures, and the appearance of new diseases. Tissue loss in stony corals (SCTLD) is a disease reported for the first time in 2018 for the coasts of Quintana Roo, Mexico, which is characterized by the appearance of focal and multifocal lesions as a result of tissue detachment, and which, generally causes high mortality. *Pseudodiploria strigosa* is an abundant reef-building species in the Mexican Caribbean region and is listed as a moderately susceptible coral species to this disease. The objective of this study was to analyze the structure and composition of the microbial communities associated with *P. strigosa* in apparently healthy colonies (S) and colonies affected by SCTLD from regions near (ECL) and far from the lesion (ELL), in samples collected in the years 2018 and 2019 in two locations in the Mexican Caribbean from 16S rRNA gene sequences. The permutational analysis of variance (PERMANOVA) showed differences in the structure of the microbial community according to the year and health condition of the colonies. Compositional analyzes indicated that Flavobacteriales was the order with the highest relative abundances in 2018 samples and Vibrionales for 2019 samples. At lower taxonomic levels, the genera *Roseimarinus*, *Halodesulfovibrio*, *Tepidibacter*, *Halarcobacter*, *Fusibacter*, *Valitalea*, *Malaciobacter*, and *Salinivibrio* had differential abundances for the samples of ECL in 2018; while, in 2019, in addition to the already mentioned taxa, the genera *Vibrio*, *Aquimarina*, *Acinetobacter*, and the JTB215 clade were also detected as differentially abundant. The results obtained in this study show differences in the structure and composition of the microbial communities of the ECL samples condition samples versus the ELL and S samples for both years.

Keywords: SCTLD, microbiome, ARNr 16S, *Pseudodiploria strigosa*, Mexican Caribbean.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3048-6630>

Vo. Bo. Co-Directores de Tesis


Dr. David A. Paz García


Dr. Eduardo F. Balart Páez

Dedicatoria

A mi Madre

Agradecimientos

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por la beca No. 772434 otorgada para desarrollar mis estudios de posgrado. Así mismo, por el apoyo al Proyecto de Ciencia de Frontera 2019 (ID. 425888): “Respondiendo a una nueva crisis que enfrentan los arrecifes de coral en el Caribe mexicano: acciones para mitigar una enfermedad emergente de corales y la degradación de arrecifes”, que soporta el trabajo de investigación de mi tesis.

Al **Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.** y a la **Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos** por la oportunidad de matricularme en el programa de Maestría en Ciencias en el Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales; así como por la beca para la manutención ofertada por la institución en los últimos meses.

A mis asesores, **David A. Paz García** por su apoyo, conocimiento, consejos y fe depositada en mí para el desarrollo de este proyecto; a **Eduardo F. Balart Páez** por sus acertadas aportaciones y por el invaluable apoyo para concluir este trabajo; a **José Q. García Maldonado** por sus valiosos comentarios, asesorías y aportes a lo largo del desarrollo de este proyecto. A ustedes, quienes a pesar de la tempestad y revuelto que fue y ha sido la pandemia, creyeron en mí y en mis habilidades para sacar adelante todo este trabajo.

A **Lorenzo Álvarez-Filip, Nuria Estrada y Esmeralda Pérez** del Laboratorio para la Diversidad y Conservación de Arrecifes del ICML-UNAM Puerto Morelos, por todo el apoyo con la logística del muestreo y sus valiosas aportaciones y comentarios.

A **Santiago Cadena, Zita Arriaga y Alonso de la Garza** por su paciencia y su apoyo al ser mis mentores en el abrumante mundo de la bioinformática.

Al Laboratorio de Investigación Integrativa para la Biodiversidad Genómica Marina por su compañía y acertados consejos en mi trabajo; también a mis compañeros **Erick Bolaños, Jorge Escobar** y **Edwin Gutiérrez** por su apoyo con el procesamiento de las muestras en el laboratorio.

Al **CINVESTAV Unidad Mérida** por la infraestructura para la secuenciación y el análisis bioinformático de este proyecto.

A **mi familia**: mi mamá, mi Mamanza, Papángel, Ángel e Iker por ser el pilar firme y fundamental, darme un espacio seguro durante este periodo de tempestad y ser un ejemplo de resiliencia, gracias totales. A ti, Santi, por soportar y apoyar a un tesista en tiempos pandémicos.

A Elvia y Karina, mis anclas bien afianzadas en la cordura, mis oídos y mis hombros, muchas gracias. Y, por último, pero no menos importante, a Simona y Fidel, por su compañía silenciosa pero siempre fiel.

Contenido

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Contenido.....	v
Lista de figuras	vii
Lista de tablas	ix
Abreviaturas	x
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Arrecifes coralinos, importancia y condición actual	1
1.2 Comunidades microbianas y enfermedades coralinas.....	2
1.3 La enfermedad de pérdida de tejido de corales pétreos	4
1.4 <i>Pseudodiploria strigosa</i>	6
2. ANTECEDENTES.....	7
2.1 Composición de la microbiota asociada a los corales y el desarrollo de enfermedades.....	7
2.2 Naturaleza de los agentes etiológicos asociados a la enfermedad de pérdida de tejido de corales pétreos	9
2.3 Caracterización de las comunidades microbianas asociadas a la enfermedad de pérdida de tejido de corales pétreos.....	11
3. JUSTIFICACIÓN.....	14
4. HIPÓTESIS	15
5. OBJETIVOS	16
5.1 Objetivo general	16
5.2 Objetivos particulares.....	16
6. MATERIALES Y MÉTODOS	17
6.1 Recolecta de muestras y preservación.....	17
6.2 Extracción de ADN genómico	19
6.3 Construcción de bibliotecas para la secuenciación de amplicones	19
6.3.1 Amplificación del gen 16S ARNr.....	19
6.3.2 Purificación	19
6.3.3 Adición de índices de secuenciación	20
6.3.4 Normalización y secuenciación.....	20
6.4 Análisis bioinformático	21
6.4.1 Obtención de secuencias de estudio previo.....	21
6.4.2 Procesamiento bioinformático de las secuencias obtenidas en este trabajo.....	21
6.4.3 Análisis de alfa diversidad.....	22
6.4.4 Análisis de beta diversidad	23
6.4.5 Composición taxonómica de las comunidades microbianas.....	23
6.4.6 Análisis de abundancia diferencial.....	23
6.4.7 Análisis de predicción funcional	24
7. RESULTADOS.....	25
7.1 Métricas de diversidad	25

7.2 Composición taxonómica y estructura de la microbiota de colonias enfermas cerca (ECL) y lejos de la lesión (ELL).....	28
7.3 Composición taxonómica de las comunidades microbianas.....	31
7.4 Análisis de abundancia diferencial	37
7.5 Análisis de predicción funcional	40
8. DISCUSIÓN	43
8.1 Diversidad de la microbiota.....	43
8.2 Estructura y composición de la microbiota	45
8.3 Composición taxonómica de las comunidades microbianas.....	46
8.4 Análisis de abundancia diferencial	47
8.5 Análisis de predicción funcional	48
9. CONCLUSIONES	50
10. LITERATURA CITADA	51
11. ANEXOS	58
Anexo A. Relación de muestras de estudio previo y código de acceso de la base de datos SRA de NCBI	58
Anexo B. Lecturas obtenidas y finales después del procesamiento bioinformático	59
Anexo C. Curva de rarefacción	60
Anexo D. Estructura del microbioma por año y estado de salud.....	61
Anexo E. Métricas de alfa diversidad de las comunidades microbianas.....	63
Anexo F. Análisis de muestras excluidas	64
Anexo G. Análisis de abundancia diferencial.....	67

Lista de figuras

Figura 1. Relaciones simbióticas en el modelo del holobionte coralino (Modificado de Peixoto <i>et al.</i> , 2017).....	2
Figura 2. Comparación de la morfología de las lesiones de la enfermedad de pérdida de tejido en algunas de las especies susceptibles (Tomada de Andrew Baker©).....	5
Figura 3. Esqueleto de una colonia de <i>Pseudodiploria strigosa</i> (Fotografía de E.A. Lazo-Wasem©).....	6
Figura 4. Colonia de <i>Montastrea faveolata</i> con signos de la enfermedad de la plaga blanca (Tomada de M. Nugues 2004 ©).....	8
Figura 5. Colonia de <i>Porites lobata</i> con signos de la enfermedad de parche gris (Modificada de Sweet <i>et al.</i> , 2019b).	8
Figura 6. Ubicación de los sitios de muestreo dentro del área de estudio. Los círculos rojos indican los sitios de recolecta. Datum: WGS-84 / Coordenadas: UTM Zona 17Q. Proyección cilíndrica. El mapa se construyó por elaboración propia.....	17
Figura 7. Clasificación de los tipos de muestra por estado de salud. a) Colonia enferma: 1) cerca de la lesión (ECL), 2) lejos de la lesión (ELL); b) Colonia aparentemente sana (S).....	18
Figura 8. ASVs observados por año según la condición de salud las colonias de coral: [Color rojo] Enferma cerca de la lesión (ECL), [Color verde] Enferma lejos de la lesión (ELL), [Color azul] Aparentemente sana (S). Nivel de significancia: *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$	25
Figura 9. Índice de diversidad de Shannon (H') por año según la condición de salud las colonias de coral: [Color rojo] Enferma cerca de la lesión (ECL), [Color verde] Enferma lejos de la lesión (ELL), [Color azul] Aparentemente sana (S). Nivel de significancia: *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$	26
Figura 10. Ordenación mediante un escalamiento multidimensional no-métrico (NMDS) de la estructura de las comunidades microbianas de las muestras de las tres condiciones: [Color rojo] Enferma cerca de la lesión (ECL), [Color verde] Enferma lejos de la lesión (ELL), [Color azul] Aparentemente sana (S), respecto a los años 2018 (triángulo) y 2019 (círculo).....	27
Figura 11. Abundancia relativa de las clases con abundancia mayor a 1% de las colonias con muestras de condición ECL (*) y ELL (').	28
Figura 12. Abundancia relativa de los órdenes con abundancia mayor a 2% de las colonias con muestras de condición ECL (*) y ELL (').	29
Figura 13. Ordenación mediante un escalamiento multidimensional no-métrico (NMDS) de la estructura de las comunidades microbianas de las muestras de colonias enfermas cercanas (ECL) y lejano a la lesión (ELL) para 2018 y 2019. Las líneas indican las muestras que provienen de una misma colonia.	30
Figura 14. Abundancia relativa de las clases con abundancia mayor al 1% de las muestras de tejido de muestras cercanas a la lesión (ECL).	31
Figura 15. Abundancia relativa de las clases con abundancia mayor al 1% de las muestras de tejido de muestras lejanas a la lesión (ELL).....	32
Figura 16. Abundancia relativa de las clases con abundancia mayor al 1% de las muestras de tejido de muestras aparentemente sanas (S).	33
Figura 17. Abundancia relativa de los órdenes con abundancia mayor al 2% de las muestras de tejido de muestras cercanas a la lesión (ECL).	34

Figura 18. Abundancia relativa de los órdenes con abundancia mayor al 2% de las muestras de tejido de muestras lejanas a la lesión (ELL).....	35
Figura 19. Abundancia relativa de los órdenes con abundancia mayor al 2% de las muestras de tejido de colonias aparentemente sanas (S).....	36
Figura 20. Análisis discriminante lineal (LDA) con efecto de tamaño (LEfSe) de los ASVs a nivel Orden diferencialmente abundantes y su abundancia relativa promedio para las condiciones de salud de las muestras del año 2018. Nivel de significancia: *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$	37
Figura 21. Análisis discriminante lineal (LDA) con efecto de tamaño (LEfSe) de los primeros 20 ASVs a nivel Orden diferencialmente abundantes y su abundancia relativa promedio para las condiciones de salud de las muestras del año 2019. Nivel de significancia: *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$	38
Figura 22. Análisis discriminante lineal (LDA) con efecto de tamaño (LEfSe) de los ASVs a nivel Género diferencialmente abundantes y su abundancia relativa promedio para las condiciones de salud de las muestras del año 2018. Nivel de significancia: *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$	39
Figura 23. Análisis discriminante lineal (LDA) con efecto de tamaño (LEfSe) de los primeros 25 ASVs a nivel Género diferencialmente abundantes y su abundancia relativa promedio para las condiciones de salud de las muestras del año 2019. Nivel de significancia: *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$	40
Figura 24. Porcentaje de ASVs anotados con los perfiles metabólicos y funciones relevantes dentro de los ciclos de C, N, y S para los grupos microbianos detectados en 2018 respecto a las tres condiciones de salud: enfermas cerca de la lesión (ECL), enfermas lejos de la lesión (ELL) y aparentemente sanas (S).	41
Figura 25. Porcentaje de ASVs anotados con los perfiles metabólicos y funciones relevantes dentro de los ciclos de C, N, y S para los grupos microbianos detectados en 2019 respecto a las tres condiciones de salud: enfermas cerca de la lesión (ECL), enfermas lejos de la lesión (ELL) y aparentemente sanas (S).	42

Lista de tablas

Tabla 1. Clasificación de las muestras de tejido colectadas por sitio y condición.....	18
---	----

Abreviaturas

ARNr Ácido ribonucleico ribosomal.

ASV Variante de secuencia de amplicón (*Amplicon Sequence Variant*)

NMDS Escalamiento no métrico multidimensional (*Non-Parametric Multidimensional Scaling*)

LEfSe Análisis discriminante lineal con efecto de tamaño (*Linear Discriminant Analysis Effect Size*)

LDA Análisis discriminante lineal (*Linear Discriminant Analysis*)

ECL Muestra de tejido cercano a la lesión proveniente de una colonia enferma.

ELL Muestra de tejido lejano a la lesión proveniente de una colonia enferma.

S Muestra de tejido proveniente de una colonia aparentemente sana.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Arrecifes coralinos, importancia y condición actual

Los arrecifes coralinos son ecosistemas marinos constituidos estructuralmente por la acumulación y aglomeración de los esqueletos calcáreos de corales pétreos (Cnidaria: Scleractinia) (Spalding *et al.*, 2001; Brusca *et al.*, 2016). Estos ecosistemas son reconocidos como los centros de mayor biodiversidad en el ambiente marino. Además, funcionan como zonas de refugio, reproducción y crianza para múltiples especies de importancia ecológica y económica (Roberts *et al.*, 2002).

Los arrecifes proveen servicios ecosistémicos de suma importancia, entre los que se enlistan la protección contra la erosión por el oleaje en zonas costeras (Pascal *et al.*, 2016), así como la participación en el reciclaje de carbono y nitrógeno (Yamamuro *et al.*, 1995; Moberg y Folke, 1999). Por otra parte, los recursos pesqueros que se sostienen en los arrecifes coralinos comprenden el 9% de los stocks pesqueros a nivel mundial (Sorokin, 1993). Así mismo, los arrecifes coralinos presentan un gran valor para el sector turístico (Moberg y Folke, 1999).

Derivado de estos servicios, los arrecifes coralinos son zonas altamente valiosas económicamente. En 2003, el valor económico mundial proveniente de estos ecosistemas se estimaba en 800 mil millones de dólares respecto a las pesquerías, protección costera y las actividades turísticas (Cesar *et al.*, 2003). Durante el 2008 en la zona turística del Caribe mexicano, se reportó una derrama económica de 5,400 millones de dólares atribuidos al turismo relacionado al Sistema Arrecifal Mesoamericano (Ardisson *et al.*, 2011).

Entre los atributos más importantes de los arrecifes de coral, se encuentra la alta heterogeneidad espacial, producto de la complejidad tridimensional que poseen las estructuras arrecifales. Esta complejidad está estrechamente relacionada con la biodiversidad y la productividad del ecosistema, así como con la capacidad de brindar servicios ambientales (González-Rivero *et al.*, 2017). No obstante, dicha complejidad puede ser vulnerada derivado de diversas causas entre las que se encuentran eventos de mortalidad y reducción en la cobertura coralina, provocados por varios factores, entre los que se encuentran la influencia antropogénica (Alvarez-Filip *et al.*, 2011).

A pesar de su importancia, la cobertura y la condición de salud de los arrecifes coralinos ha ido en decremento en las últimas décadas (Gardner *et al.*, 2003). Esta tendencia ha sido atribuida a los efectos del cambio climático, donde se incluye la acidificación de los océanos, aumento del nivel medio del mar, incremento de la temperatura, así como a los efectos antropogénicos como la contaminación y la sobrepesca (Mora, 2008), y el aumento en la prevalencia de enfermedades que afectan a los corales escleractíneos (Weil, 2004). Particularmente en la cuenca del Caribe, se estimó que la pérdida de cobertura coralina en el periodo de 1980 a 2003 fue del 80% (Gardner *et al.*, 2003).

1.2 Comunidades microbianas y enfermedades coralinas

El modelo del holobionte, se refiere al sistema biológico conformado por las relaciones simbióticas entre el hospedero y los microorganismos asociados a este (Rosenberg *et al.*, 2007) (Fig. 1). El holobionte presenta relaciones estrechas con bacterias, arqueas, hongos, virus, además de los dinoflagelados de la familia Symbiodiniaceae (Thompson *et al.*, 2014).

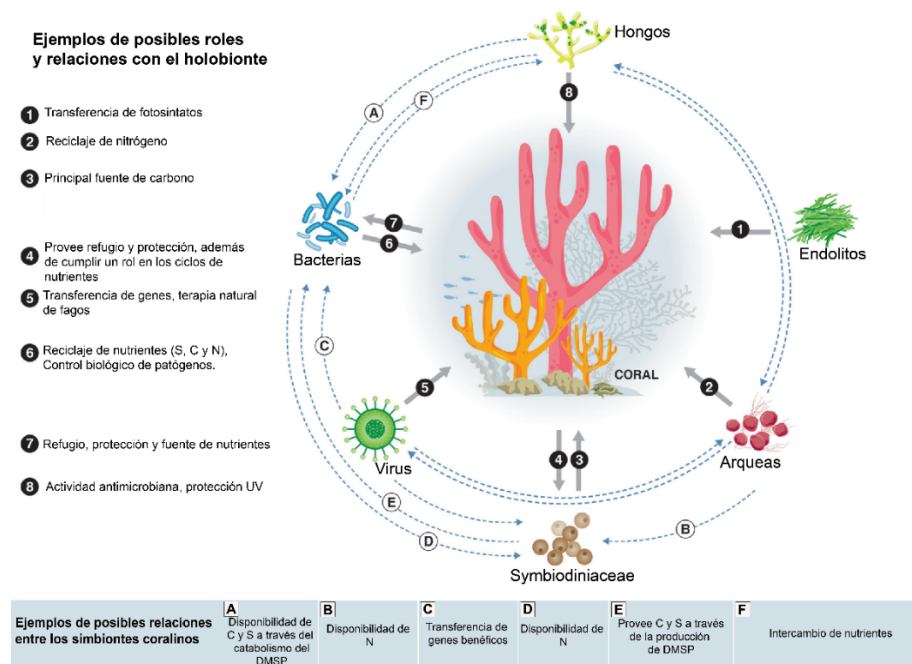


Figura 1. Relaciones simbióticas en el modelo del holobionte coralino (Modificado de Peixoto *et al.*, 2017).

La estabilidad en las relaciones entre los componentes del holobionte juega un papel importante en la salud y el desarrollo de éste (Dittami *et al.*, 2021). Sin embargo, cuando el holobionte está expuesto ante factores de estrés, dichas interacciones pueden verse comprometidas, provocando lo que se conoce como disbiosis, efecto que puede alterar la resiliencia del hospedero e incrementar la susceptibilidad de este ante el desarrollo de enfermedades (Reshef *et al.*, 2006).

Respecto al componente microbiano del holobionte, este puede referirse a la microbiota, la cual está conformada por los microorganismos vivos asociados al hospedero; mientras que el microbioma es toda la información genética de la microbiota (Berg *et al.*, 2020). La microbiota puede ser clasificada respecto al tipo de relación simbiótica que establece con la colonia coralina, pudiendo ser comensalista, mutualista o bien, patogénica. Se ha estimado que el espectro de la densidad de células bacterianas va desde una magnitud de 1×10^2 hasta más de 1×10^6 por centímetro cuadrado de tejido coralino (Bourne *et al.*, 2016). Las comunidades microbianas juegan un papel importante en el reciclaje y asimilación de nutrientes como el carbono, nitrógeno, sulfuro y fosfatos para el hospedero (Webster y Reusch, 2017). Por otra parte, las bacterias que habitan en los tejidos y el mucus de las colonias coralinas funcionan como una de las primeras líneas de defensa ante la proliferación de patógenos y el subsecuente desarrollo de enfermedades (Bourne *et al.*, 2016).

Las enfermedades coralinas pueden causar diversas afectaciones en las relaciones simbióticas del holobionte coralino (Rosenberg *et al.*, 2007), pudiendo derivar en el desarrollo de signos como la pérdida progresiva de tejido en las colonias de coral (Bourne *et al.*, 2009). En un sentido estricto, el término enfermedad coralina es utilizado cuando los agentes causales han sido identificados, mientras que el término síndrome hace referencia a un conjunto de signos específicos que caracterizan un estado anormal de la colonia coralina (Weil, 2004; Ainsworth *et al.*, 2007).

La prevalencia de las enfermedades que afectan a los corales ha aumentado considerablemente en las últimas décadas (Bruno *et al.*, 2003; Alvarez-Filip *et al.*, 2019). Además, la virulencia de los

patógenos se ha visto aumentada dadas las condiciones como la eutrofización en los océanos, el aumento en la temperatura en la columna de agua y la contaminación (Bruno *et al.*, 2003). Las patologías de corales, hoy en día se reconocen como uno de los factores más importantes que se atribuyen a la pérdida en la cobertura coralina a nivel mundial (Bourne *et al.*, 2009).

Particularmente en el mar Caribe, se reconoce como un centro importante para el surgimiento de patologías coralinas, caracterizado por la alta prevalencia y de las enfermedades y síndromes que afectan a los corales pétreos. Se hipotetiza que la influencia antropogénica junto al calentamiento global y a la dinámica de corrientes marinas dentro de la cuenca del Caribe facilitan el surgimiento de las enfermedades y su rápida propagación (Weil, 2004). En términos ecológicos, las enfermedades en la región han causado la pérdida de hasta un 80% de cobertura coralina (Aronson y Precht, 2001), teniendo como resultado directo la modificación de la heterogeneidad espacial y en los procesos ecológicos de los arrecifes coralinos (Bruno *et al.*, 2007; Pinzón *et al.*, 2014; Alvarez-Filip *et al.*, 2019).

1.3 La enfermedad de pérdida de tejido de corales pétreos

La enfermedad de pérdida de tejidos en corales pétreos, SCTLD (por sus siglas en inglés “*Stony Coral Tissue Loss Disease*”) es una enfermedad coralina caracterizada por la aparición de lesiones en los tejidos cuyo avance progresivo provoca el desprendimiento y la pérdida de tejido (Fig. 2) en las colonias de coral e incluso, en casos más avanzados de esta, la muerte de la colonia (Alvarez-Filip *et al.*, 2019). De manera general, los signos de esta enfermedad se caracterizan por áreas focales, multifocales de áreas de pérdida de tejido bordeadas por una franja blanquecina de esqueleto del coral expuesto (Bourne *et al.*, 2022). La tasa de pérdida de tejido en los casos más agudos puede ser tan rápida como de 3 a 4 cm² por día (Meiling *et al.*, 2021).



Figura 2. Comparación de la morfología de las lesiones de la enfermedad de pérdida de tejido en algunas de las especies susceptibles (Tomada de Andrew Baker©).

En 2014, se registró por primera vez los efectos de la enfermedad de pérdida de tejido de corales pétreos en las costas de Florida (Aeby *et al.*, 2019). Una de las principales consecuencias de la epidemia en los arrecifes de Florida, fue la pérdida de la cobertura coralina de hasta el 60% (Muller *et al.*, 2020). Esta patología ha afectado a 24 especies de corales escleractíneos clave para la construcción de arrecifes (Muller *et al.*, 2020). Las especies más susceptibles a esta enfermedad incluyen a *Eusmelia fastigata*, *Montastrea cavernosa*, *Dichocoenia stokesii*, *Meandrina meandrites*, *Dendrogyra cylindrus* y *Pseudodiploria strigosa* (Precht, 2019).

En 2018, se registró una expansión geográfica de la enfermedad similar a la observada en Florida en 82 sitios en la costa del Caribe mexicano (Alvarez-Filip *et al.*, 2019; Estrada-Saldívar *et al.*, 2020). En dichos registros, se detectó que las especies más afectadas por la enfermedad respecto al porcentaje de prevalencia de la patología fueron *D. cylindrus* (78%), *P. strigosa* (40%) y *M. meandrites* (38%) respectivamente (Alvarez-Filip *et al.*, 2019).

1.4 *Pseudodiploria strigosa*

Pseudodiploria strigosa es una especie de coral escleractíneo perteneciente a la familia Faviidae (Hoeksema y Cairn, 2021). Posee morfología colonial de tipo masivo, meandroide o incrustante (Fig. 3). El diámetro de las colonias puede superar los 2 m (Collin *et al.*, 2005). Presenta valles continuos y sinuosos, razón por la cual es conocido comúnmente como coral cerebro simétrico. Las colonias pueden presentar coloraciones verdes, amarillas y cafés. Su distribución abarca el Atlántico Tropical Occidental, particularmente las costas de Florida en Estados Unidos, Bahamas y el Caribe (Reyes *et al.*, 2010).

Pseudodiploria strigosa guarda estrecha relación con endosimbiontes fotosintéticos de la familia Symbiodiniaceae. Particularmente, en la región del Caribe, se ha reportado que posee dos tipos de simbiontes clasificados como parte de los géneros *Brevolium* y *Cladocopium* (LaJeunesse, 2002; LaJeunesse *et al.*, 2018).



Figura 3. Esqueleto de una colonia de *Pseudodiploria strigosa* (Fotografía de E.A. Lazo-Wasem©).

Es considerada como una especie constructora de arrecifes abundante en la zona del Caribe mexicano (Thome *et al.*, 2021). Dicha especie, se encuentra en una categoría de Preocupación Menor según la base de datos de la IUCN (Aronson *et al.*, 2008). Sin embargo, esta especie se ha catalogado como altamente susceptible ante la enfermedad de pérdida de tejido de corales pétreos en la región del Caribe mexicano (Estrada-Saldívar *et al.*, 2020).

2. ANTECEDENTES

2.1 Composición de la microbiota asociada a los corales y el desarrollo de enfermedades

La comunidad microbiana núcleo asociada a las colonias coralinas es el grupo de especies microbianas que son consistentes en el hospedero, independientemente de su localización geográfica, condiciones ambientales y tiempo (Sweet y Bulling, 2017; Vega-Thurber *et al.*, 2020). Por otra parte, el principio de Anna-Karennina, fue acuñado para explicar la dinámica de la composición de la microbiota coralina, y habla sobre cómo el perfil microbiano está sujeto a selección por parte del hospedero y del ambiente en el que la colonia se desarrolla, favoreciendo aquellos taxa microbianos que resulten benéficos para ésta (Sweet *et al.*, 2019).

Sin embargo, se ha demostrado que la perturbación de las comunidades microbianas asociadas a las colonias coralinas puede derivar en el desarrollo de patologías (Krediet *et al.*, 2013). Así mismo, al estudiar las causas que originan las enfermedades de corales es importante no suponer que un solo patógeno es responsable del desarrollo de una enfermedad, ya que puede limitar la caracterización integral de esta (Vega-Thurber *et al.*, 2020). A partir del desarrollo de herramientas con un enfoque metagenómico, se acuña el término de “patobioma” el cual hace referencia a las complejas interacciones entre el o los agentes etiológicos y los elementos bióticos y abióticos que convergen en su entorno (Vayssier-Taussat *et al.*, 2014).

La plaga blanca (Fig. 4) es una enfermedad difundida en el Caribe que presenta una alta mortalidad para diversas especies de corales. Esta enfermedad se considera una de las más profundamente caracterizadas. Estudios han sugerido que la diversidad y riqueza de los taxa microbianos en colonias sin signos de la enfermedad es consistente. Por otra parte, también es sugerido que la composición de las comunidades microbianas de colonias con signos de la enfermedad es conservada, independientemente de la especie coralina y de la ubicación geográfica (Roder *et al.*, 2014).



Figura 4. Colonia de *Montastrea faveolata* con signos de la enfermedad de la plaga blanca (Tomada de M. Nugues 2004 ©).

Así mismo, la enfermedad del parche gris (Fig. 5), una patología coralina que afecta a los corales pétreos en la región de Micronesia en el Pacífico ha sido caracterizada con un enfoque particular en estudiar la composición de las comunidades microbianas asociadas entre colonias sanas y enfermas. Para esta enfermedad se demostró que en las colonias con signos de la enfermedad la diversidad y la riqueza era uniforme, independientemente de la especie coralina; mientras que las colonias sanas presentaban un perfil microbiano diverso (Sweet *et al.*, 2019).

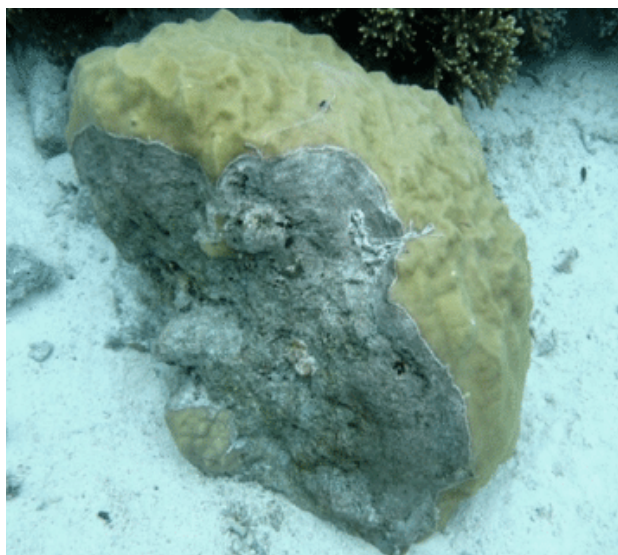


Figura 5. Colonia de *Porites lobata* con signos de la enfermedad de parche gris (Modificada de Sweet *et al.*, 2019).

Entre los principales retos que presenta el estudio de patologías es la caracterización de las comunidades microbianas asociadas de manera que se pueda explorar y caracterizar la patogénesis de la enfermedad. Es usual que el diagnóstico de las enfermedades sea principalmente por observaciones macroscópicas como la pérdida de tejido, coloraciones anormales o anomalías en el esqueleto coralino (Bourne *et al.*, 2009; Pollock *et al.*, 2011). Es en este contexto que el estudio de las diferencias en la microbiota asociada resulta como una oportunidad para un manejo íntegro de esta enfermedad.

2.2 Naturaleza de los agentes etiológicos asociados a la enfermedad de pérdida de tejido de corales pétreos

Para identificar los agentes etiológicos asociados a enfermedades infecciosas, se han determinado criterios conocidos como los postulados de Koch. Estos criterios deben ser cumplidos para asociar de forma certera un organismo putativamente patogénico con una enfermedad determinada (Falkow, 1988). El cumplimiento de los criterios sólo es posible cuando el potencial patógeno puede ser asociado regularmente a la enfermedad y a sus signos; debe ser posible aislar a este organismo del huésped enfermo y debe ser posible su cultivo en laboratorio. Una vez aislado en un cultivo axénico, la enfermedad debe ser producida cuando el cultivo del organismo entra en contacto con un huésped saludable y susceptible (Breitschwerdt *et al.*, 2013).

Sin embargo, al hablar de enfermedades coralinas, el estudio de los agentes etiológicos mediante los postulados de Koch se vuelve complejo. Esto derivado a que las condiciones de laboratorio pueden no replicar completamente las condiciones del medio marino; así mismo, para muchos casos el método de transmisión es desconocido y la inoculación con el potencial patógeno puede no ser exitosa (Richardson, 1998).

Descripciones histopatológicas de las lesiones causadas por la enfermedad han demostrado afecciones directas a las células de los endosimbiontes de la familia Symbiodiniaceae entre las que se enlistan necrosis, degradación de cloroplastos y atrofiaciones celulares, así como cambios degenerativos en las células del hospedero coralino (Landsberg *et al.*, 2020). Así mismo, se

describieron las lesiones tisulares mediante microscopía electrónica de transmisión denotando la ausencia de células bacterianas, pero encontrando partículas elongadas compatibles con la morfología de partículas anisométricas similares a virus asociadas a las células de los endosimbiontes (Work *et al.*, 2021). Posteriormente en un estudio enfocado al estudio de dichas partículas estas fueron clasificadas como los alphaflexivirus asociados al holobionte coralino (*coral holobiont-associated alphaflexivirus*, CHFV) 1 y 2 (Veglia *et al.*, 2022).

Dada la evidencia recolectada respecto a la descripción histopatológica de las lesiones se ha hipotetizado, que, al igual que otras enfermedades coralinas, la enfermedad de pérdida de tejido en corales pétreos podría ser resultado de un estado de disbiosis del microbioma causado por un agente patogénico primario, como los CHFV 1 y 2, o bien, una inmunosupresión causada por condiciones ambientales adversas, lo que podría desencadenar la proliferación de la microbiota oportunista (Studivan *et al.*, 2022). Dicha hipótesis es favorecida por los experimentos de prospección para determinar la efectividad del uso de antibióticos para el tratamiento de la enfermedad.

A partir del supuesto de que, si una colonia con signos de la enfermedad es tratada con antibióticos y la progresión de las lesiones es frenada, entonces se podría sugerir que el componente bacteriano juega un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. Los resultados de dichos experimentos en especies de *Montastrea cavernosa*, *Colpophylia natans* y *Meandrina meandrites* demostraron que el uso de antibióticos de amplio espectro como la amoxicilina, la kanamicina y el ácido nalidíxico en combinación con resina epóxica derivan en el cese de la progresión de la enfermedad hasta en un 95% (Aeby *et al.*, 2019).

Dentro de la misma línea de investigación, se han realizado también experimentos utilizando un tratamiento tópico con una combinación de pasta de silicona con amoxicilina en proporción 8:1 en diversas especies, entre las que se enlistó *Pseudodiploria strigosa* y se demostró una efectividad de un 73% en el cese de la enfermedad comparado con el tratamiento placebo (Neely *et al.*, 2020).

2.3 Caracterización de las comunidades microbianas asociadas a la enfermedad de pérdida de tejido de corales pétreos

Una de las aproximaciones para el estudio de las comunidades microbianas asociadas a la enfermedad ha sido mediante el análisis de secuencias de regiones del gen 16S del ARNr en múltiples especies coralinas en diversas localidades, dentro de las que se enlistan *Orbicella faveolata*, *Diploria labyrinthiformis* (Meyer *et al.*, 2019) y *Dichocoenia stokesii*, *Meandrina meandrites* (Rosales *et al.*, 2020) en el Cayo Medio de Florida, Estados Unidos; *Orbicella franksi* en las Islas Vírgenes de Estados Unidos (Becker *et al.*, 2021) y finalmente *Siderastrea siderea* y *Pseudodiploria strigosa* en los Cayos Bajos de Florida (Clark *et al.*, 2021) y en Puerto Morelos, Quintana Roo (Thome *et al.*, 2021).

Diversos estudios han encontrado una lista de grupos bacterianos que han presentado un enriquecimiento en las colonias con lesiones en comparación de aquellas colonias coralinas sin estas. Los grupos que se han reportado con mayor frecuencia en los estudios del microbioma han sido los órdenes Rhodobacterales, Rhizobiales y Vibrionales, de este último particularmente el género *Vibrio* (Rosales *et al.*, 2020; Becker *et al.*, 2021; Clark *et al.*, 2021), así mismo, se ha reportado la incidencia de otros grupos, tales son los órdenes Clostridiales y Alteromonadales (Meyer *et al.*, 2019).

Dentro del orden Rhodobacterales, se han reportado secuencias de organismos pertenecientes a la familia Rhodobacteraceae con abundancias relativas altas en muestras de aguas cercanas a arrecifes en condiciones deterioradas, y se ha sugerido que este grupo podría tratarse de un bio-indicador para arrecifes en condiciones de estrés (Glasl *et al.*, 2019). Por otro lado, el orden Rhizobiales se ha reportado especialmente enriquecido en etapas iniciales dentro de los primeros 4 días del desarrollo de la enfermedad. Además, se sugiere que podría existir una asociación entre ambos órdenes, ya que se ha evidenciado un posible recambio en la comunidad microbiana durante diversas etapas de la progresión de la enfermedad (Rosales *et al.*, 2020).

A su vez, especies del género *Vibrio* han sido asociadas con otras enfermedades y síndromes que afectan a diversas especies coralinas, entre los que se enlistan el blanqueamiento en

Oculina patagonica, necrosis rápida del tejido, banda blanca, plaga blanca tipo I y II y la mancha amarilla (Munn, 2015). Así mismo, su enriquecimiento en el microbioma coralino ha sido asociado con eventos de estrés térmico en temperaturas mayores a los 27° C (Kimes *et al.*, 2012).

Respecto a las secuencias clasificadas dentro del orden Clostridiales, se han reportado abundancias relativas significativamente mayores en colonias de *Colpophyllia natans*, *M. cavernosa* y *Pseudodiploria strigosa*, constituyendo hasta un 56% de los taxa dentro de las comunidades microbianas con lesiones activas de la enfermedad. Los miembros de este orden han sido clasificados como oportunistas, ya que pueden colonizar el tejido infectado e inducir necrosis en el tejido ya comprometido (Clark *et al.*, 2021). Se han encontrado de forma enriquecida en el tejido de colonias coralinas afectadas por la enfermedad de la plaga blanca en *Montastrea cavernosa* en Bocas del Toro, Panamá (Sunagawa *et al.*, 2009).

La presencia de taxa pertenecientes al orden Alteromonadales ha sido también asociada a tejido coralino de colonias con lesiones o en condiciones de estrés, reportándose también en colonias afectadas por la plaga blanca (Sunagawa *et al.*, 2009), aunado a los reportes en colonias con una infección por la enfermedad de pérdida de tejido en corales pétreos.

El estudio de las comunidades microbianas de *Pseudodiploria strigosa* en Puerto Morelos, Quintana Roo (Thome *et al.*, 2021) fue el primer esfuerzo en realizar análisis de las comunidades microbianas asociadas a la enfermedad de pérdida de tejido en corales pétreos en dicha localidad y con la especie de interés del presente trabajo. En esta investigación, se concluyó que la clase Bacteroidia fue la que presentó cambios significativos en las colonias con lesiones, particularmente el género *Roseimarinus* (Thome *et al.*, 2021). Este género ha sido reportado como un biomarcador para sedimentos marinos con alto contenido de materia orgánica (Verhoeven *et al.*, 2018), así como también se ha reportado que este grupo está relacionado con el desarrollo de infecciones en otros invertebrados, particularmente erizos y mejillones (Ketchum *et al.*, 2021).

A pesar de que los grupos bacterianos enlistados arriba han presentado enriquecimientos en tejido de colonias con lesiones respecto a las colonias no afectadas por la enfermedad de pérdida de tejido de corales pétreos, es necesaria una caracterización de la microbiota en diferentes estadios del desarrollo de la enfermedad para la determinación de los agentes etiológicos, haciendo especial énfasis en el seguimiento de los grupos oportunistas.

3. JUSTIFICACIÓN

La región del Caribe mexicano se ha visto afectada por la aparición de enfermedades emergentes que afectan a los corales en las últimas décadas, conllevando a grandes índices de mortalidad. La enfermedad de pérdida de tejido de corales pétreos es reconocida como la afectación más importante para los corales de la que se tiene registro.

Por otra parte, es sabido que el componente microbiano juega un papel importante en el mantenimiento y el desarrollo de la salud en los corales. Así mismo, se ha reconocido que algunos microorganismos son agentes patógenos en enfermedades coralinas. Es por ello que el estudio de la diversidad y estructura de las comunidades microbianas asociadas a las enfermedades coralinas y poder comprender el rol que los microorganismos pudieran tener.

Al ser una especie constructora abundante en la región y ser clasificada como moderadamente susceptible a la enfermedad, *Pseudodiploria strigosa* resulta ser una especie clave para el estudio de las comunidades microbianas. De tal manera que el estudio de la microbiota asociada a las colonias coralinas de esta especie puede generar una línea base para reconocer los microorganismos presentes tanto en colonias afectadas por la enfermedad y en colonias aparentemente sanas y potencialmente dilucidar el perfil que estos microorganismos podrían tener en el desarrollo de la enfermedad.

4. HIPÓTESIS

Debido a que el microbioma de los corales pétreos puede sufrir perturbaciones derivadas de condiciones de estrés y con la presencia de patologías y el desarrollo de esta, se espera que las comunidades microbianas asociadas a *Pseudodiploria strigosa* presenten diferencias en composición y estructura, así como también se espera encontrar diferencias respecto a la escala temporal (2018 vs 2019).

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Analizar la estructura y composición de la microbiota asociada a *Pseudodiploria strigosa* en colonias aparentemente sanas y afectadas por la enfermedad de pérdida de tejido en corales pétreos en los años 2018 y 2019 de dos localidades del Caribe Mexicano.

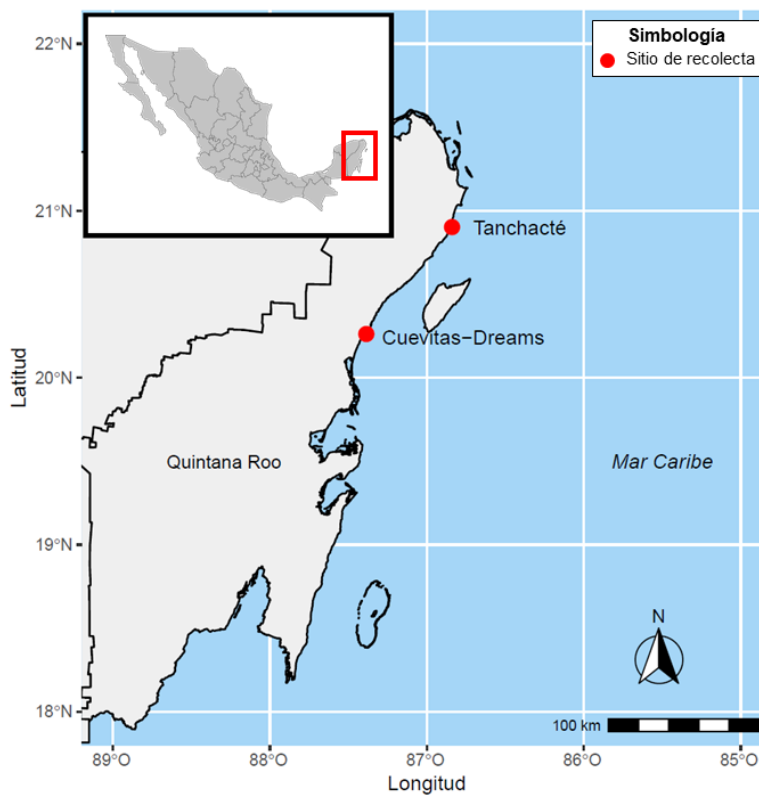
5.2 Objetivos particulares

- Caracterizar la estructura y composición de la microbiota de colonias de *Pseudodiploria strigosa* aparentemente sanas y enfermas y su variación temporal en los años 2018 y 2019.
- Evaluar cambios en la composición y estructura del microbioma asociados a la enfermedad de pérdida de tejido en corales pétreos.
- Identificar los potenciales perfiles funcionales del microbioma asociado colonias aparentemente sanas y afectadas por la enfermedad de pérdida de tejido en corales pétreos mediante la predicción funcional por herramientas bioinformáticas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Recolecta de muestras y preservación

Se realizó una recolección de 25 muestras de tejido de 20 colonias de *P. strigosa* durante un estadio avanzado de la epidemia de la enfermedad a nivel regional en agosto de 2019 en dos sitios a lo largo de la costa del Caribe del estado de Quintana Roo, México: Puerto Morelos, y



Cuevitas-Dreams (Fig. 6, Tabla I).

Figura 6. Ubicación de los sitios de muestreo dentro del área de estudio. Los círculos rojos indican los sitios de recolección. Datum: WGS-84 / Coordenadas: UTM Zona 17Q. Proyección cilíndrica. El mapa se construyó por elaboración propia.

Para evaluar la estructura y composición de la microbiota de acuerdo al estado de salud de las colonias coralinas y su variación intracolonia, la selección de colonias para recolectar tejido fue llevada de la siguiente manera (Fig. 7): a) colonias aparentemente sanas (S) y b) colonias enfermas. En las colonias enfermas, se obtuvieron dos tipos de muestra: 1) cerca de la lesión (ECL), y 2) al menos 25 cm de distancia alejada del frente de lesión (ELL); siendo esta

únicamente considerada cuando la colonia fue lo suficientemente grande y la progresión de las lesiones lo permitieron.

Tabla 1. Clasificación de las muestras de tejido colectadas por sitio y condición.

Sitio	Condición	Número de muestras
Puerto Morelos	ECL	9
	ELL	5
	S	6
Cuevitas - Dreams	ECL	2
	S	3

Para la recolección de tejido, se utilizó un martillo y un clavo y se desprendió un fragmento de coral de aproximadamente 2 cm² de la colonia. Cada muestra fue depositada en una bolsa con cierre zip de manera individual.

Clasificación de colonias



Figura 7. Clasificación de los tipos de muestra por estado de salud. a) Colonia enferma: 1) cerca de la lesión (ECL), 2) lejos de la lesión (ELL); b) Colonia aparentemente sana (S).

Posteriormente, se eliminó el exceso de mucus de la muestra de tejido utilizando papel secante. Después, se fragmentó cada pedazo de muestra utilizando tijeras y pinzas, las cuales fueron

limpiadas con alcohol etílico al 70%. Cada una de las muestras fue colocada en tubos de plástico estériles con 10 mL de RNA Later. La manipulación de las muestras se realizó utilizando un par de guantes estériles por cada muestra tanto en la recolecta como en el procesamiento de muestras en el laboratorio para evitar contaminación cruzada. Seguido, los tubos fueron colocados en refrigeración a 4°C por 24 horas y posteriormente fueron almacenados a -20° C hasta su procesamiento en laboratorio.

6.2 Extracción de ADN genómico

Del tejido de coral, se realizó la extracción de ADN genómico tomando 0.2 g de muestra. Las extracciones de ADN, se realizaron utilizando el kit DNeasy[®] Blood & Tissue (Qiagen[®]) de acuerdo al procedimiento del fabricante. Posteriormente, se verificó la calidad de la extracción mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%. Se verificó que la concentración de ADN fuera mayor o igual a 100 ng y una relación de absorbancia A260/280 de entre 1.6 y 2.0 para proceder con el procesamiento de las muestras.

6.3 Construcción de bibliotecas para la secuenciación de amplicones

6.3.1 Amplificación del gen 16S ARNr

La amplificación por PCR de las regiones hipervariables V3 y V4 del gen 16S de ARNr, se realizó utilizando las condiciones sugeridas por Klindworth *et al.*, 2013, con los primers 341F y 805R, los cuales incluyeron los adaptadores necesarios para la secuenciación en la plataforma Illumina[®].

La reacción de PCR se preparó utilizando el Mastermix F-548 2x Phusion Flash de Thermo Scientific[®] con 0.5 µL de cada primer, 5 µL del ADN de la muestra y agua ultrapura para obtener un volumen total de 20 µL. El protocolo de la reacción de PCR tuvo una desnaturalización inicial de 95° C por 3 minutos, posteriormente se realizaron 27 ciclos de 95° C por 30 segundos, 55° por 30 segundos y 72° C por 30 segundos, seguidos de una extensión a una temperatura de 72° C por 5 minutos. Los productos fueron conservados a -20°C hasta su posterior manipulación.

6.3.2 Purificación

Se realizó una purificación de los amplicones utilizando las perlas magnéticas AMPure XP (Beckman Coulter[®]) con el fin de eliminar los restos de primers y dímeros de los productos de

PCR, manteniendo solo los amplicones de interés según el protocolo del fabricante. Por último, se almacenaron las muestras a -20°C hasta su posterior procesamiento.

Se colocó el producto de PCR en un tubo de 1.5ml y se añadieron 38 μL de la solución de perlas magnéticas y mezcló la solución mediante pipeteo hasta que la solución se homogeneizara. Se dejó reposar durante 5 minutos. Posteriormente, se colocaron las soluciones en un magneto Thermo Scientific[®] durante 2 minutos, después se retiró la fracción líquida evitando tocar las perlas. Luego se realizaron dos lavados, añadiendo 195 μL de alcohol etílico al 80% en cada vial, se esperó 30 segundos y se retiró el alcohol. Luego los viales fueron ventilados durante 5 minutos para que el alcohol restante se evaporara. Seguido, los viales fueron retirados del magneto.

Después, se re-suspendieron las perlas con tris(hidroximetil)aminometano y se mezcló la solución hasta homogeneizarla y se dejó reposar durante 2 minutos. Posteriormente, los viales fueron colocados en contacto con el magneto por dos minutos. Finalmente, se recuperó la fracción líquida sin disturbar las perlas y se transfirió a un microtubo estéril. Finalmente se almacenaron las muestras a -20°C hasta su posterior procesamiento.

6.3.3 Adición de índices de secuenciación

Se realizó una segunda reacción de PCR de 8 ciclos, partiendo de 5 μL del producto de PCR purificado, adicionando 2 μL del índice S y 2 μL del índice N del kit de Nextera XT. Cada muestra tuvo una combinación única de índices. Los productos de PCR se purificaron nuevamente con el procedimiento descrito y se visualizó en el equipo QIAxcel Advanced Qiagen[®] para verificar el tamaño de la biblioteca.

6.3.4 Normalización y secuenciación

Los productos de la segunda PCR se cuantificaron con el equipo Qubit[®] 3.0 (Invitrogen[®]). Se realizaron diluciones para normalizarlos a una concentración de 4 nM. Se tomaron 5 μL de cada muestra y se realizó un pool de todas las muestras a ser secuenciadas. Este pool se desnaturalizó y fue diluido a una concentración de 10pM. Lo anterior fue repetido con el control

Phix para posteriormente mezclarlos en proporción 1:4 y se cargó el producto en el secuenciador DNA MiSeq de Illumina® con un cartucho de la química V2 (2x250 pb).

6.4 Análisis bioinformático

6.4.1 Obtención de secuencias de estudio previo

Se obtuvieron las secuencias (*raw reads*) de un estudio previo realizado en Puerto Morelos, Quintana Roo (20°53'04"N, 86°50'50"O) respecto al análisis de la microbiota asociada a *Pseudodiploria strigosa* en un estadio inicial de la epidemia de la enfermedad de pérdida de tejido de corales pétreos durante los meses de septiembre y octubre de 2018 (Anexo A) (Thome *et al.*, 2021). Dichas secuencias se encuentran depositadas en el bio-proyecto de la base de datos del NCBI bajo el código de acceso PRJNA610838.

Estas secuencias fueron anexadas a los archivos obtenidos de la secuenciación de las muestras correspondientes al año 2019 para la construcción de una única biblioteca de secuenciación para posteriormente continuar con su procesamiento.

6.4.2 Procesamiento bioinformático de las secuencias obtenidas en este trabajo

Las secuencias pareadas *demultiplexadas* en el formato *.fastq* fueron procesadas con el flujo de trabajo en la plataforma QIIME2 versión 2021.4 (Caporaso *et al.*, 2010). Después de una inspección manual, las lecturas *forward* y *reverse* fueron cortadas en la posición 40 en el extremo 5' y truncadas en la posición 240 en el extremo 3' para filtrar las lecturas de baja calidad.

El plug-in DADA2 (Callahan *et al.*, 2016) fue utilizado para definir las ASVs (*Amplicon Sequence Variants*, variantes de secuencia de amplicón) mediante la eliminación de ruido, corrección de errores y la eliminación de secuencias quiméricas. La asignación taxonómica, se realizó a partir de la tabla de ASVs representativos. Los ASVs fueron asignados taxonómicamente utilizando el plug-in de V-SEARCH usando la base de datos de SILVA (ver. 138) como referencia (Quast *et al.*, 2013). Las secuencias representativas fueron alineadas utilizando el método de MAFFT (Kato y Standley, 2013) del plug-in de alignment y se construyó un árbol filogenético con el método de FastTree 2 (Price *et al.*, 2010) del plug-in phyogeny dentro de QIIME2.

La tabla de ASVs y el árbol filogenético generado fueron exportados al ambiente de programación R. Los análisis estadísticos y la visualización de los resultados se realizaron usando las librerías *phyloseq* (McMurdie y Holmes, 2013), *vegan* (Oksanen *et al.*, 2020) y *ggplot2* (Wickham, 2016). La tabla de abundancia fue filtrada y se eliminaron aquellos ASVs sin dominio asignado, así como también aquellos clasificados como mitocondrias y eucariotas.

Así mismo, se construyó la curva de rarefacción para evaluar si el número de lecturas fue suficiente como para detectar adecuadamente la riqueza de ASVs obtenidos. Dicha suficiencia es satisfactoria cuando la curva exhibe una asíntota. Cinco de las muestras recolectadas durante el año 2019 fueron excluidas de los análisis por presentar coloraciones blanquecinas anómalas (Anexo F) en comparación a las lesiones típicas de la enfermedad.

6.4.3 Análisis de alfa diversidad

A partir de los ASVs filtrados, se obtuvo una tabla de abundancia, la cual fue normalizada a partir de una transformación de tipo CSS (*cumulative sume scaling*) con la función *phyloseq_transform_css* del paquete *metagMisc* (Mikryukov y Mahé, 2021).

Las diferencias en las comunidades microbianas fueron evaluadas entre años (2018 y 2019), sitios (Puerto Morelos y Cuevitas-Dreams) y condición de la muestra (ECL, ELL y S). Se realizaron las estimaciones de los índices de alfa diversidad de ASVs observados, así como el índice de Shannon utilizando la paquetería *vegan*.

Se realizó una prueba de normalidad de Shapiro-Wilks para determinar si los datos cumplían los supuestos para realizar un análisis paramétrico de tipo ANOVA de una vía y se realizó la prueba *pos-hoc* de Tukey en caso de encontrarse diferencias significativas. En caso de no cumplir con los supuestos, las métricas de alfa diversidad fueron comparadas mediante una prueba de suma de rango de Kruskal-Wallis para determinar si existen diferencias significativas. En caso de detectarse diferencias significativas, se utilizó la prueba *pos-hoc* de Dunn.

6.4.4 Análisis de beta diversidad

La ordenación en la ecología microbiana es utilizada para representar de manera óptima las similitudes de las comunidades microbianas en un espacio de dimensiones reducidas (Hawinkel *et al.*, 2019). El escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) es una técnica de ordenación utilizada en ecología microbiana para detectar diferencias entre comunidades microbianas (Paliy y Shankar, 2016) respecto a variables ambientales y ecológicas. En el análisis NMDS, la proximidad de los objetos corresponde a su similitud (Ramette, 2007).

Para comparar la estructura de la comunidad microbiana respecto a la condición de salud, y sitio de estudio y año, se realizó un escalamiento no-métrico multidimensional (NMDS) utilizando el paquete de *vegan* a partir de la métrica de distancia de Bray-Curtis. Así mismo, se realizaron análisis de varianza multivariada (PERMANOVA) a partir de la función *adonis* con 1,000 permutas para detectar diferencias en la composición de la comunidad microbiana entre las condiciones de salud, sitios de estudio y años.

6.4.5 Composición taxonómica de las comunidades microbianas

Para analizar la composición de la comunidad microbiana por condición de salud, sitios de estudio y por año, se obtuvo la abundancia relativa por ASV a partir de la tabla de abundancia y se graficaron los taxa que presentaron una abundancia mayor al 1% para el nivel clase; y mayor al 2% para el nivel orden. Así mismo, se generaron las gráficas para observar la variación intracolonia en aquellas colonias enfermas de las cuales se obtuvieron muestras de la condición ECL y ELL.

6.4.6 Análisis de abundancia diferencial

Para detectar diferencias en la composición de la comunidad microbiana, se realizó un análisis de abundancia diferencias de los ASV entre las condiciones de salud mediante un análisis discriminante lineal (LDA) con tamaño del efecto (LEfSe) (Segata *et al.*, 2011) a nivel taxonómico de clase y género con corte de LDA > 2 y un valor de $p < 0.05$ para las pruebas internas de Kruskal-Wallis y Wilcoxon utilizando el paquete de *microeco* (Liu *et al.*, 2021).

6.4.7 Análisis de predicción funcional

Para identificar los perfiles funcionales a partir de secuencias del gen 16S de ARNr, se realizó un análisis de predicción de grupos funcionales de taxa de procariontes. Se construyó un objeto microtable del paquete *microeco* a partir de un objeto *phyloseq* conteniendo las tablas de ASVs de los años 2018 y 2019. Posteriormente se realizó un emparejamiento de la identidad taxonómica de los ASVs y la base de datos de FAPROTAX v.1.2.4 (Louca *et al.*, 2016) con la función *trans_func* de *microeco*. Luego el número de ASVs involucrados en funciones específicas y su abundancia relativa expresada en porcentaje fue calculada a partir de las funciones *cal_spe_func* y *cal_spe_func_perc* incorporadas en el paquete *microeco*. Finalmente, se construyó un mapa de calor con el porcentaje de ASVs respecto a su metabolismo y funciones de los ciclos biogeoquímicos de C, N y S. Para evaluar las diferencias entre las condiciones de las muestras se realizaron pruebas de Kruskal-Wallis.

7. RESULTADOS

7.1 Métricas de diversidad

Después del procesamiento de la biblioteca de secuenciación, se obtuvieron un total de 347,329 lecturas (Anexo B), mismas que fueron clasificadas en 4,592 ASVs. Respecto al número de ASVs observados (Fig. 8), se encontró que en el año 2018 la condición ECL presentó de 123 a 252; la condición ELL de 135 a 163 y la condición S de 117 a 207 ASVs. No se encontraron diferencias significativas entre las tres condiciones ($F_{2,5} = 0.062$, $p = 0.941$).

Para el año 2019, en cuanto a los ASVs observados la condición ECL tuvo un rango de 26 a 135, la condición ELL presentó 319 a 521 ASVs y finalmente la condición S presentó de 248 a 51, encontrándose diferencias significativas ($\chi^2 = 14.206$, g.l. = 2, $p = 0.0008$). La prueba post hoc denotó la formación de dos grupos homogéneos, el primero conformado únicamente por la condición ECL y el segundo conformado por las condiciones ELL y S.

Respecto a la comparación de los años, se encontraron diferencias significativas para las condiciones ELL ($t=4.389$, g.l.= 2.22, $p = 0.0397$) y S ($t=5.0671$, g.l.= 8.071, $p = 0.0009$), mientras que para la condición ECL no se encontraron dichas diferencias ($t=2.0299$, g.l.= 2.3958, $p = 0.158$).

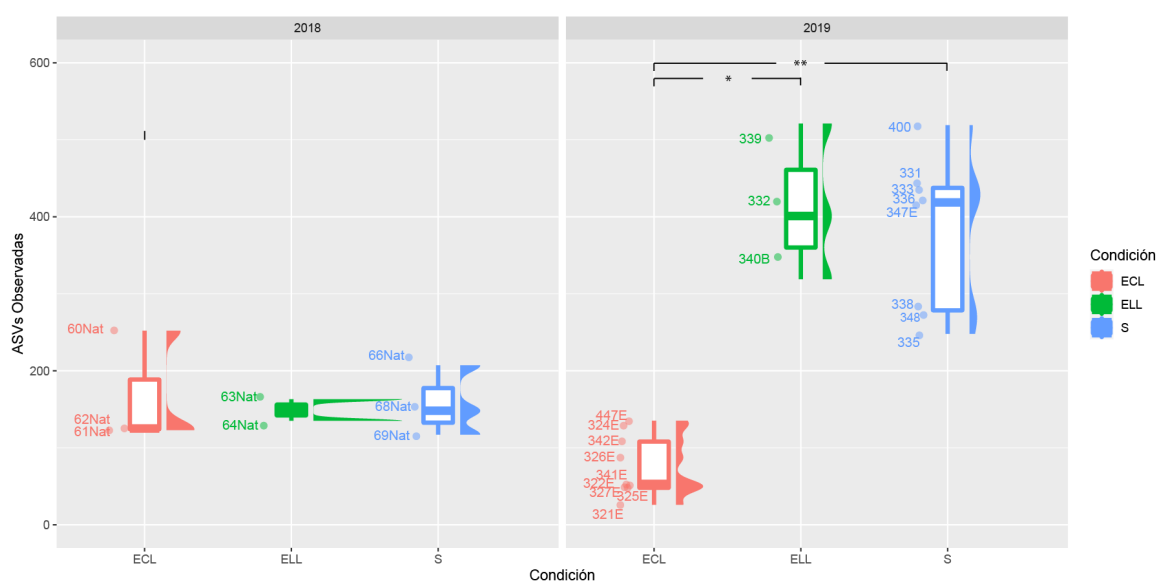


Figura 8. ASVs observados por año según la condición de salud las colonias de coral: [Color rojo] Enferma cerca de la lesión (ECL), [Color verde] Enferma lejos de la lesión (ELL), [Color azul] Aparentemente sana (S). Nivel de significancia: *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

En cuanto al índice de diversidad de Shannon (Fig. 9) para el año 2018 la condición ECL presentó valores entre 4.71 y 5.42, la condición ELL valores de 4.84 y 5.02, mientras que para la condición S se estimaron valores de entre 4.69 y 5.25. No se encontraron diferencias significativas entre las tres condiciones ($F_{2,5} = 0.006$, $p = 0.994$).

En relación al año 2019, la condición ECL presentó un rango de valores de 3.19 a 4.85, la condición ELL valores entre 5.68 a 6.18, y la condición S valores de 5.43 a 6.15. Se encontraron diferencias significativas entre las tres condiciones ($\chi^2=14.195$, $p=0.0008$), formándose dos grupos, el primero conteniendo únicamente a la condición ECL y el segundo incluyendo a las condiciones ELL y S.

De acuerdo a la comparación por año de acuerdo a cada una de las condiciones, se encontraron diferencias significativas en la condición ECL ($t=-2.7965$, g.l.= 4.9459, $p = 0.038$), ELL ($t=5.8038$, g.l.= 2.9559, $p = 0.0106$) y la condición S ($t=4.5708$, g.l.= 3.4402, $p = 0.0145$).

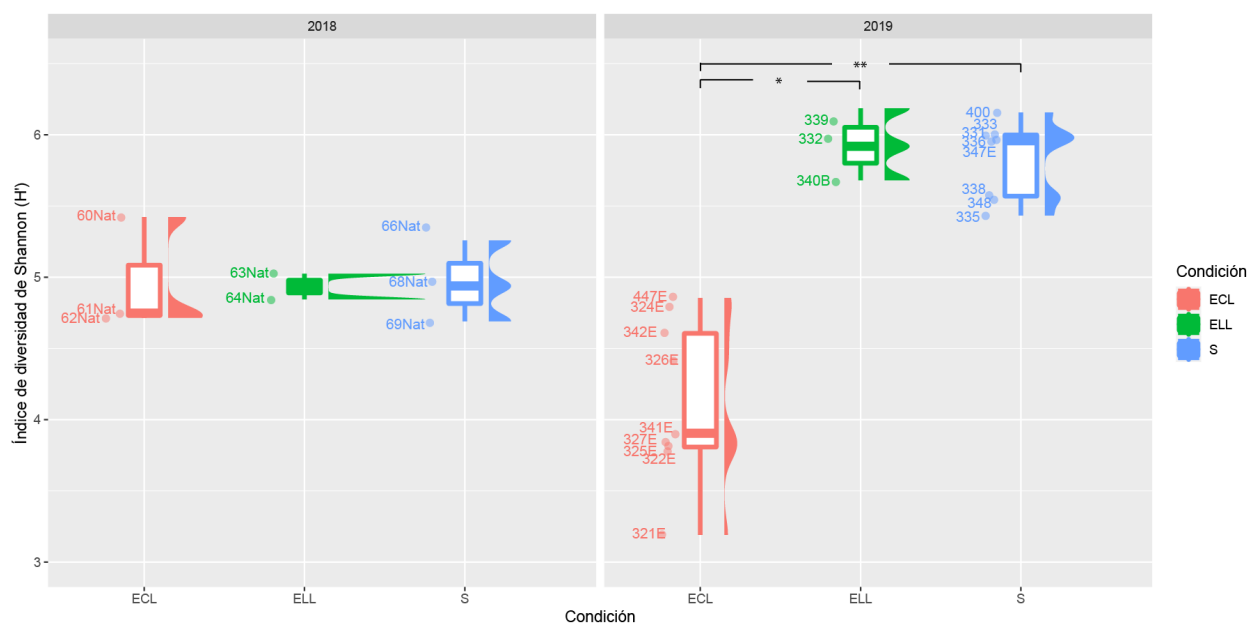


Figura 9. Índice de diversidad de Shannon (H') por año según la condición de salud las colonias de coral: [Color rojo] Enferma cerca de la lesión (ECL), [Color verde] Enferma lejos de la lesión (ELL), [Color azul] Aparentemente sana (S). Nivel de significancia: *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

El NMDS del total de las muestras presentó un nivel de estrés de 0.14 (Fig. 10). La ordenación de la estructura de las comunidades microbianas está asociada a la condición de las muestras. El análisis PERMANOVA detectó diferencias respecto a la condición ($R^2=0.124$, $p=0.001$) y al año ($R^2=0.155$, $p=0.001$).

Para el año 2018, las muestras presentaron una dispersión menor, sin embargo, una separación intra-anual de la condición ELL y S respecto a la ECL. Por otra parte, en el año 2019, la agrupación respecto a la condición es mucho más evidente, habiendo una segregación de la condición ECL respecto al grupo de la condición ELL y S. También cabe destacar que la dispersión entre las condiciones ELL y S es mucho más evidente para el año 2019 que en 2018.

Así mismo, la agrupación por condición se mantiene cuando los años son analizados por separado (Anexo D).

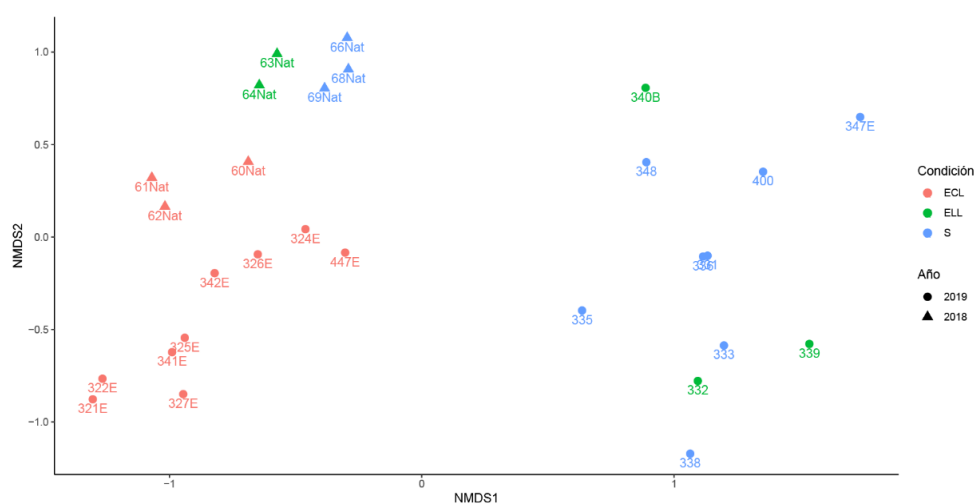


Figura 10. Ordenación mediante un escalamiento multidimensional no-métrico (NMDS) de la estructura de las comunidades microbianas de las muestras de las tres condiciones: [Color rojo] Enferma cerca de la lesión (ECL), [Color verde] Enferma lejos de la lesión (ELL), [Color azul] Aparentemente sana (S), respecto a los años 2018 (triángulo) y 2019 (círculo).

7.2 Composición taxonómica y estructura de la microbiota de colonias enfermas cerca (ECL) y lejos de la lesión (ELL)

Respecto a la variación intracolonia de la composición taxonómica de la microbiota a nivel clase en muestras de colonias enfermas cerca (ECL) y lejos de la lesión (ELL) (Fig. 11), se observó que la clase Gammaproteobacteria fue la dominante para ambos años, representado entre el 23 al 40% de abundancia relativa para 2018 y entre el 16 al 50% para 2019. Destaca también que la clase Clostridia fue la mejor representada para la condición ECL en ambos años, con un rango entre el 5 y el 8% para 2018; mientras que para 2019, se observó un aumento con una representación de entre el 26 al 45%, mientras que para la condición ELL esta clase no superó el 0.7%.

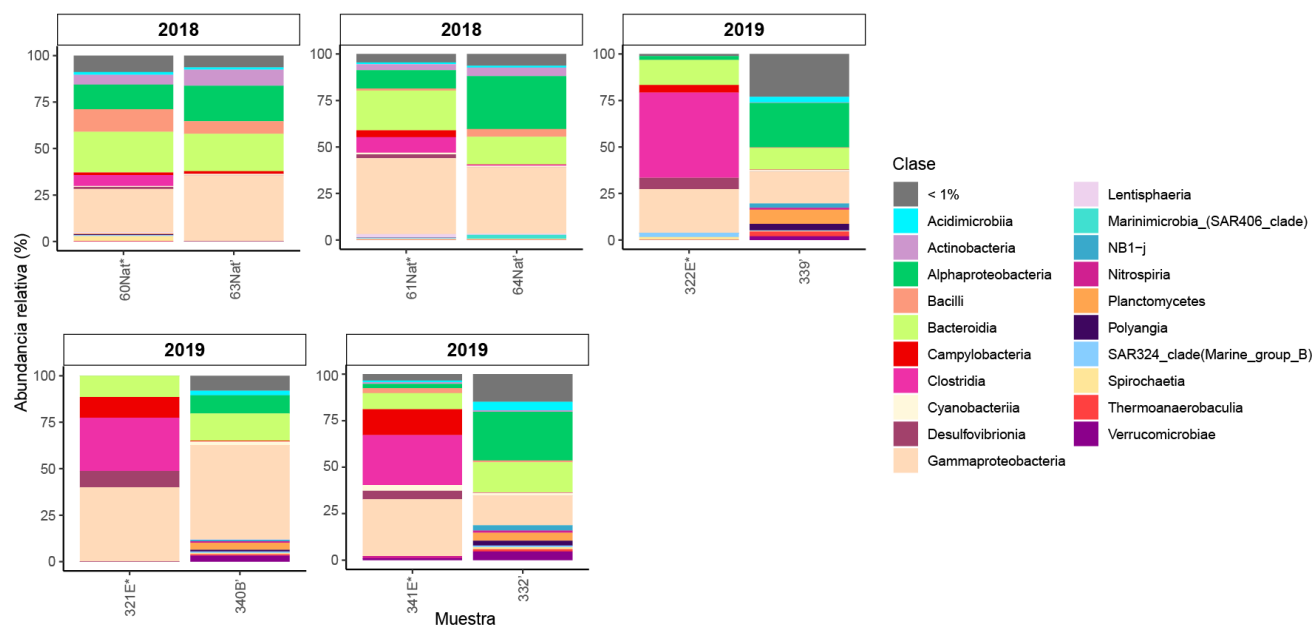


Figura 11. Abundancia relativa de las clases con abundancia mayor a 1% de las colonias con muestras de condición ECL (*) y ELL (').

Respecto al nivel orden (Fig. 12), Flavobacteriales fue el grupo mejor representado para el año 2018 para las condiciones ECL y ELL con una abundancia relativa promedio de 13.26% y 13.45% respectivamente. El segundo grupo mejor representado para la condición ECL para el año 2018 fue Vibrionales con un 11.56% de abundancia relativa promedio; mientras que para la condición

ELL, el orden Pseudomonadales estuvo representado con 9.99% de abundancia relativa promedio.

Para el año 2019, el orden Vibrionales fue el grupo mejor representado para las condiciones ECL (23.65%) y ELL (9.12%). Por otra parte, el orden Peptostreptococcales-Tissierellales fue el segundo mejor representado para la condición ECL, con un 22.42% de abundancia relativa promedio; mientras que para la condición ELL, el orden Flavobacteriales fue el segundo grupo mejor representado, con un 5.87%.

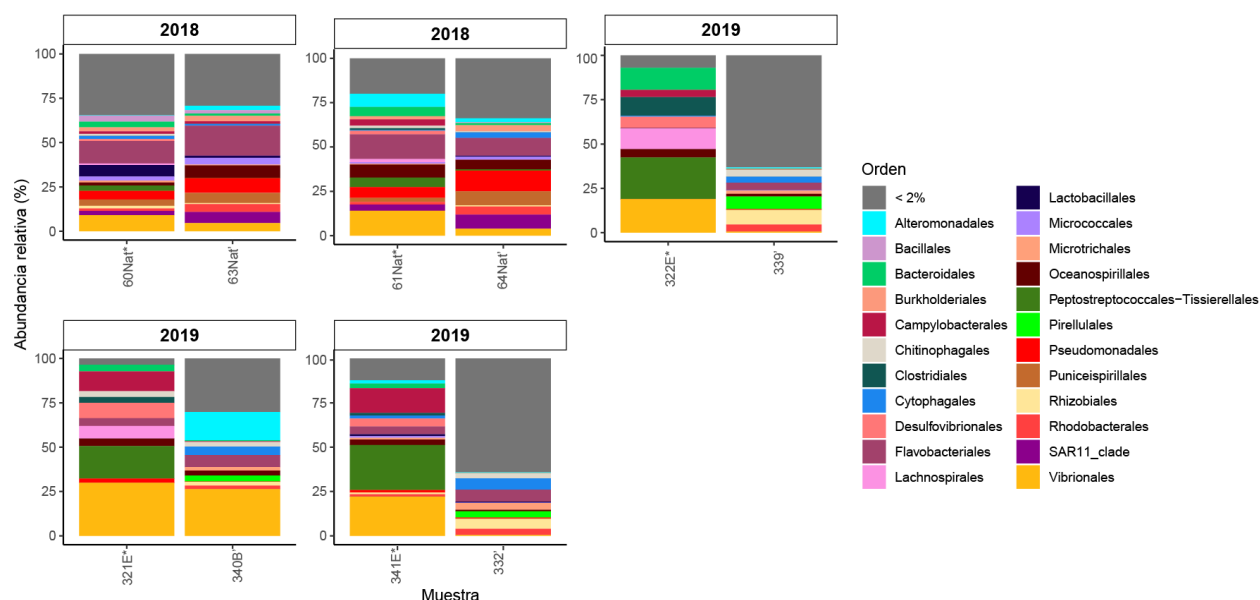


Figura 12. Abundancia relativa de los órdenes con abundancia mayor a 2% de las colonias con muestras de condición ECL (*) y ELL (').

La ordenación de las colonias enfermas con muestras cercanas (ECL) y lejanas a la lesión (ELL) (Fig. 13) a partir del análisis NMDS presentó un estrés de 0.064. En el gráfico de ordenación óptimo se observó una mayor separación de las muestras del año 2019 respecto a las del 2018; sin embargo, para ambos años, las muestras fueron agrupadas respecto a su condición y no respecto a la colonia a la que pertenecen las muestras. El análisis de PERMANOVA arrojó diferencias significativas respecto a la condición de las muestras ($R^2=0.1996$, $p = 0.0009$) y respecto al año ($R^2 = 0.2153$, $p = 0.0019$); pero no se encontraron diferencias significativas respecto a la colonia ($R^2=0.4643$, $p = 0.0629$).

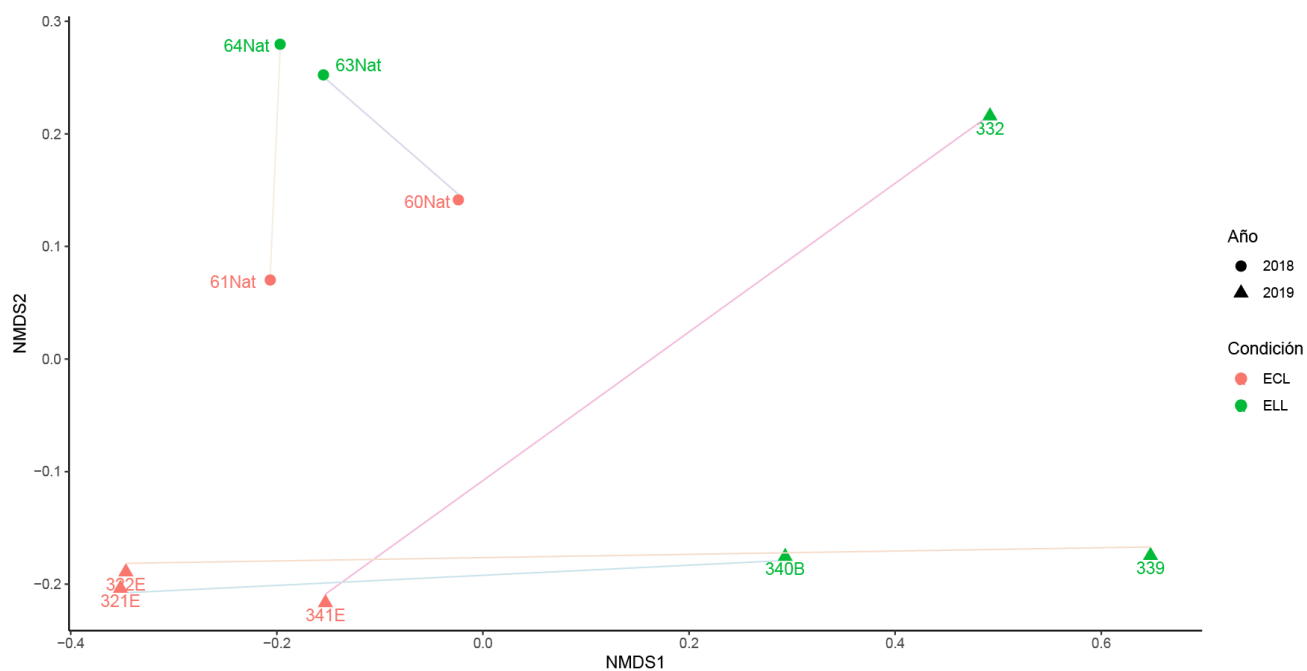


Figura 13. Ordenación mediante un escalamiento multidimensional no-métrico (NMDS) de la estructura de las comunidades microbianas de las muestras de colonias enfermas cercanas (ECL) y lejano a la lesión (ELL) para 2018 y 2019. Las líneas indican las muestras que provienen de una misma colonia.

7.3 Composición taxonómica de las comunidades microbianas

Respecto a la composición taxonómica de las clases de la condición ECL (Fig. 14), las clases más abundantes fueron Gammaproteobacteria con una abundancia relativa promedio de 30.16% para 2018 y 33.64% para 2019; seguido de la clase Bacteroidia con una abundancia de 19.31% y 11.24% para 2018 y 2019 respectivamente, y la clase Clostridia que representó el 11.07% en 2018 y 20.30% para 2019.

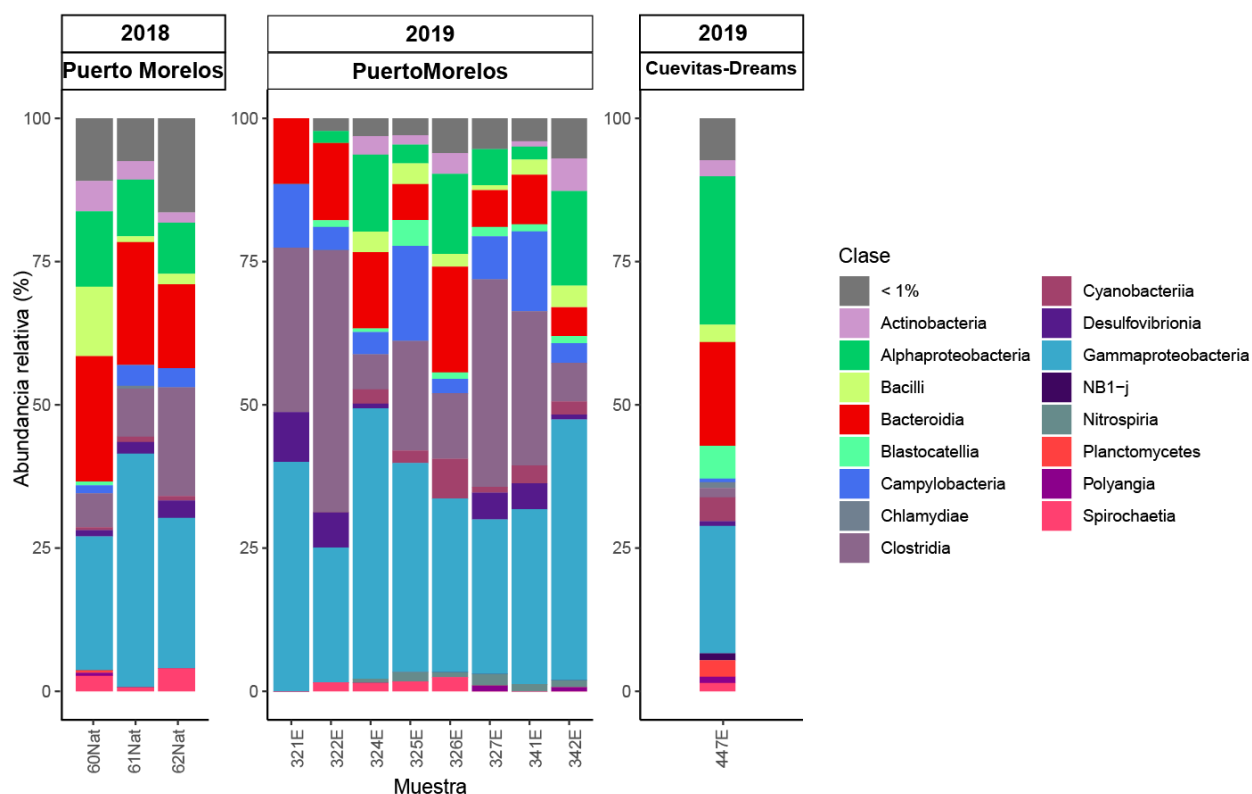


Figura 14. Abundancia relativa de las clases con abundancia mayor al 1% de las muestras de tejido de muestras cercanas a la lesión (ECL).

Para la condición ELL (Fig. 15) las clases más abundantes respecto a su abundancia relativa promedio fueron Gammaproteobacteria (35.51% en 2018 y 27.89% en 2019), Alphaproteobacteria (23.80% para 2018 respecto al 27.89% en 2019), y la clase Bacteroidia con un 17.53% en 2018 y 14.22% en 2019.

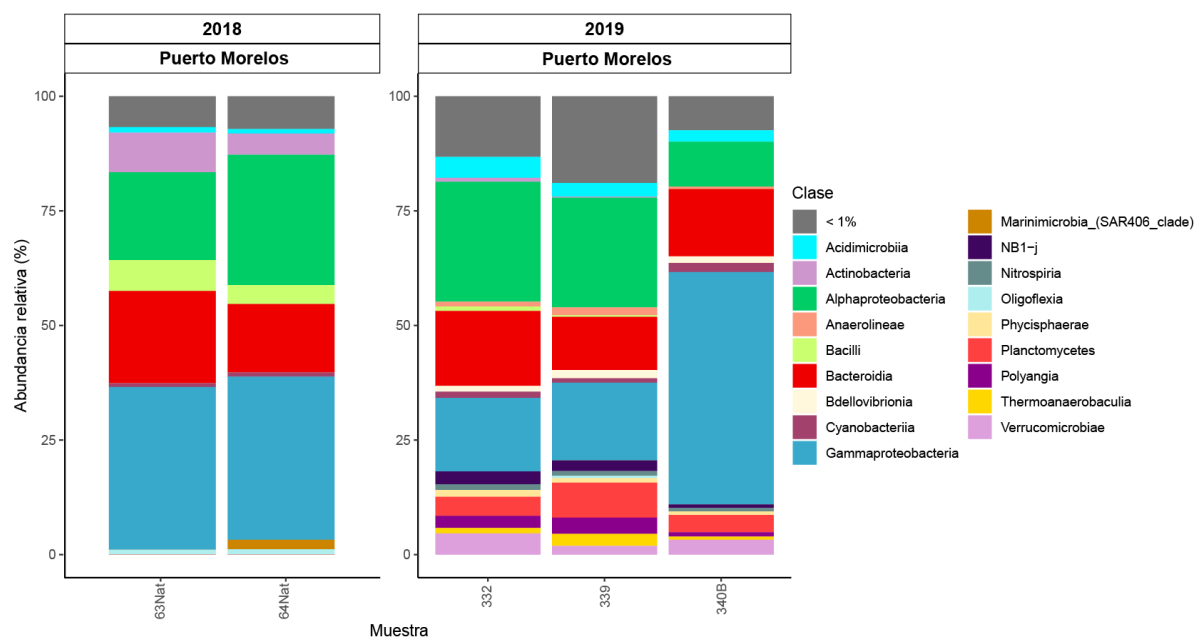


Figura 15. Abundancia relativa de las clases con abundancia mayor al 1% de las muestras de tejido de muestras lejanas a la lesión (ELL).

Para la condición S (Fig. 16), las clases dominantes fueron Gammaproteobacteria, con una representación en 2018 del 26.90% y del 20.30% en 2019; seguido de Alphaproteobacteria con una abundancia relativa promedio de 25.48% en 2018 respecto al 21.39% para 2019 y finalmente la clase Bacteroidia, con una representación de 23.16% en 2018, respecto al 12.51% de 2019.

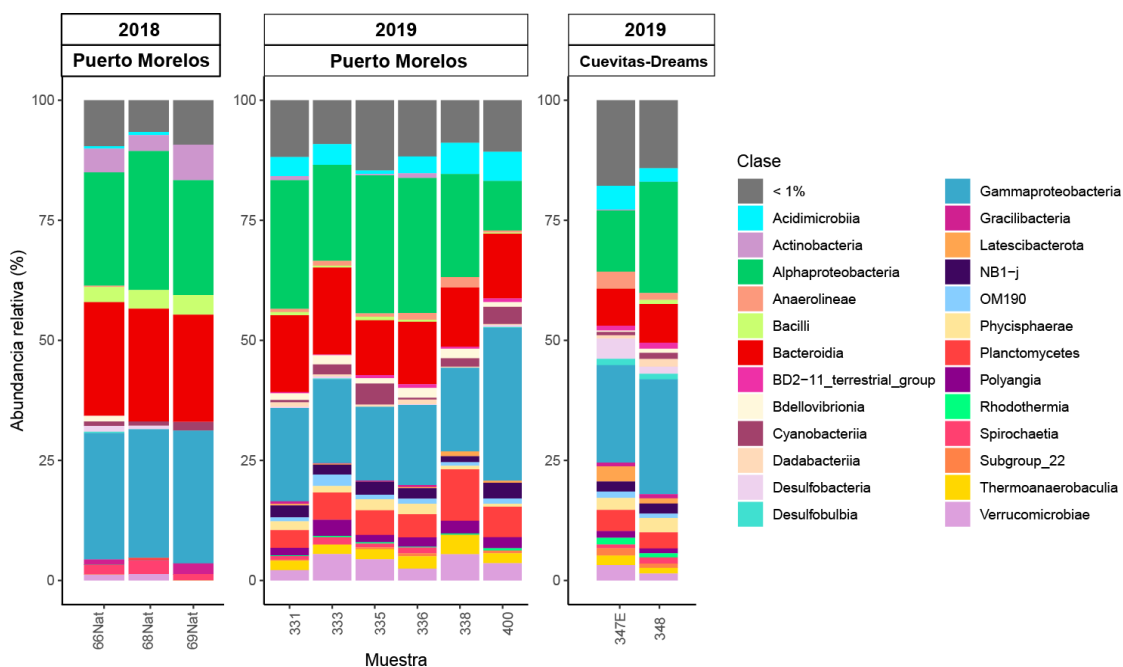


Figura 16. Abundancia relativa de las clases con abundancia mayor al 1% de las muestras de tejido de muestras aparentemente sanas (S).

A nivel orden, los órdenes con mayor abundancia relativa promedio en la condición ECL (Fig. 17) para ambos años fueron Vibrionales (11.67% y 18.66% respectivamente), seguido de Peptostreptococcales-Tissierellales con una abundancia relativa promedio mayor en el año 2019 (14.99%) respecto a 2018 (5.86%). El orden Flavobacteriales representó el 9.95% de los órdenes del año 2018, mientras que el orden Campylobacterales presentó una abundancia de 7.07% en 2019.

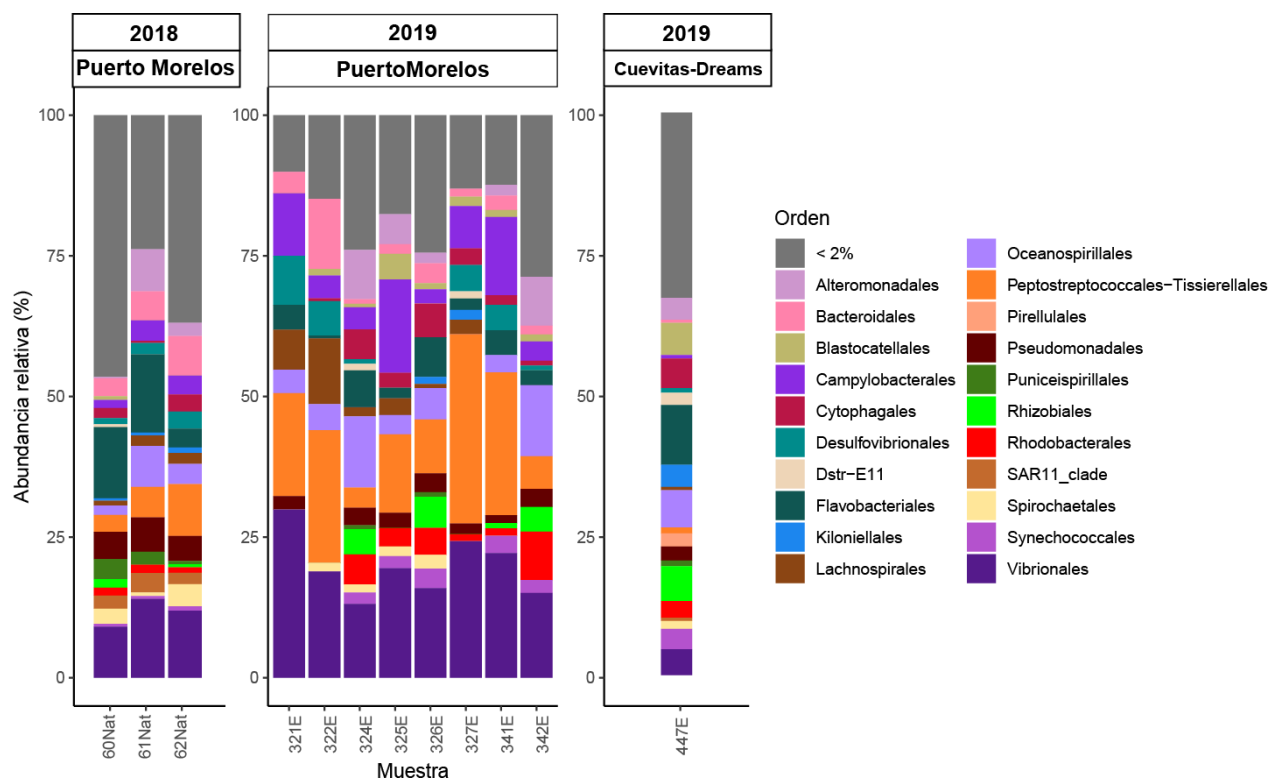


Figura 17. Abundancia relativa de los órdenes con abundancia mayor al 2% de las muestras de tejido de muestras cercanas a la lesión (ECL).

Para la condición ELL (Fig. 18) los órdenes con mayor abundancia relativa en 2018 fueron Flavobacteriales (13.45%), Pseudomonadales (9.99%), mientras que para el año 2019 el orden más abundante fue Vibrionales (9.12%) seguido de Flavobacteriales (5.87%).

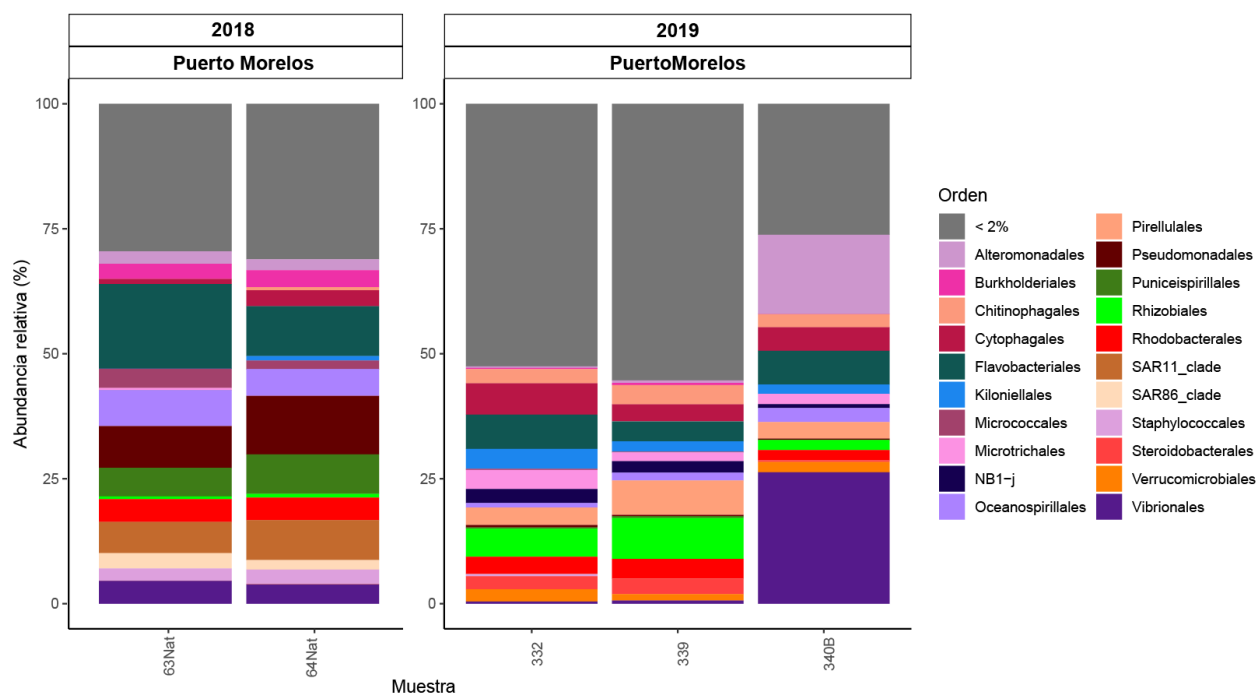


Figura 18. Abundancia relativa de los órdenes con abundancia mayor al 2% de las muestras de tejido de muestras lejanas a la lesión (ELL).

Para la condición S (Fig. 19) los órdenes Flavobacteriales (17.82%) y Pseudomonadales (11.39%) fueron los que presentaron una mayor representación respecto a su abundancia relativa promedio para 2018. Por otra parte, en 2019 los órdenes Pirellulales (4.75%), Rhizobiales (4.54%) y Cytophagales (4.52%) fueron los más abundantes.

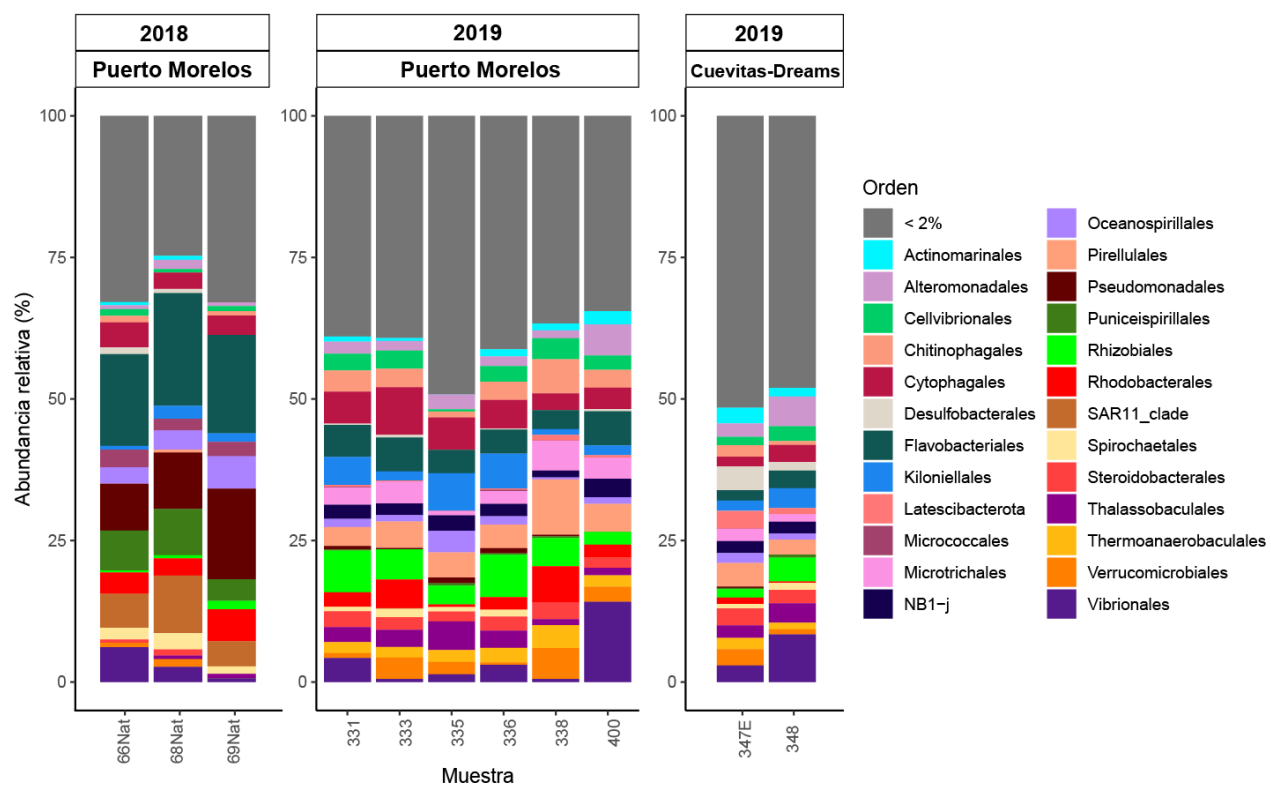


Figura 19. Abundancia relativa de los órdenes con abundancia mayor al 2% de las muestras de tejido de colonias aparentemente sanas (S).

7.4 Análisis de abundancia diferencial

El análisis discriminante lineal con efecto de tamaño (LEfSe) de los ASVs a nivel orden para el año 2018 (Fig. 20) arrojó que existieron 4 taxa diferencialmente abundantes, de los cuales el orden Bacteroidales, Desulfovibrionales y Lachnospirales pertenecieron a la condición ECL, mientras que el orden Thiomicrospirales fue diferencialmente abundante para la condición ELL.

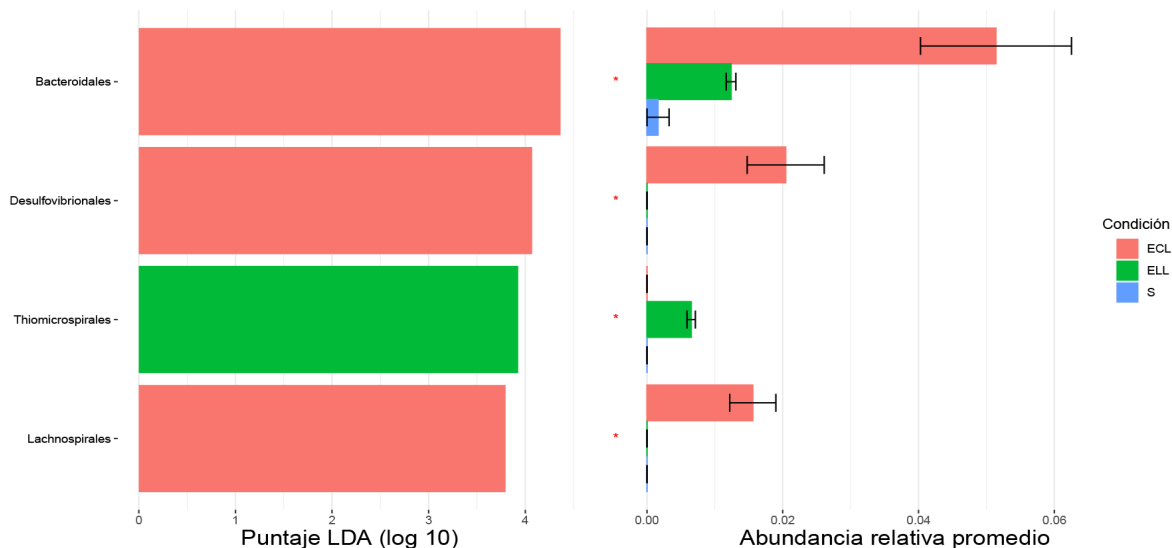


Figura 20. Análisis discriminante lineal (LDA) con efecto de tamaño (LEfSe) de los ASVs a nivel Orden diferencialmente abundantes y su abundancia relativa promedio para las condiciones de salud de las muestras del año 2018. Nivel de significancia: *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

Por otra parte, para 2019 se detectaron 71 taxa diferencialmente abundantes a nivel Orden (Fig. 21) de los cuales los órdenes Peptostreptococcales-Tissierellales, Vibrionales, Campylobacterales, Oceanospirillales, Lachnospirales, Desulfovibrionales, Bacteroidales, Clostridiales y Pseudomonadales fueron clasificados con abundancia diferencial para la condición ECL; mientras que para las condiciones ELL y S se detectaron 28 y 33 taxa respectivamente.

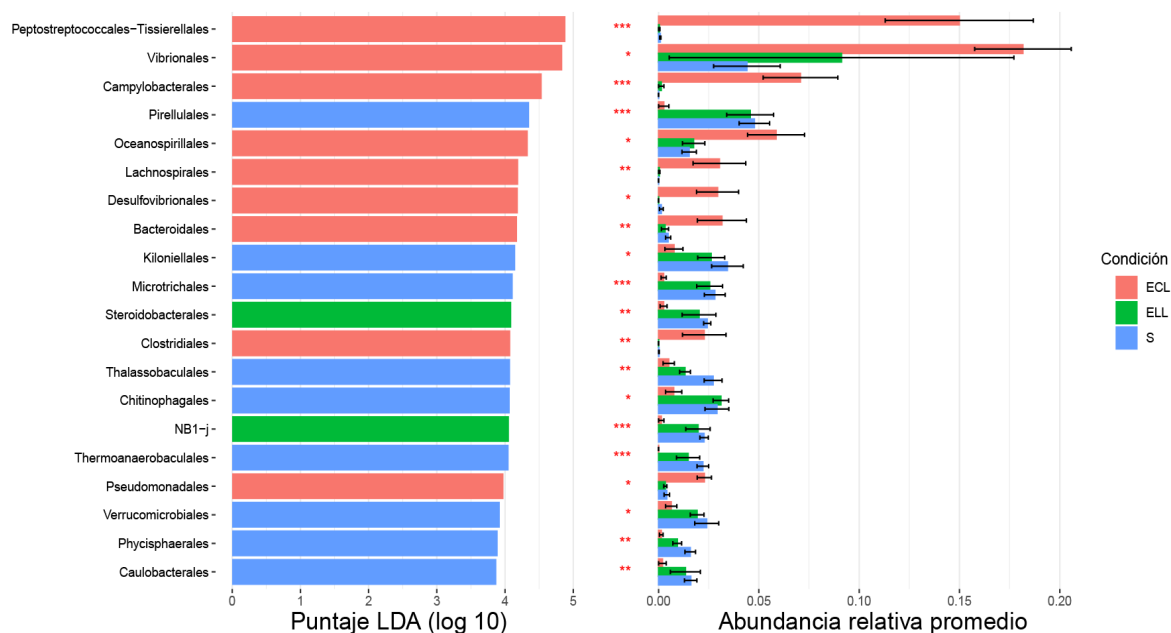


Figura 21. Análisis discriminante lineal (LDA) con efecto de tamaño (LEfSe) de los primeros 20 ASVs a nivel Orden diferencialmente abundantes y su abundancia relativa promedio para las condiciones de salud de las muestras del año 2019. Nivel de significancia: *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

Respecto al nivel género para el año 2018 (Fig. 22), el análisis LEfSe arrojó que se encontraron 12 taxa diferencialmente abundantes, de los cuales los géneros *Roseimarinus*, *Halodesulfovibrio*, *Tepidibacter*, *Halarcobacter*, *Fusibacter*, *Vallitalea*, *Malaciobacter* y *Salinivibrio* fueron clasificados para la condición ECL; mientras que se detectaron los clados SUP05 Cluster y *Pseudobacteriovorax* diferencialmente abundantes para la condición ELL y el clado NS5 para la condición S.

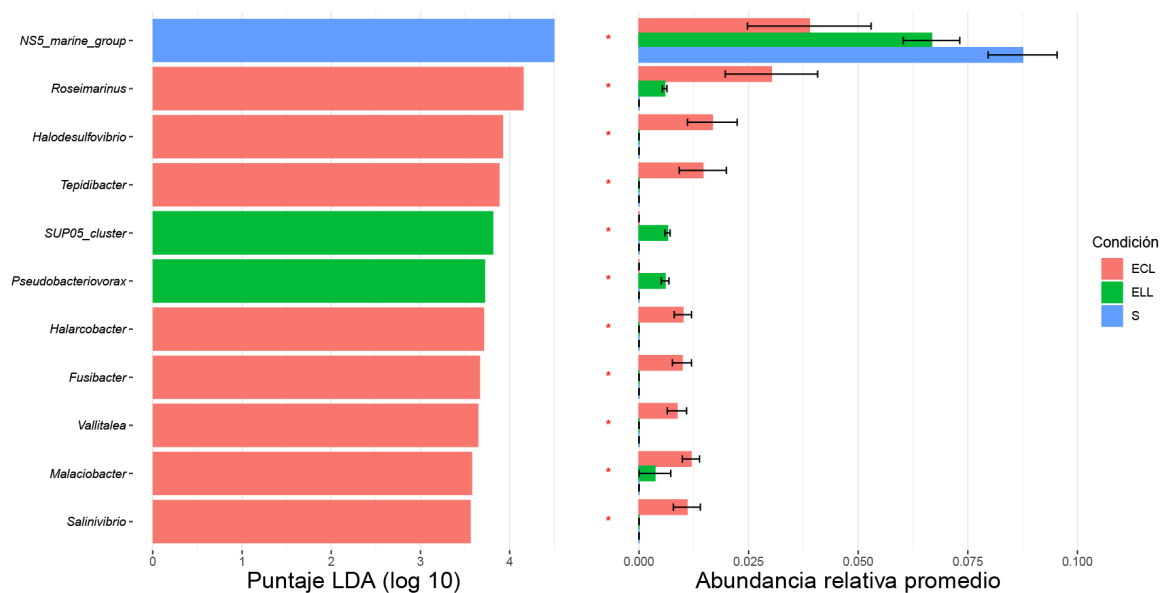


Figura 22. Análisis discriminante lineal (LDA) con efecto de tamaño (LEfSe) de los ASVs a nivel Género diferencialmente abundantes y su abundancia relativa promedio para las condiciones de salud de las muestras del año 2018. Nivel de significancia: *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

Por último, para 2019 el análisis LEfSe a nivel género (Fig. 23), resolvió que existieron 105 taxa diferencialmente abundantes, de los cuales los géneros *Vibrio*, *Tepidibacter*, *Fusibacter*, *Halodesulfovibrio*, JTB215, *Halarcobacter*, *Roseimarinus*, *Salinivibrio*, *Vallitalea*, *Malaciobacter*, *Aquimarina*, *Acinetobacter* y *Salinivibrio* fueron clasificados dentro de la condición ECL; mientras que se detectaron 53 y 40 taxa diferencialmente abundantes para las condiciones ELL y S respectivamente.

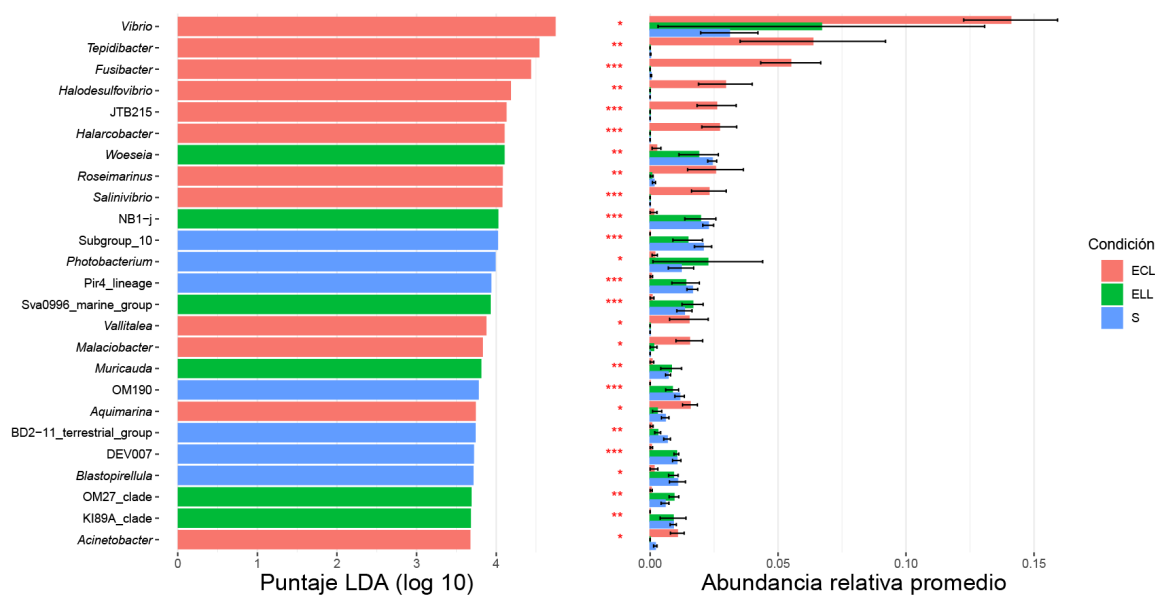


Figura 23. Análisis discriminante lineal (LDA) con efecto de tamaño (LEfSe) de los primeros 25 ASVs a nivel Género diferencialmente abundantes y su abundancia relativa promedio para las condiciones de salud de las muestras del año 2019. Nivel de significancia: *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

7.5 Análisis de predicción funcional

El análisis de predicción funcional para los ASVs en 2018 detectó 47 de 63 funciones reportadas para la base de datos FAPROTAX (Fig. 24), sin embargo, no se encontró algún patrón específico entre los tres tipos de tejido con respecto a su metabolismo. Entre el 33.52 y el 45.36% de los ASVs están clasificados como quimioheterótrofos aeróbicos, seguido de los quimioheterótrofos anaeróbicos con una representación de entre 2.8 y 11.9%. Los ASVs clasificados como fotoautótrofos representaron entre el 2.9 y el 8.17%.

Dentro del ciclo de C, existió un alto porcentaje de ASVs que desarrollan la función de fermentación, particularmente en la condición ECL donde fue representada por entre el 18.19 y 23.82%, mientras que en las condiciones ELL y S estuvo representada por entre el 8.58 y 12.37%.

El porcentaje de ASVs anotados con la función de reducción de nitratos osciló entre el 10.4 y 12.56% para la condición ECL, 10.86 y 11.69% para la condición ELL; y entre 4.92 y 8.41% para la

condición S. La respiración de nitritos y nitratos estuvo bien representada para las condiciones ECL y ELL con entre 1.31 y 3.62% y 2.38 y 6.05% respectivamente.

Respecto al ciclo del azufre, para la condición ECL, la respiración de compuestos sulfurados estuvo representada entre 1.54 y 4.03% de los ASVs, mientras que la respiración de sulfatos presentó un porcentaje de representación entre el 2.08 y 5.11%. Finalmente, la oxidación oscura de H estuvo representada para las condiciones ELL y S con un porcentaje de 1.31 y 2.96%.

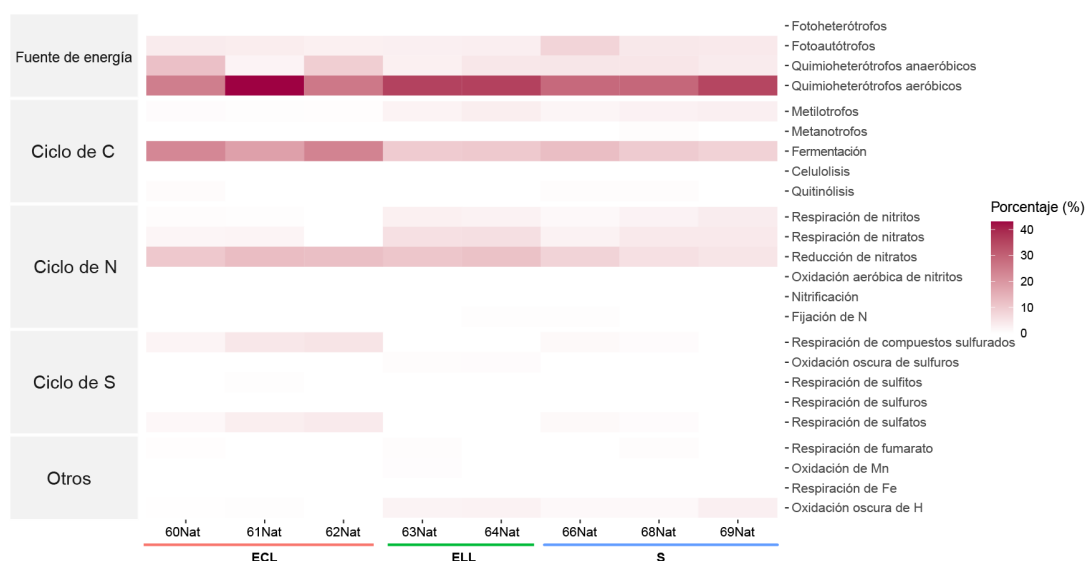


Figura 24. Porcentaje de ASVs anotados con los perfiles metabólicos y funciones relevantes dentro de los ciclos de C, N, y S para los grupos microbianos detectados en 2018 respecto a las tres condiciones de salud: enfermas cerca de la lesión (ECL), enfermas lejos de la lesión (ELL) y aparentemente sanas (S).

Por otra parte, los resultados de la anotación funcional para los ASVs del año 2019 (Fig. 25), se detectaron 57 de 63 funciones potenciales según la base de datos de FAPROTAX, donde el metabolismo quimioheterótrofo aeróbico de igual manera estuvo representado para las tres condiciones de salud variando entre el 23.43 y 47.75% para la condición ECL y entre el 13.74 y el 26.26% para las condiciones ELL y S, con excepción de la muestra 340B la cual denotó un 50.71% de ASVs clasificados con dicho metabolismo. Así mismo, los ASVs clasificados como fotoautótrofos fueron representados en todas las condiciones entre 2.51 y 18.28% para la

condición ECL, mientras que para las condiciones ELL y S fueron representadas entre el 3.49 y 13.89%.

La fermentación fue un proceso con una representación de entre el 6.96 al 41.28% para la condición ECL; y entre el 1.18 a 14.25% para las condiciones ELL y S, resaltando a la muestra 340B con un 28.87% de ASVs clasificados para este proceso.

Dentro del ciclo de nitrógeno, la reducción de nitratos fue la función con mayor porcentaje, entre el 3.51 al 18.42% de representación para la condición ECL, y entre el 0.26 al 9.29 % para las condiciones ELL y S, y un 22.75% para la muestra 340B. Finalmente, la respiración de compuestos sulfurados fue una función bien representada para la condición ECL, reportándose porcentajes de entre 1.15 al 18.61% de ASVs.

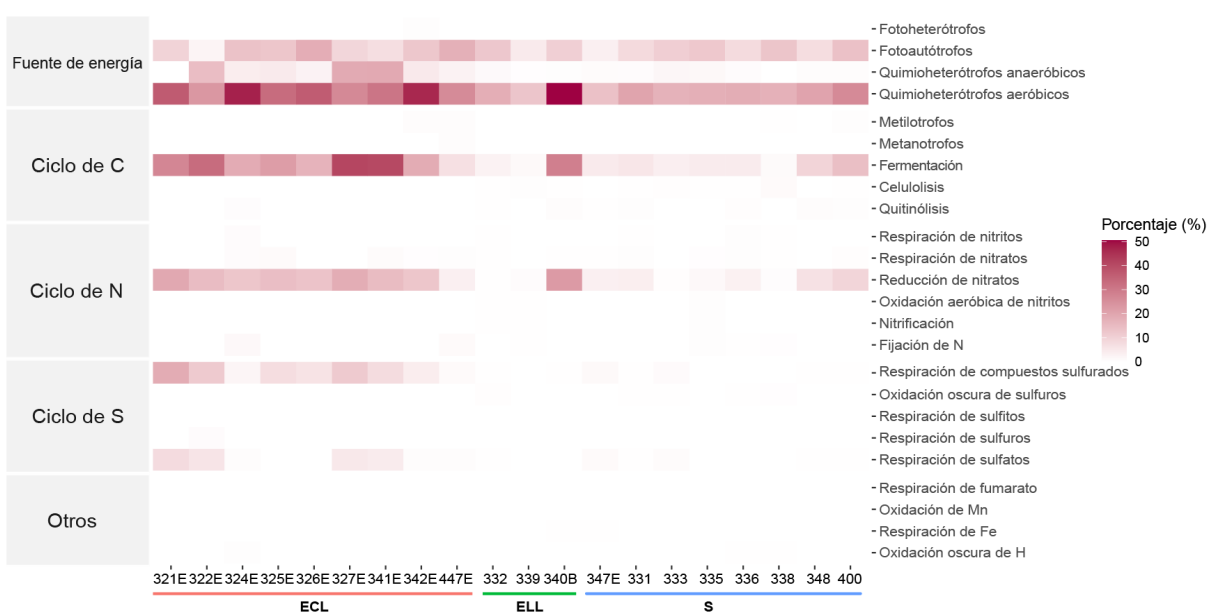


Figura 25. Porcentaje de ASVs anotados con los perfiles metabólicos y funciones relevantes dentro de los ciclos de C, N, y S para los grupos microbianos detectados en 2019 respecto a las tres condiciones de salud: enfermas cerca de la lesión (ECL), enfermas lejos de la lesión (ELL) y aparentemente sanas (S).

8. DISCUSIÓN

8.1 Diversidad de la microbiota

La microbiota de colonias coralinas saludables tiende a estar conformada por un número limitado de grupos microbianos, sin embargo, cuando las colonias son expuestas a condiciones de estrés o eventos de inmunosupresión, el microbioma sufre disrupciones y se facilita la invasión de microorganismos no residentes (McDevitt-Irwin *et al.*, 2017; Meyer *et al.*, 2019).

Los resultados del presente estudio representan un análisis en la composición y estructura del microbioma asociado a la enfermedad en una escala temporal (2018 vs 2019). Respecto a la diversidad alfa, para el año 2018 el número de ASVs observados y el índice de diversidad de Shannon no mostraron diferencias significativas entre las tres condiciones de las muestras. En el año 2019, se detectaron diferencias significativas en las métricas de alfa diversidad entre las condiciones, siendo las muestras tejido cercano a la lesión las que exhibieron los valores más bajos en dichos parámetros.

Existen dos posibles hipótesis que podrían explicar las diferencias observadas en los resultados obtenidos entre 2018 y 2019. La primera hipótesis es que podría haber una gran similitud entre las comunidades microbianas provenientes entre las tres condiciones de las muestras de 2018, posiblemente por haber sido recolectadas durante un estadio inicial de la epidemia de la enfermedad. Modelos teóricos han hipotetizado que podría existir una progresión gradual en la composición de la microbiota, producto de una disrupción de las comunidades microbianas por una infección primaria por agentes patógenos y la posterior colonización de microorganismos oportunistas (Vega-Thurber *et al.*, 2020), por lo que los resultados de este estudio podrían estar reflejando una etapa inicial de un estadio de disbiosis en el tejido de colonias enfermas.

Así mismo, es importante mencionar que, según los censos del estado de salud de los arrecifes coralinos de la región del Caribe mexicano, la enfermedad pudo haberse establecido en dicha zona en el verano de 2018, considerando que los primeros registros de la enfermedad fueron realizados en julio de 2018 (Alvarez-Filip *et al.*, 2019), tan solo a dos meses de la recolecta de muestras de dicho año. Por otra parte, el 2019 ha sido considerado como el estadio más activo

de la epidemia de la enfermedad en esta región respecto a la mortalidad y a la incidencia de la enfermedad (Estrada-Saldívar *et al.*, 2021).

La segunda hipótesis es que el número de muestras (N=8) obtenido en 2018 pudo no haber sido representativo y suficiente para denotar diferencias entre las comunidades microbianas entre los diferentes tipos de muestra como en 2019 (N= 20). Es reconocido que las métricas de diversidad y su comparación tienden a ser sensibles ante diversos factores técnicos entre los que se encuentran el número de muestras, la profundidad de secuenciación, pudiendo afectar la estimación del número de microorganismos presentes en una muestra (Hernandez-Agreda *et al.*, 2017).

Con respecto a las diferencias encontradas entre las tres condiciones de las muestras de 2019, se detectaron los valores más altos alfa diversidad en el tejido lejano a la lesión y el proveniente de colonias aparentemente sanas.

Los resultados obtenidos en el presente estudio contrastan con un estudio previo (Clark *et al.*, 2021), donde se evaluaron las diferencias de dichas métricas en colonias afectadas por esta enfermedad en la misma especie en la región del Cayo Sur de los arrecifes de Florida durante los meses de abril y junio de 2018, durante una fase epidémica donde se observaron colonias con lesiones activas. En dicho estudio, se encontró que el microbioma del tejido cercano a la lesión tenía valores más altos de riqueza y de diversidad de Shannon respecto al tejido lejano a la lesión y de colonias aparentemente sanas.

Así mismo, el patrón de aumento en la riqueza y diversidad de los taxa microbianos a las lesiones provocadas por patologías ha sido también reportado para colonias de *P. strigosa* afectadas por la enfermedad de la banda negra, resultado de la disrupción del microbioma y de la colonización de patógenos oportunistas (Meyer *et al.*, 2016), siendo este un escenario común cuando las colonias de coral experimentan condiciones de estrés y enfermedades (MacKnight *et al.*, 2021; Huntley *et al.*, 2022).

8.2 Estructura y composición de la microbiota

Los resultados del ordenamiento NMDS arrojaron una agrupación de las muestras respecto a su condición para ambos años (Fig. 10). Dichos resultados fueron fundamentados también por el análisis de varianza multivariante permutacional, el cual arrojó que existieron diferencias significativas respecto al año y respecto a la condición de las muestras. Respecto a la condición, se formaron dos grupos: el primero conteniendo exclusivamente a la condición ECL y el segundo grupo incluyendo a las condiciones ELL y S. De forma congruente, otro estudio en la misma especie de coral en Florida no encontró diferencias entre colonias aparentemente sanas y tejido lejano a la lesión en colonias enfermas cuando se analizó la estructura de las comunidades microbianas, pero sí difirieron en la estructura de las comunidades asociadas al tejido cercano a la lesión (Clark *et al.*, 2021).

Las comunidades microbianas asociadas a corales son dinámicas en cuanto a su composición, riqueza y abundancia, y responden ante estímulos externos como a los cambios de temperatura del océano, aumento en el flujo de nutrientes, disminución en el pH del océano (Zaneveld *et al.*, 2016), así como a factores intrínsecos como el tamaño de la colonia (Hernandez-Agreda *et al.*, 2017). Sin embargo, dichos factores ambientales no fueron considerados y por consiguiente no fue posible hacer aseveraciones al respecto.

En cuanto a la dinámica en la composición y estructura de las comunidades microbianas asociadas a la enfermedad de pérdida de tejido en los análisis del microbioma realizados en la región de Florida, se han encontrado evidencias de que la afectación al microbioma se extiende en toda la colonia, independientemente de la distancia con el frente de lesión (Clark *et al.*, 2021). Así mismo, estudios histopatológicos han denotado que la enfermedad afecta a los tejidos de forma generalizada en toda la colonia (Eaton *et al.*, 2021).

Dentro del presente estudio fue posible denotar la dinámica en la composición de las comunidades microbianas asociadas a la enfermedad a nivel intracolonia. Se encontraron diferencias respecto a la estructura de la microbiota en el análisis de ordenación NMDS, donde se observó que las muestras de tejido provenientes de una misma colonia fueron agrupadas respecto a su condición y no respecto a la colonia de origen. Dicha agrupación también fue

soportada por el análisis de varianza permutacional, sugiriendo probablemente que la afectación de la enfermedad sea más bien localizada y no de forma sistémica para la especie, como lo reportado para Florida.

8.3 Composición taxonómica de las comunidades microbianas

De forma general, la composición taxonómica de las comunidades microbianas según su abundancia relativa promedio señala a la clase Gammaproteobacteria como el grupo predominante para las tres condiciones de salud en 2018 y para las condiciones ECL y ELL en 2019. La clase Bacteroidia fue el segundo grupo más predominante para la condición ECL y el tercero para las condiciones ELL y S; mientras que ocupó este mismo lugar para las tres condiciones de 2019.

La clase Gammaproteobacteria ha sido reportada como parte del microbioma núcleo en seis especies coralinas del Caribe, incluyendo a *P. strigosa* (Chu y Vollmer, 2016). Dentro de este grupo, el orden Vibrionales fue el mejor representado para la condición ECL en ambos años. Algunos miembros de este orden han sido clasificados como patógenos oportunistas en enfermedades coralinas como el complejo de enfermedades de la banda blanca y la plaga blanca (Sweet *et al.*, 2012).

Dentro de esta clase, el orden Pseudomonadales fue uno de los mejores representados para las condiciones ELL y S. Este orden ha sido reportado con anterioridad como parte del microbioma residente de corales saludables en la región del Caribe (Chu y Vollmer, 2016), pero también ha sido detectado como un grupo asociado a la plaga blanca que afecta a corales en la misma región (Sunagawa *et al.*, 2009).

En la clase Bacteroidia, el orden Flavobacteriales fue la taxa más predominante para la condición ECL de ambos años. Un análisis de la composición del microbioma coralino, particularmente del género *Acropora* en el Caribe ha detectado que en las colonias sometidas a estrés térmico exhiben un enriquecimiento de Flavobacteriales (McDevitt-Irwin *et al.*, 2017). Así mismo, este orden ha sido reportado como un grupo dominante en colonias de *A. palmata* y *A.*

cervicornis afectados con la enfermedad de la banda blanca en el Caribe (Gignoux-Wolfsohn y Vollmer, 2015).

Clostridia fue la segunda clase mejor representada respecto a su abundancia relativa promedio para la condición ECL en 2019 y el tercero para esta condición en 2018. Estudios previos respecto a la composición de la microbiota asociada a la enfermedad de pérdida de tejido en corales pétreos en la región de los arrecifes de Florida se ha encontrado que la clase Clostridia es la mejor representada en tejido a las lesiones (Clark *et al.*, 2021). El orden Peptostreptococcales-Tissierellales fue el predominante dentro de esta clase para la condición ECL. Este orden ha sido observado como dominante en el tejido de colonias de *Orbicella faveolata* con lesiones provocadas por la enfermedad de la banda amarilla (Closek *et al.*, 2014).

Por otra parte, la clase Alphaproteobacteria fue la segunda mejor representada en las condiciones ELL y S para ambos años. Este grupo es ampliamente diverso y bien representado en los microbiomas coralinos especies de coral a lo largo del Caribe (Chu y Vollmer, 2016), además resulta importante destacar que dentro de esta clase se encuentra el mayor número de taxa asociados a las lesiones de la enfermedad de pérdida de tejido en corales pétreos (Studivan *et al.*, 2022).

8.4 Análisis de abundancia diferencial

Para el año 2018, se detectaron los órdenes Bacteroidales, Desulfovibrionales y Lachnospirales; mientras que para el año 2019, se detectaron los órdenes Peptostreptococcales-Tissierellales, Vibrionales, Campylobacterales, Oceanospirillales, Clostridiales y Pseudomonadales como taxa diferencialmente abundantes para la condición ECL. Estos órdenes han sido detectados consistentemente como diferencialmente abundantes en el tejido aledaño a la lesión en las colonias afectadas por la enfermedad (Becker *et al.*, 2021; Studivan *et al.*, 2022).

A nivel género, *Roseimarinus*, *Halodesulfovibrio*, *Tepidibacter*, *Halarcobacter*, *Fusibacter*, *Valitalea*, *Malaciobacter* y *Salinivibrio* fueron detectados como diferencialmente abundantes para la condición ECL en el año 2018; mientras que para 2019, además de los géneros ya

mencionados, *Vibrio*, *Aquimarina*, *Acinetobacter* y el clado JTB215 fueron los taxa diferencialmente abundantes. Dichos géneros así mismo han sido reportados de forma constante por estar asociados al tejido cercano a la lesión incluso en la región de las costas de Florida y en otras especies de corales (Rosales *et al.*, 2020; Clark *et al.*, 2021).

Una de las características de nivel histopatológico de la enfermedad de pérdida de tejido de corales pétreos es la afección de células del hospedero y de las células de los endosimbiontes (Landsberg *et al.*, 2020). En estos estudios, se ha denotado la ausencia de células bacterianas aledañas a dichas células afectas en el tejido enfermo, por lo que se ha hipotetizado que el papel de estos grupos bacterianos asociados a las colonias coralinas afectadas podría ser secundario. La presencia constante de dichos grupos en el tejido afectado y la naturaleza oportunista de algunos de estos taxa podrían estar relacionados con el desarrollo de la enfermedad.

8.5 Análisis de predicción funcional

El análisis de predicción para encontrar los perfiles funcionales putativos de los microorganismos es una herramienta muy útil para realizar estudios de prospección funcional. Uno de los acercamientos para realizar la predicción funcional es la base de datos de FAPROTAX, la cual permite extrapolar la identidad taxonómica de los ASVs presentes en una muestra para conocer los grupos metabólicos y potenciales funciones ecológicas de microorganismos reportadas en la literatura (Louca *et al.*, 2016).

Los resultados del análisis arrojaron que los ASVs fueron clasificados principalmente como quimioheterótrofos aeróbicos para ambos años, independientemente de su condición. Este metabolismo tiene gran representación entre los grupos taxonómicos en el océano, siendo las clases Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria y Bactereoidetes los grupos que mayor aportan a dicha prevalencia (Sun y Xu, 2021).

Interesantemente, el grupo funcional clasificado como “respiración de sulfatos” estuvo representado para las muestras de ECL entre el 1.54 al 4.03% de ASVs en 2018; y entre 0.71 al

7.89% en 2019. Este grupo funcional está bien representado según la base de datos de FAPROTAX por los miembros del género *Halodesulfovibrio*, el cual fue detectado como una taxa con abundancia diferencial para la condición ECL en ambos años. A este género se le atribuye la reducción de sulfatos y podría estar relacionado con la degradación del tejido coralino, posiblemente relacionado con el papel que funge *Desulfovibrio* en la enfermedad de banda negra (Zhang *et al.*, 2021).

El presente estudio representa un primer esfuerzo para el seguimiento de la diversidad de las comunidades bacterianas y la clasificación funcional de los ASVs asociados a la enfermedad de pérdida de tejido en corales pétreos en el Caribe Mexicano. Aunque se detectaron diferencias en términos de diversidad entre años en los tipos de muestras analizadas, no se detectaron diferencias significativas entre los grupos funcionales entre las tres condiciones para ambos años. Para poder dilucidar las funciones es necesario realizar estudios complementarios que involucren técnicas ómicas y así poder aportar en la descripción del repertorio funcional de las comunidades microbianas.

9. CONCLUSIONES

- Las comunidades microbianas asociadas a *Pseudodiploria strigosa* presentaron diferencias en su composición respecto a la condición de salud de la colonia y al año de muestreo. Para 2018, los órdenes mejor representados fueron Flavobacteriales para la condición ECL y S, mientras que Pseudomonadales para la condición ELL. Para 2019, el orden Vibrionales fue el mejor representado para las condiciones ECL y ELL, mientras que el orden Pirelullales fue el mejor representado para la condición S.
- Se observaron diferencias en la estructura de las comunidades microbianas de las muestras de la condición ECL con respecto a las condiciones ELL y S en ambos años. Los géneros que presentaron abundancias diferenciales significativas y que podrían explicar la diferencia en estructura para el tejido enfermo cercano a la lesión (ECL) fueron *Roseimarinus*, *Halodesulfovibrio*, *Tepidibacter*, *Halarcobacter*, *Fusibacter*, *Valitallea*, *Malaciobacter* y *Salinivibrio* para 2018; mientras que para 2019, adicionalmente se detectaron los géneros *Vibrio*, *Aquimarina*, *Acinetobacter* y el clado JTB215.
- Se identificaron 47 y 53 perfiles funcionales potenciales para 2018 y 2019 respectivamente. A pesar de que se observaron diferencias en estructura y composición de las comunidades microbianas entre años y condiciones de las muestras, no se detectó dicho efecto en los perfiles funcionales potenciales evaluados, lo que podría sugerir una equivalencia funcional del microbioma entre las colonias aparentemente sanas y aquellas afectadas por la enfermedad.

10. LITERATURA CITADA

- Aeby, G.S., Ushijima, B., Campbell, J.E., Jones, S., Williams, G.J., Meyer, J.L., Häse, C. y Paul, V.J. (2019). Pathogenesis of a tissue loss disease affecting multiple species of corals along the Florida Reef Tract. *Frontiers in Marine Science*, 6. doi: 10.3389/fmars.2019.00678.
- Ainsworth, T.D., Kramasky-Winter, E., Loya, Y., Hoegh-Guldberg, O. y Fine, M. (2007). Coral disease diagnostics: what's between a plague and a band? *Applied and Environmental Microbiology*, 73(3): 981-992. doi: 10.1128/AEM.02172-06.
- Alvarez-Filip, L., Côté, I.M., Gill, J.A., Watkinson, A.R. y Dulvy, N.K. (2011). Region-wide temporal and spatial variation in Caribbean reef architecture: is coral cover the whole story? *Global Change Biology*, 17(7): 2470-2477. doi: 10.1111/j.1365-2486.2010.02385.x.
- Alvarez-Filip, L., Estrada-Saldívar, N., Pérez-Cervantes, E., Molina-Hernández, A. y González-Barrios, F.J. (2019). A rapid spread of the stony coral tissue loss disease outbreak in the Mexican Caribbean. *PeerJ*, 7:e8069. doi: 10.7717/peerj.8069.
- Ardisson, P., May-Kú, M., Herrera-Dorantes, M. y Arellano-Guillermo, A. (2011). El Sistema Arrecifal Mesoamericano-México: consideraciones para su designación como Zona Marítima Especialmente Sensible. *Hidrobiológica*, 21(3): 261-280. Disponible en: <https://www.scielo.org.mx/pdf/hbio/v21n3/v21n3a5.pdf> [Consulta: 3 enero 2022].
- Aronson, R., Bruckner, A., Moore, J., Precht, B. y Weil, E. (2008). *Diploria strigosa*: The IUCN Red List of Threatened Species. Disponible en: <https://www.iucnredlist.org/species/133155/3605234> [Consulta: 3 enero 2022].
- Aronson, R.B. y Precht, W.F. (2001). White-band disease and the changing face of Caribbean coral reefs. *Hydrobiologia* 460: 25-38. doi: 10.1023/A:1013103928980.
- Becker, C., Brandt, M., Miller, C. y Apprill, M. (2021). Microbial bioindicators of stony coral tissue loss disease identified in corals and overlying waters using a rapid field-based sequencing approach. *Environmental Microbiology* 24(3): 1166-1182. doi: 10.1111/1462-2920.15718.
- Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M.C.C., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Corral, G.H., Kazou, M., Kinkel, L., Lange, L., Lima, N., Loy, A., Macklin, J.A., Maguin, E., Mauchline, T., McClure, R., Mitter, B., Ryan, M., Sarand, I., Smidt, H., Schelkle, B., Roume, H., Kiran, G.S., Selvin, J., Souza, R.S.C., van Overbeek, L., Singh, B.K., Wagner, M., Walsh, A., Sessitsch, A. y Schloter, M. (2020). Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*, 8: 103. doi: 10.1186/s40168-020-00875-0.
- Bourne, D.G., Garren, M., Work, T.M., Rosenberg, E., Smith, G.W. y Harvell, C.D. (2009). Microbial disease and the coral holobiont. *Trends in Microbiology* 17(12):554-562. doi: 10.1016/j.tim.2009.09.004.
- Bourne, D.G., Morrow, K.M. y Webster, N.S. (2016). Insights into the coral microbiome: underpinning the health and resilience of reef ecosystems. *Annual Review of Microbiology*, 70(1): 317-340. doi: 10.1146/annurev-micro-102215-095440.
- Bourne, D.G., Smith, H.A. y Page, C.A. (2022). Diseases of scleractinian corals. En: Rowley A.F, Coates C.J, Whitten M.W. (eds). *Invertebrate pathology*. Oxford University Press, Oxford, pp 77-108.
- Breitschwerdt, E.B., Linder, K.L., Day, M.J., Maggi, R.G., Chomel, B.B. y Kempf, V.A.J. (2013). Koch's postulates and the pathogenesis of comparative infectious disease causation associated with Bartonella species. *Journal of Comparative Pathology*, 148:115-125. doi: 10.1016/j.jcpa.2012.12.003.

- Bruno, J.F., Petes, L.E., Harvell, C.D. y Hettinger, A. (2003). Nutrient enrichment can increase the severity of coral diseases. *Ecology Letters*, 6(12): 1056-1061. doi: 10.1046/j.1461-0248.2003.00544.x.
- Bruno, J.F., Selig, E.R., Casey, K.S., Page, C.A., Willis, B.L., Harvell, C.D., Sweatman, H. y Melendy, A.M. (2007). Thermal stress and coral cover as drivers of coral disease outbreaks. *PLoS Biology*, 5(6): 1220-1227. doi: 10.1371/journal.pbio.0050124.
- Brusca, R.C., Moore, W. y Shuster, S.M. (2016). *Invertebrates*. 3ª ed. Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland.
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A. y Holmes, S.P. (2016). DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7): 581-583. doi: 10.1038/nmeth.3869.
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunencko, T., Zaneveld, J. y Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* 7:335-336. doi: 10.1038/nmeth.f.303.
- Cesar, H., Burke, L. y Pet-Soede, L. (2003). *The economics of worldwide coral reef degradation*. Disponible en: <https://www.icran.org/wp-content/uploads/2022/11/cesardegradationreport.pdf>. [Consulta: 12 enero 2022].
- Chu, N.D. y Vollmer, S.V. (2016). Caribbean corals house shared and host-specific microbial symbionts over time and space. *Environmental Microbiology Reports*, 8(4): 493-500. doi: 10.1111/1758-2229.12412.
- Clark, A.S., Williams, S.D., Maxwell, K., Rosales, S.M., Huebner, L.K., Landsberg, J.H., Hunt, J.H. y Muller, E.M. (2021). Characterization of the microbiome of corals with stony coral tissue loss disease along Florida's coral reef. *Microorganisms*, 9: 2181. doi: 10.3390/microorganisms9112181.
- Closek, C.J., Sunagawa, S., DeSalvo, M.K., Piceno, Y.M., DeSantis, T.Z., Brodie, E.L., Weber, M.X., Voolstra, C.R., Andersen, G.L. y Medina, M. (2014). Coral transcriptome and bacterial community profiles reveal distinct yellow band disease states in *Orbicella faveolata*. *The ISME Journal*, 8(12): 2411-2422. doi: 10.1038/ismej.2014.85.
- Collin, R., Díaz, M.C., Norenburg, J., Rocha, R.M., Sánchez, J.A., Schulze, A., Schwartz, M. y Valdés, A. (2005). Photographic identification guide to some common marine invertebrates of Bocas del Toro, Panama. *Caribbean Journal of Science*, 41 (3):638–707. Disponible en: https://repository.si.edu/bitstream/handle/10088/11180/iz_collin_etal2005.pdf?sequence=1&isAllowed=y [Consulta 15 enero 2022].
- Dittami, S.M., Arboleda, E., Auguet, J.C., Bigalke, A., Briand, E., Cárdenas, P., Cardini, U., Decelle, J., Engelen, A.H., Eveillard, D., Gachon, C.M.M., Griffiths, S.M., Harder, T., Kayal, E., Kazamia, E., Lallier, F.H., Medina, M., Marzinelli, E.M., Morganti, T.M., Núñez-Pons, L., Prado, S., Pintado, J., Saha, M., Selosse, M.A., Skillings, D., Stock, W., Sunagawa, S., Toulza, E., Vorobev, A., Leblanc, C. y Not, F. (2021). A community perspective on the concept of marine holobionts: current status, challenges, and future directions. *PeerJ*, 9: e10911. doi: 10.7717/peerj.10911.
- Eaton, K.R., Landsberg, J.H., Kiryu, Y., Peters, E.C. y Muller, E.M. (2021). Measuring stony coral tissue loss disease induction and lesion progression within two intermediately susceptible

- species, *Montastraea cavernosa* and *Orbicella faveolata*. *Frontiers in Marine Science*, 8. doi: 10.3389/fmars.2021.717265.
- Estrada-Saldívar, N., Molina-Hernández, A., Pérez-Cervantes, E., Medellín-Maldonado, F., González-Barrios, F.J. y Álvarez-Filip, L. (2020). Reef-scale impacts of the stony coral tissue loss disease outbreak. *Coral Reefs*, 39(4): 861-866. doi: 10.1007/s00338-020-01949-z.
- Estrada-Saldívar, N., Quiroga-García, B.A., Pérez-Cervantes, E., Rivera-Garibay, O.O. y Álvarez-Filip, L. (2021). Effects of the stony coral tissue loss disease outbreak on coral communities and the benthic composition of Cozumel reefs. *Frontiers in Marine Science*, 8. doi: 10.3389/fmars.2021.632777.
- Falkow, S. (1988). Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity. *Clinical Infectious Diseases*, 10 (Supplement 2): S274-S276. doi: 10.1093/cid/10.Supplement_2.S274.
- Gardner, T.A., Côté, I.M., Gill, J.A., Grant, A. y Watkinson, A.R. (2003). Long-term region-wide declines in Caribbean corals. *Science*, 301(5635): 958-960. doi: 10.1126/science.1086050.
- Gignoux-Wolfsohn, S.A. y Vollmer, S.V. (2015). Identification of candidate coral pathogens on white band disease-infected staghorn coral. *PLOS ONE*, 10(8): e0134416. doi: 10.1371/journal.pone.0134416.
- Glasl, B., Bourne, D.G., Frade, P.R., Thomas, T., Schaffelke, B. y Webster, N.S. (2019). Microbial indicators of environmental perturbations in coral reef ecosystems. *Microbiome*, 7(1). doi: 10.1186/s40168-019-0705-7.
- González-Rivero, M., Harborne, A.R., Herrera-Reveles, A., Bozec, Y.M., Rogers, A., Friedman, A., Ganase, A. y Hoegh-Guldberg, O. (2017). Linking fishes to multiple metrics of coral reef structural complexity using three-dimensional technology. *Scientific Reports*, 7(1): 13965. doi: 10.1038/s41598-017-14272-5.
- Hawinkel, S., Kerckhof, F.M., Bijmens, L. y Thas, O. (2019). A unified framework for unconstrained and constrained ordination of microbiome read count data. *PLOS ONE*, 14(2): e0205474. doi: 10.1371/journal.pone.0205474.
- Hernández-Agreda, A., Gates, R.D. y Ainsworth, T.D. (2017). Defining the core microbiome in corals' microbial soup. *Trends in Microbiology*, 25(2): 125-140. doi: 10.1016/j.tim.2016.11.003.
- Hoeksema, B. y Cairn, S. (2021). *WoRMS - World Register of Marine Species - Pseudodiploria strigosa* (Dana, 1846). Disponible en: <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=718718>. [Consultado: 10 enero 2022].
- Huntley, N., Brandt, M.E., Becker, C.C., Miller, C.A., Meiling, S.S., Correa, A.M.S., Holstein, D.M., Muller, E.M., Mydlarz, L.D., Smith, T.B. y Apprill, A. (2022). Experimental transmission of stony coral tissue loss disease results in differential microbial responses within coral mucus and tissue. *ISME Communications*, 2(1): 46. doi: 10.1038/s43705-022-00126-3.
- Katoh, K. y Standley, D.M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4): 772-780. doi: 10.1093/molbev/mst010.
- Ketchum, R.N., Smith, E.G., Vaughan, G.O., McParland, D., Al-Mansoori, N., Burt, J.A. y Reitzel, A.M. (2021). Unraveling the predictive role of temperature in the gut microbiota of the sea urchin *Echinometra* sp. across spatial and temporal gradients. *Molecular Ecology*, 30(15): 3869-3881. doi: 10.1111/mec.15990.

- Kimes, N.E., Grim, C.J., Johnson, W.R., Hasan, N.A., Tall, B.D., Kothary, M.H., Kiss, H., Munk, A.C., Tapia, R., Green, L., Detter, C., Bruce, D.C., Brettin, T.S., Colwell, R.R. y Morris, P.J. (2012). Temperature regulation of virulence factors in the pathogen *Vibrio coralliilyticus*. *ISME Journal*, 6(4): 835-846. doi: 10.1038/ismej.2011.154.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M. y Glöckner, F.O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41(1). doi: 10.1093/nar/gks808.
- Krediet, C.J., Ritchie, K.B., Paul, V.J. y Teplitski, M. (2013). Coral-associated micro-organisms and their roles in promoting coral health and thwarting diseases. *Proceedings of the Royal Society B*, 280. doi: 10.1098/rspb.2012.2328.
- Lajeunesse, T.C. (2002). Diversity and community structure of symbiotic dinoflagellates from Caribbean coral reefs. *Marine Biology*, 141(2): 387-400. doi: 10.1007/s00227-002-0829-2.
- Lajeunesse, T.C., Parkinson, J.E., Gabrielson, P.W., Jeong, H.J., Reimer, J.D., Voolstra, C.R. y Santos, S.R. (2018). Systematic revision of Symbiodiniaceae highlights the antiquity and diversity of coral endosymbionts. *Current Biology*, 28(16): 2570-2580.e6. doi: 10.1016/j.cub.2018.07.008.
- Landsberg, J.H., Kiryu, Y., Peters, E.C., Wilson, P.W., Perry, N., Waters, Y., Maxwell, K.E., Huebner, L.K. y Work, T.M. (2020). Stony coral tissue loss disease in Florida is associated with disruption of host-zooxanthellae physiology. *Frontiers in Marine Science*, 7. doi: 10.3389/fmars.2020.576013.
- Liu, C., Cui, Y., Li, X. y Yao, M. (2021). microeco: an R package for data mining in microbial community ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 97(2). doi: 10.1093/femsec/fiaa255.
- Louca, S., Parfrey, L.W. y Doebeli, M. (2016). Decoupling function and taxonomy in the global ocean microbiome. *Science*, 353(6305): 1272-1277. doi: 10.1126/science.aaf4507.
- MacKnight, N.J., Cobleigh, K., Lasseigne, D., Chaves-Fonnegra, A., Gutting, A., Dimos, B., Antoine, J., Fuess, L., Ricci, C., Butler, C., Muller, E.M., Mydlarz, L.D. y Brandt, M. (2021). Microbial dysbiosis reflects disease resistance in diverse coral species. *Communications Biology*, 4(1): 679. doi: 10.1038/s42003-021-02163-5.
- McDevitt-Irwin, J.M., Baum, J.K., Garren, M. y Vega-Thurber, R.L. (2017). Responses of coral-associated bacterial communities to local and global stressors. *Frontiers in Marine Science*, 4. doi: 10.3389/fmars.2017.00262.
- McMurdie, P.J. y Holmes, S. (2013). Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLOS ONE*, 8(4). doi: 10.1371/journal.pone.0061217.
- Meiling, S.S., Muller, E.M., Lasseigne, D., Rossin, A., Veglia, A.J., MacKnight, N., Dimos, B., Huntley, N., Correa, A.M.S., Smith, T.B., Holstein, D.M., Mydlarz, L.D., Apprill, A. y Brandt, M.E. (2021). Variable species responses to experimental stony coral tissue loss disease (SCTLD) exposure. *Frontiers in Marine Science*, 8. doi: 10.3389/fmars.2021.670829.
- Meyer, J.L., Castellanos-Gell, J., Aeby, G.S., Häse, C.C., Ushijima, B. y Paul, V.J. (2019). Microbial community shifts associated with the ongoing stony coral tissue loss disease outbreak on the Florida Reef Tract. *Frontiers in Microbiology*, 10. doi: 10.3389/fmicb.2019.02244.
- Meyer, J.L., Gunasekera, S.P., Scott, R.M., Paul, V.J. y Teplitski, M. (2016). Microbiome shifts and the inhibition of quorum sensing by black band disease cyanobacteria. *The ISME Journal*, 10(5): 1204-1216. doi: 10.1038/ismej.2015.184.

- Mikryukov, V. y Mahé, F. (2021). *metagMisc: miscellaneous functions for metagenomic analysis*. Disponible en: <https://github.com/vmikk/metagMisc> [Consultado: 18 febrero 2022].
- Moberg, F. y Folke, C. (1999). Ecological goods and services of coral reef ecosystems. *Ecological Economics*, 29: 215-233. doi: 10.1016/S0921-8009(99)00009-9.
- Mora, C. (2008). A clear human footprint in the coral reefs of the Caribbean. *Proceedings of the Royal Society B*, 275(1636): 767-773. doi: 10.1098/rspb.2007.1472.
- Muller, E.M., Sartor, C., Alcaraz, N.I. y van Woesik, R. (2020). Spatial epidemiology of the stony-coral-tissue-loss disease in Florida. *Frontiers in Marine Science*, 7. doi: 10.3389/fmars.2020.00163.
- Munn, C.B. (2015). The role of Vibrios in diseases of corals. *Microbiology Spectrum*, 3(4). doi: 10.1128/microbiolspec.VE-0006-2014.
- Neely, K.L., Macaulay, K.A., Hower, E.K. y Dobler, M.A. (2020). Effectiveness of topical antibiotics in treating corals affected by stony coral tissue loss disease. *PeerJ*, 2020(6). doi: 10.7717/peerj.9289.
- Oksanen, J., Blanchet, F., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, P., O'Hara, R., Simpson, G., Solymos, P., Henry, M., Stevens, H., Szoecs, E. y Wagner, H. (2020). *vegan: community ecology package*. Disponible en: <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/vegan.pdf> [Consultado: 12 octubre 2022].
- Paliy, O. y Shankar, V. (2016). Application of multivariate statistical techniques in microbial ecology. *Molecular Ecology*, 25(5): 1032-1057. doi: 10.1111/mec.13536.
- Pascal, N., Allenbach, M., Brathwaite, A., Burke, L., le Port, G. y Clua, E. (2016). Economic valuation of coral reef ecosystem service of coastal protection: A pragmatic approach. *Ecosystem Services*, 21: 72-80. doi: 10.1016/j.ecoser.2016.07.005.
- Peixoto, R.S., Rosado, P.M., Leite, D.C.A., Rosado, A.S. y Bourne, D.G. (2017). Beneficial Microorganisms for Corals (BMC): Proposed mechanisms for coral health and resilience. *Frontiers in Microbiology*, 8. doi: 10.3389/fmicb.2017.00341.
- Pinzón, J.H., Beach-Letendre, J., Weil, E. y Mydlarz, L.D. (2014). Relationship between phylogeny and immunity suggests older Caribbean coral lineages are more resistant to disease. *PLOS ONE*, 9(8). doi: 10.1371/journal.pone.0104787.
- Pollock, F.J., Morris, P.J., Willis, B.L. y Bourne, D.G. (2011). The urgent need for robust coral disease diagnostics. *PLOS Pathogens*, 7(10). doi: 10.1371/journal.ppat.1002183.
- Precht, W.F. (2019). Failure to respond to a coral disease outbreak: Potential costs and consequences. *PeerJ*. doi: 10.7287/peerj.preprints.27860v2.
- Price, M.N., Dehal, P.S. y Arkin, A.P. (2010). FastTree 2 – Approximately maximum-likelihood Trees for large alignments. *PLOS ONE*, 5(3): e9490. doi: 10.1371/journal.pone.0009490.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J. y Glöckner, F.O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(1). doi: 10.1093/nar/gks1219.
- Ramette, A. (2007). Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 62(2): 142-160. doi: 10.1111/j.1574-6941.2007.00375.x.
- Reshef, L., Koren, O., Loya, Y., Zilber-Rosenberg, I. y Rosenberg, E. (2006). The coral probiotic hypothesis. *Environmental Microbiology*, 8(12): 2068-2073. doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.01148.x.
- Reyes, J., Santodomingo, N. y Flórez, P. (2010). *Corales escleractinios de Colombia*. Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras "José Benito Vives de Andrés, ". Disponible en:

<http://www.invemar.org.co/documents/10182/0/CORALES+ESCLERACTINIOS+DE+COLOMBIA.pdf>. [Consulta: 12 marzo 2022].

- Richardson, L. (1998). Coral diseases: what is really known? *Trends in Ecology & Evolution*, 13(11): 438-443. doi: 10.1016/S0169-5347(98)01460-8.
- Roberts, C.M., McClean, C.J., Veron, J.E.N., Hawkins, J.P., Allen, G.R., McAllister, D.E., Mittermeier, C.G., Schueler, F.W., Spalding, M., Wells, F., Vynne, C. y Werner, T.B. (2002). Marine biodiversity hotspots and conservation priorities for tropical reefs. *Science*, 295(5558): 1280-1284. doi: 10.1126/science.1067728.
- Roder, C., Arif, C., Daniels, C., Weil, E. y Voolstra, C.R. (2014). Bacterial profiling of white plague disease across corals and oceans indicates a conserved and distinct disease microbiome. *Molecular Ecology*, 23(4): 965-974. doi: 10.1111/mec.12638.
- Rosales, S.M., Clark, A.S., Huebner, L.K., Ruzicka, R.R. y Muller, E.M. (2020). Rhodobacterales and Rhizobiales are associated with stony coral tissue loss disease and its suspected sources of transmission. *Frontiers in Microbiology*, 11. doi: 10.3389/fmicb.2020.00681.
- Rosenberg, E., Koren, O., Reshef, L., Efrony, R. y Zilber-Rosenberg, I. (2007). The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 5:355-362. doi: 10.1038/nrmicro1635.
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W.S. y Huttenhower, C. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology*, 12(6): 60. doi: 10.1186/gb-2011-12-6-r60.
- Sorokin, Y.I. (1993). *Coral reef ecology*. 2ª ed. Springer Berlin Heidelberg, Berlin. doi: 10.1007/978-3-642-80046-7.
- Spalding, M., Ravilious, C. y Green, E.P. (2001). *World atlas of coral reefs*. University of California Press, Berkeley.
- Studivan, M.S., Rossin, A.M., Rubin, E., Soderberg, N., Holstein, D.M. y Enochs, I.C. (2022). Reef sediments can act as a stony coral tissue loss disease vector. *Frontiers in Marine Science*, 8. doi: 10.3389/fmars.2021.815698.
- Sun, F. y Xu, Z. (2021). Significant differences in intestinal microbial communities in aquatic animals from an aquaculture area. *Journal of Marine Science and Engineering*, 9(2): 104. doi: 10.3390/jmse9020104.
- Sunagawa, S., Desantis, T.Z., Piceno, Y.M., Brodie, E.L., Desalvo, M.K., Voolstra, C.R., Weil, E., Andersen, G.L. y Medina, M. (2009). Bacterial diversity and white plague disease-associated community changes in the Caribbean coral *Montastraea faveolata*. *ISME Journal*, 3(5): 512-521. doi: 10.1038/ismej.2008.131.
- Sweet, M.J., Burian, A., Fifer, J., Bulling, M., Elliott, D. y Raymundo, L. (2019). Compositional homogeneity in the pathobiome of a new, slow-spreading coral disease. *Microbiome*, 7(1): 139. doi: 10.1186/s40168-019-0759-6.
- Sweet, M.J., Jones, R. y Bythell, J. (2012). Coral diseases in aquaria and in nature. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 92(4): 791-801. doi: 10.1017/S0025315411001688.
- Sweet, M.J. y Bulling, M.T. (2017). On the importance of the microbiome and pathobiome in coral health and disease. *Frontiers in Marine Science*, 4. doi: 10.3389/fmars.2017.00009.
- Thome, P.E., Rivera-Ortega, J., Rodríguez-Villalobos, J.C., Cerqueda-García, D., Guzmán-Urieta, E.O., García-Maldonado, J.Q., Carabantes, N. y Jordán-Dahlgren, E. (2021). Local dynamics of a white syndrome outbreak and changes in the microbial community associated with

- colonies of the scleractinian brain coral *Pseudodiploria strigosa*. *PeerJ*, 9. doi: 10.7717/peerj.10695.
- Thompson, J.R., Rivera, H.E., Closek, C.J. y Medina, M. (2014). Microbes in the coral holobiont: partners through evolution, development, and ecological interactions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4. doi: 10.3389/fcimb.2014.00176.
- Vayssier-Taussat, M., Albina, E., Citti, C., Cosson, J.F., Jacques, M.A., Lebrun, M.H., le Loir, Y., Ogliastro, M., Petit, M.A., Roumagnac, P. y Candresse, T. (2014). Shifting the paradigm from pathogens to pathobiome new concepts in the light of meta-omics. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5. doi: 10.3389/fcimb.2014.00029.
- Vega-Thurber, R., Mydlarz, L.D., Brandt, M., Harvell, D., Weil, E., Raymundo, L., Willis, B.L., Langevin, S., Tracy, A.M., Littman, R., Kemp, K.M., Dawkins, P., Prager, K.C., Garren, M. y Lamb, J. (2020). Deciphering coral disease dynamics: integrating host, microbiome, and the changing environment. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 8. doi: 10.3389/fevo.2020.575927.
- Veglia, A.J., Beavers, K., van Buren, E.W., Meiling, S.S., Muller, E.M., Smith, T.B., Holstein, D.M., Apprill, A., Brandt, M.E., Mydlarz, L.D. y Correa, A.M.S. (2022). Alphaflexivirus genomes in stony coral tissue loss disease-affected, disease-exposed, and disease-unexposed coral colonies in the U.S. Virgin Islands. *Microbiology Resource Announcements*, 11(2). doi: 10.1128/mra.01199-21.
- Verhoeven, J.T.P., Salvo, F., Knight, R., Hamoutene, D. y Dufour, S.C. (2018). Temporal bacterial surveillance of salmon aquaculture sites indicates a long lasting benthic impact with minimal recovery. *Frontiers in Microbiology*, 9(DEC). doi: 10.3389/fmicb.2018.03054.
- Webster, N.S. y Reusch, T.B.H. (2017). Microbial contributions to the persistence of coral reefs. *The ISME Journal*, 11(10): 2167-2174. doi: 10.1038/ismej.2017.66.
- Weil, E. (2004). Coral reef diseases in the wider Caribbean. En: *Coral health and disease*. Springer, Berlin, pp. 35-68.
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: elegant graphics for data analysis*. 3ª ed. Springer-Verlag, New York.
- Work, T.M., Weatherby, T.M., Landsberg, J.H., Kiryu, Y., Cook, S.M. y Peters, E.C. (2021). Viral-like particles are associated with endosymbiont pathology in Florida corals affected by stony coral tissue loss disease. *Frontiers in Marine Science*, 8. doi: 10.3389/fmars.2021.750658.
- Yamamuro, M., Kayane, H. y Minagawao, M. (1995). Carbon and nitrogen stable isotopes of primary producers in coral reef ecosystems. *Limnology and Oceanography*, 40(3): 617-621. doi: 10.4319/lo.1995.40.3.0617.
- Zaneveld, J.R., Burkepile, D.E., Shantz, A.A., Pritchard, C.E., McMinds, R., Payet, J.P., Welsh, R., Correa, A.M.S., Lemoine, N.P., Rosales, S., Fuchs, C., Maynard, J.A. y Thurber, R.V. (2016). Overfishing and nutrient pollution interact with temperature to disrupt coral reefs down to microbial scales. *Nature Communications*, 7(1): 11833. doi: 10.1038/ncomms11833.
- Zhang, Y., Yang, Q., Ling, J., Long, L., Huang, H., Yin, J., Wu, M., Tang, X., Lin, X., Zhang, Y. y Dong, J. (2021). Shifting the microbiome of a coral holobiont and improving host physiology by inoculation with a potentially beneficial bacterial consortium. *BMC Microbiology*, 21(1): 130. doi: 10.1186/s12866-021-02167-5.

11. ANEXOS

Anexo A. Relación de muestras de estudio previo y código de acceso de la base de datos SRA de NCBI

Tabla A1. Relación de muestras de estudio previo (Thome *et al.* 2021) y código de acceso de la base de datos de SRA del NCBI.

ID Muestra en el presente estudio	Condición	Código de acceso SRA - NCBI
68Nat	S	SRS6274852
69Nat	S	SRS6274848
66Nat	S	SRS6274849
64Nat	ELL	SRS6274847
63Nat	ELL	SRS6274856
62Nat	ECL	SRS6274855
61Nat	ECL	SRS6274854
60Nat	ECL	SRS6274851

Anexo B. Lecturas obtenidas y finales después del procesamiento bioinformático**Tabla B1.** Lecturas obtenidas y finales después del procesamiento bioinformático

Muestra	Lecturas obtenidas	Lecturas filtradas por calidad	Lecturas acopladas	Lecturas no quiméricas
340B	11423	10596	8411	6803
400	14847	13815	10259	9306
347E	6907	6398	4551	4353
348	6875	6332	4783	4607
338	11929	11020	8984	8133
322E	20042	18689	17215	13723
339	9465	8751	7100	6915
333	17258	16025	13438	12868
68Nat	41258	31936	31546	31228
332	8336	7677	6466	6379
60Nat	28890	23593	22669	22114
61Nat	39122	30743	30289	30080
63Nat	31755	24959	24648	24487
419	17896	16538	14600	13896
62Nat	35500	29334	28448	28172
69Nat	39116	31607	31257	31231
66Nat	35452	29165	28848	28505
321E	10925	10125	9800	8908
64Nat	40788	33958	33698	33384
336	12411	11431	10392	10285
335	9861	9091	8462	8396
331	16289	14983	14131	13986
341E	11441	10674	10434	10063
337	7583	7017	6695	6674
323E	13163	12328	12012	11633
327E	8630	8060	7816	7687
334	12334	11470	11063	11048
435BE	15280	14308	13762	13724
342E	10953	10309	10017	9939
325E	5382	5053	4920	4893
326E	8194	7672	7509	7493
324E	10742	10074	9845	9830
447E	14128	13237	12983	12948
Totales	584175	506968	477051	463691

Anexo C. Curva de rarefacción

En la curva de rarefacción (Fig. C1) de las muestras se observa como a partir de aproximadamente 2,500 lecturas las líneas tienden a la asíntota.

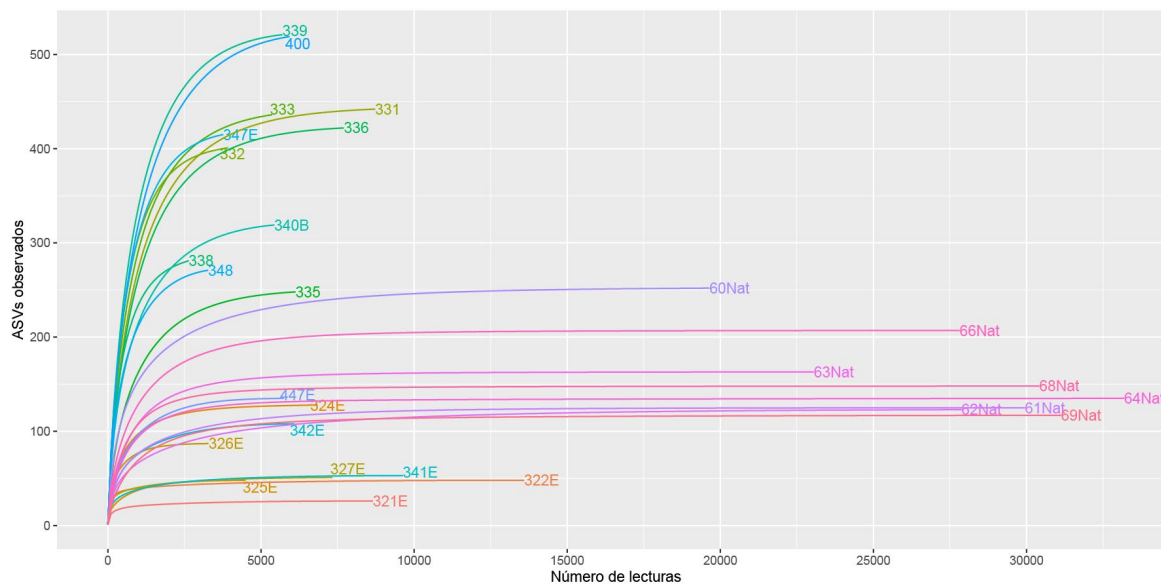


Figura C1. Curva de rarefacción de cada una de las muestras.

Anexo D. Estructura del microbioma por año y estado de salud

Respecto al año 2018 (Fig. D1) el ordenamiento NMDS presentó un nivel de estrés de 0.0008. Se puede apreciar la separación respecto a la condición, agrupándose las muestras de condición ELL y S, mientras que para la condición ECL se formaron dos grupos. El análisis de PERMANOVA detectó diferencias significativas entre las condiciones ($R^2= 0.3962$, $p= 0.019$). El análisis a posteriori denotó la formación de dos grupos, el primero conteniendo a las muestras de condición ECL y el segundo a las condiciones ELL y S.

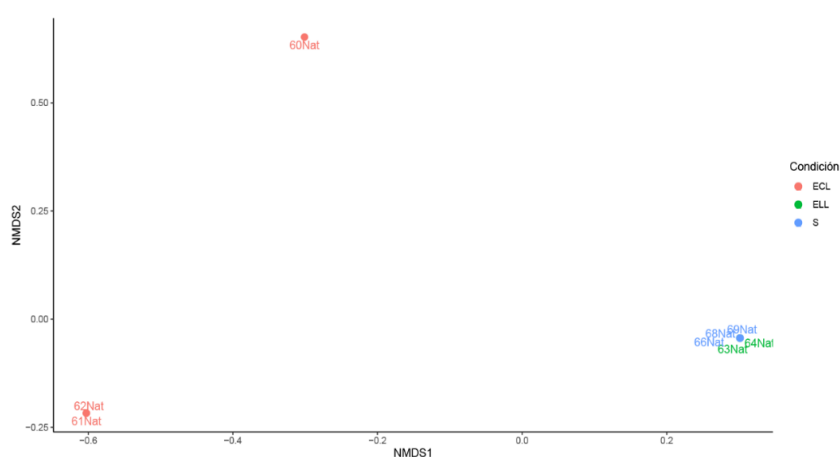


Figura D1. Ordenación mediante un escalamiento multidimensional no-métrico (NMDS) de la estructura de las comunidades microbianas de las muestras del año 2018.

En el año 2019 (Fig. D2), la ordenación NDMS presentó un nivel de estrés de 0.104. El NMDS mostró que la estructura de la comunidad microbiana está relacionado respecto a la condición (PERMANOVA $R^2= 0.2169$, $p= 0.0009$) y no al sitio (PERMANOVA $R^2= 0.2169$, $p= 0.1448$). Así mismo, se observa una separación entre la condición ECL y las condiciones ELL y S. El análisis a posteriori arrojó la formación de dos grupos respecto a su condición: ECL y ELL-S.

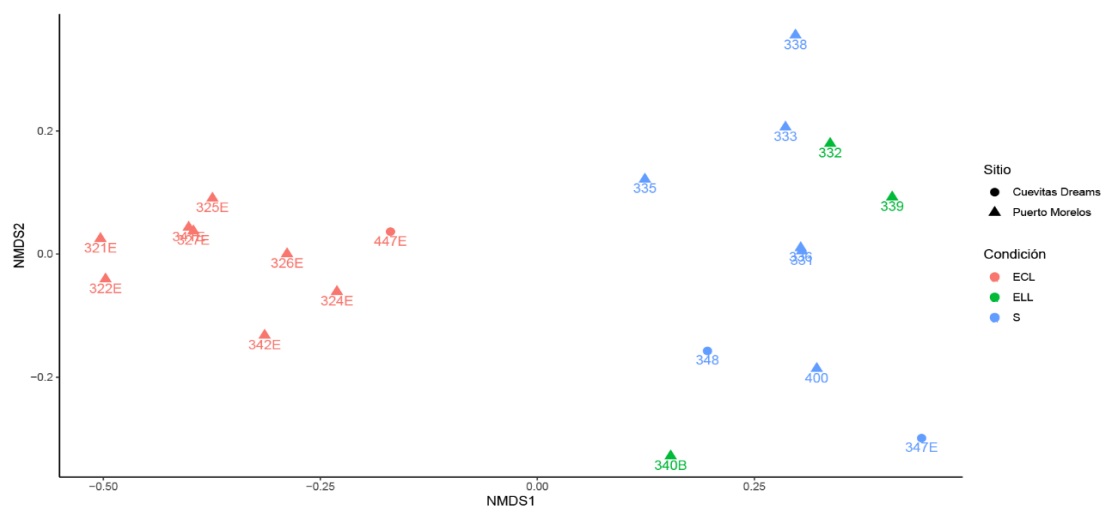


Figura D2. Ordenación mediante un escalamiento multidimensional no-métrico (NMDS) de la estructura de las comunidades microbianas de las muestras de las tres condiciones (ECL, ELL y S) del año 2019.

Anexo E. Métricas de alfa diversidad de las comunidades microbianas

Tabla E1. Valores de las métricas de alfa diversidad de las comunidades microbianas por muestra.

Año	ID Muestra	Condición	ASVs Observados	Shannon (H')
2019	321E	ECL	26	3.1916
	322E	ECL	48	3.7848
	324E	ECL	128	4.7924
	325E	ECL	48	3.8081
	326E	ECL	87	4.4094
	327E	ECL	51	3.8446
	331	S	442	6.0065
	332	ELL	401	5.92
	333	S	436	5.9968
	335	S	248	5.4333
	336	S	422	5.9652
	338	S	281	5.5781
	339	ELL	521	6.1863
	340B	ELL	319	5.6814
	341E	ECL	53	3.9043
	342E	ECL	108	4.6057
	347E	S	415	5.9523
	348	S	271	5.5449
	400	S	519	6.1576
447E	ECL	135	4.855	
2018	60Nat	ECL	252	5.4227
	61Nat	ECL	125	4.7479
	62Nat	ECL	123	4.7155
	63Nat	ELL	163	5.0247
	64Nat	ELL	135	4.8447
	66Nat	S	207	5.2586
	68Nat	S	148	4.9389
	69Nat	S	117	4.6911

Anexo F. Análisis de muestras excluidas

En la Fig. F1 se pueden apreciar las fotografías de las colonias de las cuales fueron obtenidas las muestras 419, 323E, 334, 435BE y 337, mismas que fueron excluidas de los análisis por presentar una coloración atípica a los signos de la enfermedad de pérdida de tejido de corales pétreos.

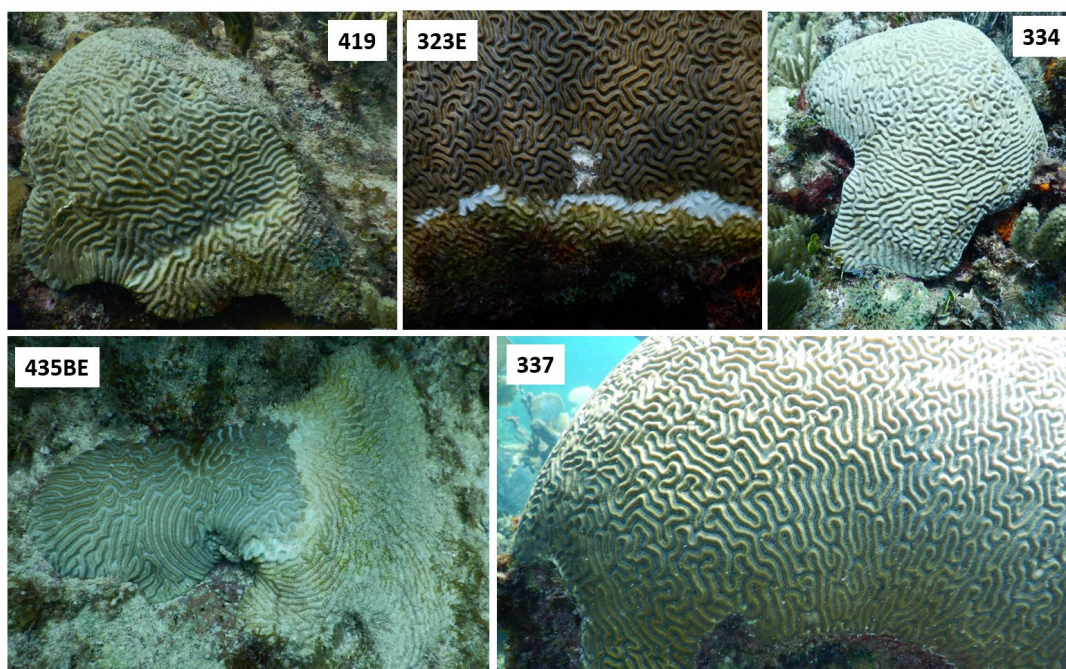


Figura F1. Fotografías de las colonias excluidas en los análisis.

Sin embargo, se realizó un análisis de diversidad alfa considerando las métricas de ASVs observados y el índice de diversidad de Shannon. Para el grupo de muestras excluidas se registraron entre 110 a 286 ASVs observados (Fig. F2). El análisis de varianza denotó diferencias significativas entre las condiciones ($F_{3,21} = 12.11$, $p = 0.00000016$). La prueba post-hoc de Tukey arrojó la existencia de tres grupos, el primero conteniendo a la condición ECL, el segundo incluyó al grupo de muestras excluidas y finalmente, el tercer grupo estuvo conformado por las condiciones ELL y S.

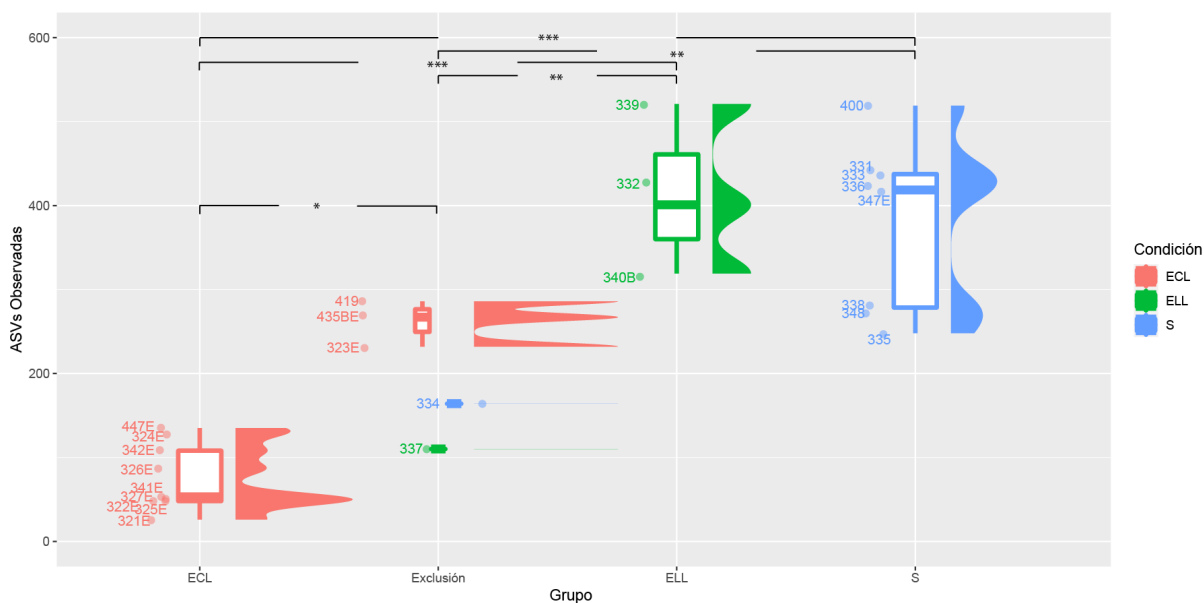


Figura F2. ASVs observados por condición, considerando las muestras excluidas para el año 2019 según la condición de salud de las colonias de coral: [Color rojo] Enferma cerca de la lesión (ECL), [Color verde] Enferma lejos de la lesión (ELL), [Color azul] Aparentemente sana (S). Nivel de significancia: *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

Respecto al índice de diversidad de Shannon (Fig. F3) el grupo de muestras excluidas presentó valores entre 4.64 y 5.65. La comparación de esta métrica a partir de la prueba de suma de rango de Kruskal Wallis arrojó diferencias significativas ($\chi^2_3 = 19.368$, $p = 0.0002$). La prueba *post-hoc* de Dunn detectó la formación de dos grupos, el primero formado únicamente por la condición ECL, mientras que el segundo grupo estuvo formado por el grupo de exclusión y las condiciones ELL y S.

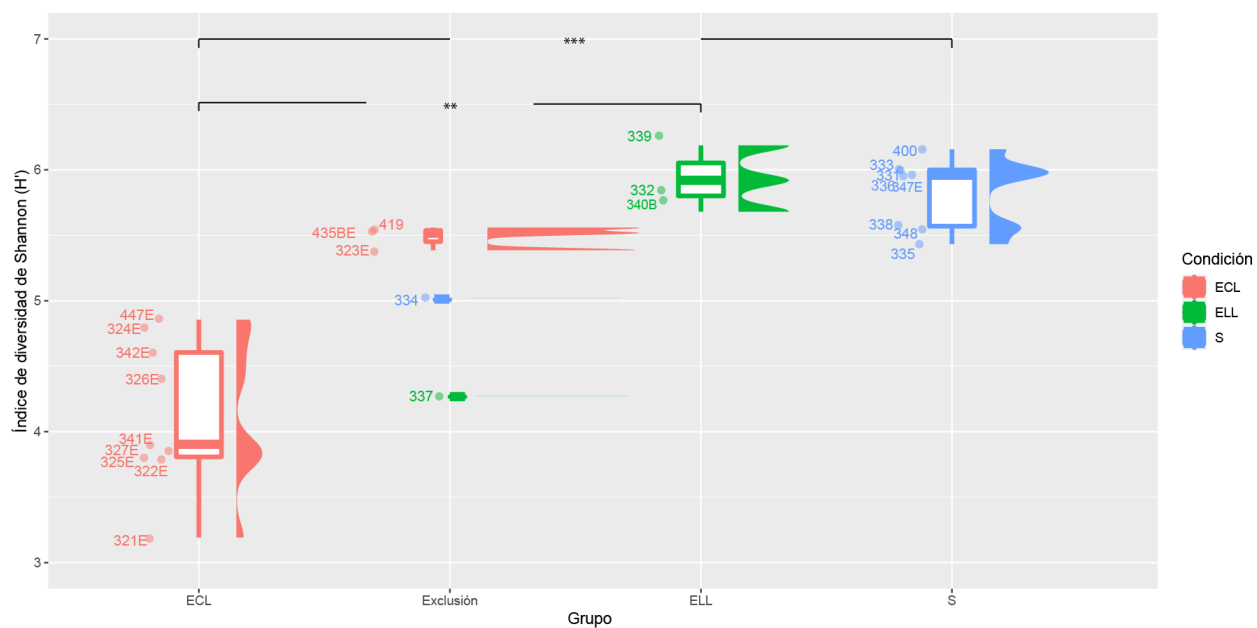


Figura F3. Índice de diversidad de Shannon (H'), considerando las muestras excluidas para el año 2019 según la condición de salud de las colonias de coral: [Color rojo] Enferma cerca de la lesión (ECL), [Color verde] Enferma lejos de la lesión (ELL), [Color azul] Aparentemente sana (S). Nivel de significancia: *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

Anexo G. Análisis de abundancia diferencial

Tabla G1. Taxa diferencialmente abundantes del análisis discriminante lineal (LDA) con efecto de tamaño (LEfSe) de los ASVs a nivel Orden del año 2018.

Taxa	Condición	Significancia (p)	LDA (log 10)	Abundancia relativa promedio
Bacteroidales	ECL	0.0423	4.36	0.0513
Desulfovibrionales	ECL	0.0375	4.07	0.0204
Thiomicrospirales	ELL	0.0324	3.92	0.0065
Lachnospirales	ECL	0.0375	3.79	0.0155

Tabla G2. Taxa diferencialmente abundantes del análisis discriminante lineal (LDA) con efecto de tamaño (LEfSe) de los ASVs a nivel Orden del año 2019.

Taxa	Condición	Significancia (p)	LDA (log 10)	Abundancia relativa promedio
Peptostreptococcales-Tissierellales	ECL	0.0006	4.88	0.1499
Vibrionales	ECL	0.0130	4.83	0.1816
Campylobacterales	ECL	0.0002	4.53	0.0707
Pirellulales	S	0.0005	4.35	0.0477
Oceanospirillales	ECL	0.0210	4.33	0.0586
Lachnospirales	ECL	0.0047	4.19	0.0303
Desulfovibrionales	ECL	0.0127	4.18	0.0294
Bacteroidales	ECL	0.0024	4.17	0.0315
Kiloniellales	S	0.0120	4.14	0.0343
Microtrichales	S	0.0009	4.11	0.0280
Steroidobacterales	ELL	0.0011	4.09	0.0201
Clostridiales	ECL	0.0055	4.07	0.0227
Thalassobaculales	S	0.0031	4.07	0.0272
Chitinophagales	S	0.0120	4.06	0.0290
NB1-j	ELL	0.0007	4.05	0.0196
Thermoanaerobaculales	S	0.0003	4.05	0.0221
Pseudomonadales	ECL	0.0109	3.97	0.0228
Verrucomicrobiales	S	0.0372	3.92	0.0240
Phycisphaerales	S	0.0011	3.88	0.0157
Caulobacterales	S	0.0037	3.87	0.0160
Actinomarinales	S	0.0026	3.82	0.0130
Polyangiales	ELL	0.0037	3.81	0.0156
Cellvibrionales	S	0.0387	3.79	0.0245
Bdellovibrionales	ELL	0.0008	3.78	0.0125
OM190	S	0.0003	3.77	0.0115
Blastocatellales	ECL	0.0387	3.77	0.0191
Defluviococcales	S	0.0050	3.76	0.0114
Nitrosococcales	ELL	0.0022	3.71	0.0109

Opitales	S	0.0011	3.70	0.0087
KI89A_clade	ELL	0.0012	3.68	0.0089
BD2-11_terrestrial_group	S	0.0014	3.65	0.0066
Planctomycetales	S	0.0022	3.63	0.0058
Latescibacterota	S	0.0012	3.61	0.0080
Rhodothermales	ELL	0.0008	3.57	0.0060
JG30-KF-CM66	ELL	0.0045	3.56	0.0024
Micavibrionales	ELL	0.0030	3.55	0.0065
Caldilineales	S	0.0004	3.54	0.0057
Dadabacteriales	S	0.0008	3.53	0.0069
pltb-vmat-80	ELL	0.0017	3.48	0.0052
SBR1031	ELL	0.0175	3.46	0.0060
Haliangiales	S	0.0033	3.46	0.0050
Saccharimonadales	ELL	0.0031	3.45	0.0030
Ardenticatenales	S	0.0022	3.45	0.0037
Candidatus_Kaiserbacteria	S	0.0057	3.44	0.0056
SAR202_clade	ELL	0.0080	3.43	0.0065
Acanthopleuribacterales	S	0.0047	3.41	0.0038
TK17	ELL	0.0005	3.37	0.0027
Parvibaculales	ELL	0.0034	3.37	0.0039
Vampirovibrionales	ELL	0.0041	3.33	0.0034
Subgroup_22	S	0.0143	3.32	0.0054
Myxococcales	S	0.0002	3.31	0.0051
Subgroup_9	ELL	0.00587	3.30	0.0040
bacteriap25	ELL	0.0487	3.25	0.0030
Deinococcales	ELL	0.0168	3.24	0.0016
Granulosicoccales	ELL	0.0353	3.24	0.0011
MBAE14	ELL	0.0025	3.24	0.0016
PAUC26f	S	0.0075	3.22	0.0030
Pla3_lineage	S	0.0075	3.22	0.0022
OM182_clade	S	0.0004	3.22	0.0032
Oligoflexales	S	0.0051	3.21	0.0024
Chlamydiales	ELL	0.0409	3.21	0.0033
Kapabacteriales	S	0.0070	3.20	0.0027
Entotheonellales	ELL	0.0192	3.20	0.0023
Obscuribacterales	ELL	0.0187	3.19	0.0026
Nitrospinales	ELL	0.0353	3.17	0.0016
HOC36	ELL	0.0058	3.15	0.0027
Gracilibacteria	S	0.0220	3.15	0.0024
PB19	S	0.0220	3.11	0.0020
Gaiellales	ELL	0.0358	3.09	0.0015
Thiotrichales	S	0.0097	3.03	0.0016
Tenderiales	ELL	0.0329	2.97	0.0021

Tabla G3. Taxa diferencialmente abundantes del análisis discriminante lineal (LDA) con efecto de tamaño (LEfSe) de los ASVs a nivel género del año 2018.

Taxa	Condición	Significancia (p)	LDA (log 10)	Abundancia relativa promedio
NS5_marine_group	S	0.0439	4.50	0.0874
<i>Roseimarinus</i>	ECL	0.0375	4.15	0.0302
<i>Halodesulfovibrio</i>	ECL	0.0375	3.92	0.0167
<i>Tepidibacter</i>	ECL	0.0375	3.88	0.0145
SUP05_cluster	ELL	0.0324	3.81	0.0065
<i>Pseudobacteriovorax</i>	ELL	0.0324	3.72	0.0059
<i>Halarcobacter</i>	ECL	0.0375	3.71	0.0100
<i>Fusibacter</i>	ECL	0.0375	3.66	0.0098
<i>Vallitalea</i>	ECL	0.0375	3.64	0.0086
<i>Malaciobacter</i>	ECL	0.0490	3.58	0.0118
<i>Salinivibrio</i>	ECL	0.0375	3.56	0.0109

Tabla G4. Taxa diferencialmente abundantes del análisis discriminante lineal (LDA) con efecto de tamaño (LEfSe) de los ASVs a nivel género del año 2019.

Taxa	Condición	Significancia (p)	LDA (log 10)	Abundancia relativa promedio
<i>Vibrio</i>	ECL	0.0103	4.74	0.1408
<i>Tepidibacter</i>	ECL	0.0055	4.54	0.0635
<i>Fusibacter</i>	ECL	0.0003	4.43	0.0549
<i>Halodesulfovibrio</i>	ECL	0.0027	4.18	0.0294
JTB215	ECL	0.0008	4.12	0.0259
<i>Halarcobacter</i>	ECL	0.0008	4.10	0.0270
<i>Woeseia</i>	ELL	0.0010	4.10	0.0189
<i>Roseimarinus</i>	ECL	0.0049	4.08	0.0255
<i>Salinivibrio</i>	ECL	0.0008	4.07	0.0229
NB1-j	ELL	0.0007	4.02	0.0196
Subgroup_10	S	0.0003	4.02	0.0207
<i>Photobacterium</i>	S	0.0286	3.99	0.0120
Pir4_lineage	S	0.0004	3.93	0.0165
Sva0996_marine_group				
up	ELL	0.0008	3.93	0.0166
<i>Vallitalea</i>	ECL	0.0230	3.87	0.0151
<i>Malaciobacter</i>	ECL	0.0153	3.83	0.0153
<i>Muricauda</i>	ELL	0.0016	3.81	0.0082
OM190	S	0.0003	3.78	0.0115
<i>Aquimarina</i>	ECL	0.0381	3.74	0.0156
BD2-				
11_terrestrial_group	S	0.0014	3.74	0.0066

DEV007	S	0.0007	3.72	0.0104
<i>Blastopirellula</i>	S	0.0115	3.71	0.0107
M27_clade	ELL	0.0023	3.69	0.0093
KI89A_clade	ELL	0.0012	3.68	0.0089
<i>Acinetobacter</i>	ECL	0.0182	3.67	0.0106
<i>Rhodopirellula</i>	S	0.0073	3.64	0.0086
<i>Latescibacterota</i>	S	0.0012	3.62	0.0080
BD1-7_clade	ELL	0.0065	3.59	0.0028
<i>Pelagibius</i>	S	0.0027	3.57	0.0074
<i>Bythopirellula</i>	ELL	0.0043	3.55	0.0070
Dadabacteriales	S	0.0008	3.53	0.0069
SAR202_clade	ELL	0.0080	3.50	0.0065
SM1A02	S	0.0102	3.49	0.0062
pltb-vmat-80	ELL	0.0017	3.47	0.0052
JG30-KF-CM66	ELL	0.0045	3.47	0.0024
A4b	ELL	0.0342	3.47	0.0035
Candidatus_ <i>Kaiserbac</i>				
<i>teria</i>	S	0.0057	3.44	0.0056
<i>Bdellovibrio</i>	S	0.0011	3.42	0.0041
<i>Haliangium</i>	S	0.0033	3.42	0.0050
<i>Labrenzia</i>	ELL	0.002	3.42	0.0054
<i>Cerasicoccus</i>	ELL	0.0043	3.39	0.0036
<i>Roseibacillus</i>	S	0.0324	3.39	0.0068
P3OB-42	S	0.0002	3.39	0.0051
<i>Pelagicoccus</i>	S	0.0407	3.38	0.0048
<i>Filomicrobium</i>	ELL	0.0228	3.36	0.0040
<i>Pseudohongiella</i>	ELL	0.0492	3.36	0.0045
PS1_clade	ELL	0.0034	3.36	0.0039
<i>Sandaracinus</i>	ELL	0.0141	3.36	0.0041
TK17	ELL	0.0005	3.34	0.0027
<i>Acanthopleuribacter</i>	S	0.0047	3.34	0.0038
<i>Portibacter</i>	ELL	0.0055	3.31	0.0038
OM182_clade	S	0.0004	3.28	0.0032
<i>Ekhidna</i>	ELL	0.0070	3.28	0.0036
Urania-1B-				
19_marine_sediment				
_group	S	0.0029	3.27	0.0032
Subgroup_9	ELL	0.0058	3.27	0.0040
Saccharimonadales	ELL	0.0031	3.27	0.0030
<i>Reichenbachiella</i>	ELL	0.0041	3.26	0.0047
<i>Seonamhaeicola</i>	ELL	0.0375	3.25	0.0018
MBAE14	ELL	0.0025	3.25	0.0016
Obscuribacteraceae	ELL	0.0187	3.22	0.0026
PAUC26f	S	0.0075	3.21	0.0030
bacteriap25	ELL	0.0487	3.20	0.0030
<i>Pseudahrensia</i>	S	0.0097	3.20	0.0027

<i>Phaeodactylibacter</i>	ELL	0.0362	3.19	0.0032
<i>Lewinella</i>	S	0.0084	3.17	0.0027
Woesearchaeales	S	0.0290	3.17	0.0029
Candidatus_Entotheo				
nella	ELL	0.0192	3.17	0.0023
HOC36	ELL	0.0058	3.17	0.0027
<i>Truepera</i>	ELL	0.0297	3.16	0.0016
Kapabacteriales	S	0.0070	3.15	0.0027
<i>Salinispira</i>	ELL	0.0055	3.15	0.0024
AKYG1722	ELL	0.0487	3.15	0.0017
Pla3_lineage	S	0.0075	3.14	0.0022
EF100-94H03	ELL	0.0381	3.12	0.0015
<i>Schleiferia</i>	ELL	0.0158	3.12	0.0015
<i>Granulosicoccus</i>	ELL	0.0353	3.12	0.0011
Cm1-21	S	0.0299	3.11	0.0021
<i>Diplosphaera</i>	ELL	0.0353	3.10	0.0014
<i>Fluviicola</i>	ELL	0.0025	3.09	0.0014
<i>Gracilibacteria</i>	S	0.0220	3.09	0.0024
SCGC_AAA164-E04	ELL	0.0005	3.09	0.0027
<i>Marinoscillum</i>	S	0.0299	3.09	0.0012
<i>Pirellula</i>	ELL	0.0329	3.08	0.0031
<i>Winogradskyella</i>	ELL	0.0322	3.08	0.0029
<i>Limnobacter</i>	ELL	0.0025	3.08	0.0016
PB19	S	0.0220	3.06	0.0020
Candidatus_Tenderia	ELL	0.0329	3.05	0.0021
NS11-				
12_marine_group	S	0.0322	3.05	0.0018
Eel-36e1D6	ELL	0.0191	3.04	0.0015
AqS1	ELL	0.0487	3.03	0.0019
<i>Peredibacter</i>	S	0.0097	3.03	0.0018
<i>Arenicella</i>	S	0.0299	3.01	0.0019
<i>Nitrospina</i>	ELL	0.0353	3.01	0.0016
Subgroup_22	S	0.0143	2.99	0.0054
Thiothrix	S	0.0299	2.98	0.0013
SEEP-SRB1	S	0.0299	2.96	0.0015
Vampirovibrionales	ELL	0.0487	2.96	0.0015
<i>Phycisphaera</i>	ELL	0.0358	2.95	0.0018
Xenococcus_PCC-				
7305	S	0.0299	2.89	0.0017
Blrii41	ELL	0.0381	2.87	0.0018
<i>Flexithrix</i>	S	0.0299	2.86	0.0011
<i>Oceanospirillum</i>	ELL	0.0158	2.84	0.0017
<i>Aureispira</i>	ELL	0.0025	2.82	0.0012
<i>Rubripirellula</i>	S	0.0097	2.80	0.0013
<i>Sunxiuqinia</i>	ELL	0.0434	2.77	0.0020