



**Centro de Investigación en Alimentación
y Desarrollo, A.C.**

**CARACTERIZACIÓN DE LA COMUNIDAD BACTERIANA
DEL CORAL *POCILLOPORA CAPITATA* DE LOS
PARCHES CORALINOS DE MANZANILLO, COLIMA.**

**Por:
Lic. María de los Angeles Milagros Laurel Sandoval**

TESIS APROBADA POR LA:
UNIDAD MAZATLÁN
EN ACUICULTURA Y MANEJO AMBIENTAL

Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS

Mazatlán, Sinaloa.

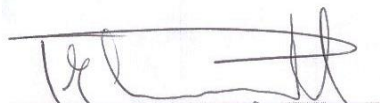
Enero, 2014

APROBACIÓN Y FIRMAS

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de María de los Angeles Milagros Laurel Sandoval, le han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



Dra. Sonia Araceli Soto Rodríguez
Director de Tesis



Dr. Marco Agustín Liñán Cabello
Asesor



Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala
Asesor



Dra. Silvia Alejandra García Gasca
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado durante mi maestría en el CIAD, así como también por la beca mixta asignada para la realización de la estancia en la Universidad del Estado de San Diego (SDSU).

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), por permitirme la oportunidad de llevar a cabo mis estudios de maestría en su programa de posgrado.

A mi directora de tesis la Dra. Sonia Araceli Soto Rodríguez por su confianza y apoyo en la realización de esta tesis, agradeciéndole sus aportaciones y tiempo para alcanzar esta meta.

Al Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala por cada una de sus aportaciones, su apoyo, tiempo y confianza para realizar este tipo de investigaciones.

Al Dr. Marco Agustín Liñán Cabello porque a pesar del tiempo y distancia siempre esta para apoyarme y aconsejarme cuando lo necesito.

A los miembros de mi comité la Dra. Silvia Alejandra García Gasca por cada una de sus aportaciones, consejos y tiempo durante la realización de este trabajo.

A la Dra Elizabeth Dinsdale e integrantes del departamento de Biología de SDSU por recibirme en su laboratorio, así como también por compartir algo de su conocimiento, brindarme su amistad y apoyo durante mi estancia.

A cada uno de mis profesores que formaron parte de mi formación académica durante el posgrado, gracias por compartir un poco de su conocimiento, apoyo y confianza. En especial al Dr. Pablo Almazán Rueda, por su apoyo brindado durante la maestría.

A la M. en C. Ma. del Carmén Bolán por sus consejos, apoyo y confianza que me ha brindado durante la realización de este trabajo.

A la M. en C. Rubí Hernández por su apoyo y consejos para el desarrollo de algunas de las técnicas y desempeño en el laboratorio.

A los Achichinkles del BacterLab Karen, Ana, Karlita, Yoshkar, Erick, Jorge y en especial a Adrián y July, muchas gracias por su amistad, por todos los buenos recuerdos y momentos que hemos pasado.

A la Dra. Itzel Sifuentes Romero, mil gracias por su amistad, apoyo, consejos, palabras y buenos momentos que me brindó y por ayudarme en el proceso de secuenciación.

A Cathy, Carlos, Rodrigo, Patsy, Julia, Africa, Asahel, Yazmín, Daniel, Emir, Iliana y Anny, gracias por su amistad y su apoyo.

DEDICATORIA

“Cuando menos lo esperamos, la vida nos coloca delante un desafío que pone a prueba nuestro coraje y nuestra voluntad de cambio.”

Paulo Coelho

Con todo el amor de mi corazón para el amor de mi vida y la luz de mis ojos, mi hija **Iztli Itayetz** por enseñarme a levantarme de cada uno de los retos que la vida nos pone enfrente y darme fuerzas para salir adelante. Te amo mi princesa hermosa.

A mi mamá **María de los Angeles** que a pesar de todos mis errores siempre está para apoyarme, quererme y creer en mí aún cuando yo no sea capaz de hacerlo. Mil gracias por tu amor y por estar conmigo. Te amo mami.

A mi papá **Raúl**, gracias por apoyarme y estar conmigo aunque no sea en presencia cuando te he necesitado me has escuchado y apoyado. Te quiero papá.

A mi pequeña hermana **Montserrat del Rocio**, gracias por apoyarme a pesar de nuestras diferencias. Te quiero hermanita.

Con mucho amor, admiración y respeto es para ustedes mi familia. Los amo!

CONTENIDO

Lista de Figuras	viii
Lista de Tablas	xii
Resumen	xiv
Abstract	xv
I.INTRODUCCIÓN	1
II.ANTECEDENTES	5
2.1Blanqueamiento: Generalidades, causas y consecuencias.....	5
2.2Estudios previos en la zona	6
2.3Generalidades en las comunidades bacterianas en corales.....	7
2.4Vibrios asociados al blanqueamiento	9
2.5Técnicas moleculares de diagnóstico.....	10
III.OBJETIVOS	17
3.1Objetivo General.....	17
3.2Objetivos Específicos.....	17
IV.HIPÓTESIS	18
V.METODOLOGÍA	19
5.1Área de Estudio	19
5.2Colecta de Muestras	20
5.3Extracción de ADN _{met}	20
5.3.1Extracción de Tejido y Mucus	20
5.3.2Extracción de ADN	21
5.3.3Cálculo de la Concentración y Pureza de ADN	23
5.3.4Amplificación del gen 16S ARNr por PCR.....	23
5.3.5Purificación de librerías.....	25
5.4Secuenciación masiva	26
5.5Análisis Bioinformático.....	26
5.6Análisis Estadístico	27
VI.RESULTADOS	29

6.1 Muestreo.....	29
6.2 Extracción de ADN _{met}	30
6.3 Secuenciación masiva	33
6.3.1 Cuantificación de las librerías	33
6.3.2 Cargado del Chip e ISP's.....	34
6.3.3 Reporte de Secuencias de Ion Torrent PGM	36
6.4 Análisis Bioinformático.....	36
6.4.1 QIIME	39
6.4.2 Ribosomal Database Project (RDP Classifier)	54
6.5 Análisis Estadístico	76
6.6 Índices Ecológicos	88
VII. DISCUSIONES.....	94
VIII. CONCLUSIONES.....	105
IX. RECOMENDACIONES	106
X. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	107
XI. ANEXOS	116
Anexo 1. Preparación de reactivos	116
Anexo 2. Secuenciación masiva	117
Anexo 3. Comandos usados para el análisis con QIIME	121
Anexo 4. Taxas identificados a nivel clase por QIIME	122
Anexo 5. Taxas identificados a nivel orden por QIIME	123
Anexo 6. Taxas identificados a nivel familia por QIIME	124
Anexo 7. Taxas identificados a nivel género por QIIME	125
Anexo 8. Taxas identificados a nivel clase por RDP Classifier	126
Anexo 9. Taxas identificados a nivel orden por RDP Classifier	127
Anexo 10. Taxas identificados a nivel familia por RDP Classifier	129
Anexo 11. Taxas identificados a nivel género por RDP Classifier	132

LISTADO DE FIGURAS

Figura

Página

1. Anatomía de un pólipos de coral escleractino (tomado de <http://herramientas.educa.madrid.org>).....2
2. Tarjeta Coral Health Chart, para el monitoreo in situ de los estados de salud coralina.....3
3. Estructura del tejido del coral *Oculina patagonica*, estructuras donde se encuentran presentes las bacterias en el coral (tomado de Rosenberg et al., 2007).....8
4. Diagrama de flujo de los protocolos con los cuales trabaja QIIME.....15
5. Localización de los sitios de muestreo de las comunidades arrecifales La Boquita (puntos amarillos) y Bahía Carrizales (puntos rojos) de Manzanillo, Colima.....19
6. Diagrama de flujo del análisis bioinformático de las muestras de mucus y pólipos del coral *P. capitata*.....28
7. a) Fotografías de los arrecifes Bahía Carrizales, b) arrecife La Boquita en la Bahía de Santiago, Colima, México tomadas durante el muestreo de verano 2012 (Fotos de Oscar Hernández Rovelo).....30
8. Fotografía del gel de agarosa al 0.8% de la verificación de la extracción de ADN.....30
9. Fotografía del gel de agarosa al 2% de la amplificación del gen 16S ARNr de las muestras de pólipos con su respectivo barcode.....33

10 a) Imagen del cargado del chip 314 perteneciente a las muestras del mucus de coral derivada del reporte de Ion Torrent. b) Imagen del cargado del chip 314 perteneciente a las muestras de los pólipos de coral derivada del reporte de Ion Torrent.....	35
11. Curvas de rarefacción del número de OTU's identificadas con respecto al número de secuencias presentes en las muestras de La Boquita y Bahía Carrizales.....	40
12 Curvas de rarefacción del número de OTU's asignadas al número de secuencias que se obtuvieron por muestras a) pólipos. b) mucus.....	41
13. Gráfica de proporción de secuencias clasificadas como bacterias y no clasificadas de las 36 muestras de mucus y pólipos de corales de los arrecifes de Manzanillo, Colima. El número 1, 2 y 3 representan las réplicas, y, D2, D4 y D6 representan el grado de salud de acuerdo al CoralWatch.....	43
14. Estructura bacteriana del coral <i>P. capitata</i> a nivel phyla de las 36 muestras de mucus y pólipos de corales de los arrecifes de Manzanillo, Colima. El número 1, 2 y 3 representan las réplicas, y, D2, D4 y D6 representan el grado de salud de acuerdo al CoralWatch.....	45
15. Estructura bacteriana del coral <i>P. capitata</i> a nivel clase de las 36 muestras de mucus y pólipos de corales de los arrecifes de Manzanillo, Colima. El número 1, 2 y 3 representan las réplicas, y, D2, D4 y D6 representan el grado de salud de acuerdo al CoralWatch.....	48
16. Estructura bacteriana del coral <i>P. capitata</i> a nivel orden de las 36 muestras de mucus y pólipos de corales de los arrecifes de Manzanillo, Colima. El número 1, 2 y 3 representan las réplicas, y, D2, D4 y D6 representan el grado de salud de acuerdo al CoralWatch.....	49
17. Estructura bacteriana del coral <i>P. capitata</i> a nivel familia de las 36 muestras de mucus y pólipos de corales de los arrecifes de Manzanillo, Colima. El número 1, 2 y 3 representan las réplicas, y, D2, D4 y D6 representan el grado de salud de acuerdo al CoralWatch.....	51
18. Estructura bacteriana del coral <i>P. capitata</i> a nivel dominio de las 36 muestras de mucus y pólipos de corales de los arrecifes de Manzanillo, Colima.	

El número 1, 2 y 3 representan las réplicas, y, D2, D4 y D6 representan el grado de salud de acuerdo al CoralWatch.....	55
19. Estructura bacteriana del coral <i>P. capitata</i> a nivel phyla de las 36 muestras de mucus y pólipos de corales de los arrecifes de Manzanillo, Colima. El número 1, 2 y 3 representan las réplicas, y, D2, D4 y D6 representan el grado de salud de acuerdo al CoralWatch.....	58
20. Estructura bacteriana del coral <i>P. capitata</i> a nivel clase de las 36 muestras de mucus y pólipos de corales de los arrecifes de Manzanillo, Colima. El número 1, 2 y 3 representan las réplicas, y, D2, D4 y D6 representan el grado de salud de acuerdo al CoralWatch.....	60
21. Estructura bacteriana del coral <i>P. capitata</i> a nivel orden de las 36 muestras de mucus y pólipos de corales de los arrecifes de Manzanillo, Colima. El número 1, 2 y 3 representan las réplicas, y, D2, D4 y D6 representan el grado de salud de acuerdo al CoralWatch.....	62
22. Estructura bacteriana del coral <i>P. capitata</i> a nivel orden de las 36 muestras de mucus y pólipos de corales de los arrecifes de Manzanillo, Colima. El número 1, 2 y 3 representan las réplicas, y, D2, D4 y D6 representan el grado de salud de acuerdo al CoralWatch.....	64
23. Estructura bacteriana general a nivel genero del coral <i>P. capitata</i> de las muestras de mucus y pólipos a) La Boquita. b) Bahía Carrizales.....	69
24. Estructura bacteriana general a nivel genero del coral <i>P. capitata</i> de las muestras de mucus de acuerdo al grado de salud de La Boquita y Bahía Carrizales.....	72
25. Estructura bacteriana general a nivel genero del coral <i>P. capitata</i> de las muestras de pólipos de acuerdo al grado de salud de La Boquita y Bahía Carrizales.....	73
26. Porcentajes de abundancia de OTUs a nivel género obtenidos mediante el programa RDP Classifier de las muestras de mucus y pólipos de La Boquita; a) Serratia, b) Burkholderia, c) Francisella y d) Unidentified.....	74
27. Porcentaje de abundancia de OTUs a nivel género obtenidos mediante el programa RDP Classifier de las muestras de mucus y pólipos de Bahía	

Carrizales; a) <i>Serratia</i> , b) <i>Burkholderia</i> , c) <i>Francisella</i> , d) <i>Chlorobium</i> y e) Unidentified.....	75
28. Distribución de la comunidad bacteriana en las muestras en el análisis de componentes principales de acuerdo al grado de salud; los círculos indican el D2, los cuadros D4 y los triángulos representan el grado D6.....	77
29. Diferencias significativas del phylum <i>Proteobacteria</i> de acuerdo a su abundancia en las muestras de mucus y pólipos ($p < 0.05$).....	78
30. Diferencias significativas del género <i>Serratia</i> de acuerdo a su abundancia en las muestras de mucus y pólipos ($p < 0.05$).....	79
31. Diferencias significativas entre los sitios de muestreo La Boquita (SB) y Bahía Carrizales (SC) a nivel phylum: a) <i>Acidobacteria</i> . b) <i>Bacteroidetes</i> c) <i>Cyanobacteria/Chloroplast</i> d) <i>Verrucomicrobia</i> ($p < 0.05$).....	81
32. Diferencias significativas entre los sitios de muestreo La Boquita (SB) y Bahía Carrizales (SC) a nivel género: a) <i>Francisella</i> . b) <i>Lactococcus</i> c) <i>Ulviabacter</i> ($p < 0.05$).....	82
33. Diferencias significativas entre los grados de salud 2 (coral enfermo), 4 (intermedio) y 6 (coral sano): a) del dominio Bacteria. b) del grupo Unidentified ($p < 0.05$).....	83
34. Diferencias significativas entre los grados de salud 2 (coral enfermo), 4 (intermedio) y 6 (coral sano) a nivel género: a) <i>Serratia</i> . b) <i>Delftia</i> c) <i>Prevotella</i> ($p < 0.05$).....	84

LISTADO DE TABLAS

Tabla	Página
1. Componentes de los primers 338F y 533R.....	23
2. Protocolo PCR.....	24
3. Programa del termociclador.....	25
4. Pureza y concentración de ADN de las muestras de mucus.....	31
5. Pureza y concentración de ADN de las muestras de pólipos.....	32
6. Cuantificación por Qubit de las muestras de mucus y pólipos de los dos sitios de muestreo.....	34
7. Porcentaje de celdas con ISPs de las muestras de mucus y pólipos de ambas localidades.....	36
8. Listado de secuencias viables de las muestras de mucus de La Boquita y Bahía Carrizales.....	37
9. Listado de secuencias viables de las muestras de mucus de La Boquita y Bahía Carrizales.....	38
10. Número de taxas identificados con su respectivo número de secuencias...44	
11. Taxas abundantes según RDP Classifier del coral P. capita de acuerdo al sitio de muestreo, tipo de tejido y grado de salud coralina.....	52
12. Número de taxas presentes en cada clasificación taxonómica tanto de las Arqueas como Bacterias.....	56
13. Taxas abundantes según QIIME del coral P. capita de acuerdo al sitio de muestreo, tipo de tejido y grado de salud coralina.....	65
14. Número de taxas que presentan diferencias significativas en cada una de las variables independientes y clasificación taxonómica.....	76
15. Índices ecológicos de las muestras de mucus de La Boquita y Bahía Carrizales de acuerdo al grado de salud D2 (coral afectado), D4 (intermedio) y D6 (coral sano).....	86

16. Índices ecológicos de las muestras de pólipos de La Boquita y Bahía Carrizales de acuerdo al grado de salud D2 (coral afectado), D4 (intermedio) y D6 (coral sano).....	88
17. Índices ecológicos de todas las muestras de mucus de La Boquita y Bahía Carrizales de acuerdo al grado de salud D2 (coral afectado), D4 (intermedio) y D6 (coral sano).....	89
18. Índices ecológicos de las muestras de mucus y pólipos del coral <i>P. capitata</i> derivado del arrecife La Boquita en los tres grados de salud coralina (D2, D4 y D6) a nivel género.....	89
19. Índices ecológicos de las muestras de mucus y pólipos del coral <i>P. capitata</i> derivado del arrecife La Boquita en los tres grados de salud coralina (D2, D4 y D6) a nivel género.....	90
20. Índices ecológicos de todas las muestras de pólipos de La Boquita y Bahía Carrizales de acuerdo al grado de salud D2 (coral afectado), D4 (intermedio) y D6 (coral sano).....	92
21. Índices ecológicos de todas las muestras de pólipos de La Boquita y Bahía Carrizales de acuerdo al grado de salud D2 (coral afectado), D4 (intermedio) y D6 (coral sano).....	92
22. Índices ecológicos de las muestras de acuerdo al sitio (La Boquita y Bahía Carrizales), al grado de salud D2 (coral afectado), D4 (intermedio) y D6 (coral sano) y al tipo de tejido (mucus y pólipos).....	93

RESUMEN

Las principales comunidades arrecifales en la costa de Colima, México son La Boquita y Bahía Carrizales en donde las especies más abundantes pertenecen al género *Pocillopora*. La condición de salud coralina de La Boquita ha sido reportada como en estado crítico de deterioro, contrario a Carrizales cuyo estado es aceptable; por lo cual el presente trabajo tiene como objetivo caracterizar las poblaciones microbianas del coral *Pocillopora capitata* de las dos áreas mediante la secuenciación del gen 16S ARNr. Se colectaron 18 fragmentos de tres condiciones de salud de cada localidad de acuerdo al criterio descrito en Coral Health Chart: coral enfermo (D2), intermedio (D4) y sano (D6) y se obtuvo una muestra de mucus y de pólipos de cada fragmento colectado. Se crearon librerías amplificando la región V3 del gen 16S ARNr con ADN metagenómico mediante el uso de marcadores moleculares acoplados a un código de barras para la identificación de cada muestra. La secuenciación de las librerías se llevó a cabo con ayuda del secuenciador masivo PGM de Ion Torrent® (Life Technologies). El análisis bioinformático de las secuencias se realizó con el programa QIIME y RDP Classifier y se clasificaron en unidades taxonómicas operacionales (OTUs). La asignación taxonómica se empleó para calcular los índices ecológicos y hacer comparaciones múltiples entre la condición de salud, el tipo de muestra y el sitio de muestreo mediante el uso de los programas. Se obtuvieron 906,563 lecturas de 158 pb en promedio. El género estadísticamente más abundante fue *Serratia* en muestras de mucus y en estadio D2, además de *Burkholderia*, *Chlorobium* y *Francisella*. La mayor diversidad se encontró en organismos en D4 y la menor diversidad en D2. Este trabajo representa el primero de su tipo y sienta las bases para estudios futuros.

Palabras clave: *Pocillopora capitata*, comunidad microbiana, 16S ARNr, secuenciación masiva, arrecife coralino, salud coralina.

ABSTRACT

La Boquita and Carrizales Bay are the most important community coral reefs on the coast of Colima (Mexico) where the most abundant coral species belong to the genus *Pocillopora*. In recent years, the health condition of both reefs has been evaluated; while Carrizales has been considered a healthy reef, La Boquita was found to be in a critical state of degradation. It has been shown that the microbial community present in healthy corals differs from that of disease ones. Therefore, the aim of this work was to characterize the microbial community of *Pocillopora capitata* from La Boquita and Carrizales reefs using a metagenomic approach. From each site, we collected eighteen fragments of three different health conditions according to the Coral Health Chart: diseased (D2), intermediate (D4), and healthy (D6). A sample of mucus and polyps were taken from each fragment. Barcoded amplicon libraries were generated using PCR primers that amplify the 16S rRNA V3 region. Eighteen barcode sequences were used in order to identify each sample. Sequencing of libraries was performed using the Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) sequencer (Life Technologies). 906,563 sequences were obtained and were classified in Operational Taxonomic Units (OTUs) using the software QIIME and RDP Classifier. Taxonomic assignments were used to calculate the ecological indices and also to perform multiple comparisons among the sampling area, health condition, and sample origin (mucus vs polyps). The most abundant genus was *Serratia* (in mucus and D2 health condition) followed by *Burkholderia*, *Chlorobium* and *Francisella*. The highest diversity was found in organisms with D4 health condition and the lowest in D2. This is a pionner work in Mexico about coral health using metagenomic analysis, and could be the basis for future studies.

Keywords: *Pocillopora capitata*, microbial community, 16S rRNA, massive secuencing, coral reef, coral health.

I. INTRODUCCIÓN

Los organismos conocidos como corales escleractinos (corales duros) son especies hermatípticas, que se encuentran en las zonas tropicales de aguas claras y someras a una profundidad de 0-25 m alrededor del mundo. Lo que conforma estas estructuras son agrupaciones de pólipos que tienen la capacidad de fijar calcio en sus tejidos y que presentan una relación simbiótica con dinoflagelados del género *Symbiodinium*, comúnmente llamados zooxantelas, que le proporcionan el color y realizan el proceso de fotosíntesis utilizando la luz solar, bióxido de carbono (CO_2), nitrógeno y fósforo (Papina et al., 2003).

La relación que existe entre el coral y las zooxantelas se debe a la producción de glucosa, aminoácidos y glicerol a partir de la fotosíntesis, la cual es utilizada como fuente de energía necesaria para la formación del esqueleto de carbonato de calcio (CaCO_3). Como los corales requieren oxígeno disuelto comienzan a producir dióxido de carbono (CO_2) y agua, y por medio de la respiración producen nitrógeno y fósforo el cual funciona como nutriente para los organismos simbioses. Otra razón importante de la relación simbiótica, se debe a que los corales, conformados por un esqueleto duro, sirven de protección para las pólipos y zooxantelas evitando que sean depredados por erizos y estrellas de mar del género *Acanthaster* (Figura1) (Douglas, 2003).

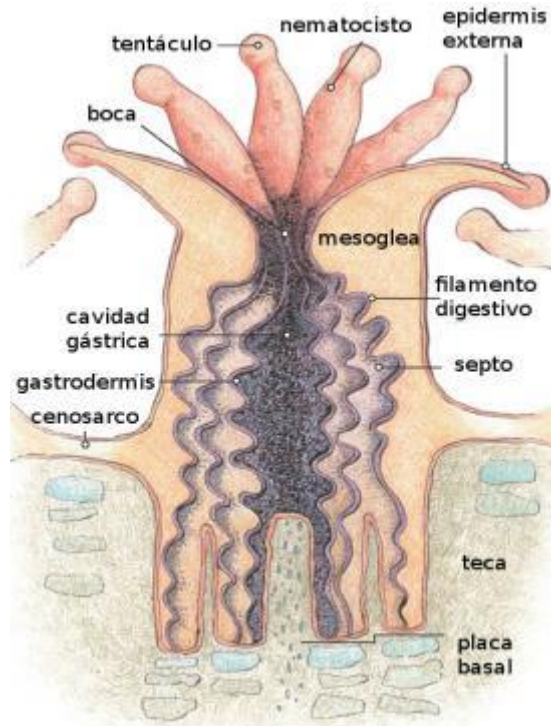


Figura 1. Anatomía de un pólipo de coral escleractino (tomado de <http://herramientas.educa.madrid.org>).

La pérdida de la relación simbiótica tiene como consecuencia el fenómeno conocido como blanqueamiento del coral que consiste en la expulsión de zooxantelas que produce la pérdida de coloración del coral por el decremento en la concentración de pigmentos fotosintéticos (Sánchez et al., 2005). Este fenómeno puede ser causado por factores abióticos naturales que incluyen cambios de temperatura, salinidad, radiación solar, y los factores abióticos antropogénicos como la sedimentación, la sobrepesca, presencia de aguas residuales, presión turística, entre otros (Douglas, 2003; Liñán-Cabello et al., 2006). Sin embargo, los corales también dependen de factores bióticos como las zooxantelas, los protistas (*Thraustochytrids*) y los procariontes (arqueobacterias, bacterias y virus) (Rosenberg et al., 2007). De estos microorganismos las bacterias juegan un rol importante para la salud del coral, ya que bacterias que se encuentran presentes en el mucus tienden a ser benéficas por su capacidad para fijar nitrógeno, sintetizar polisacáridos complejos, productoras de antibióticos y regulan la comunidad microbiana del coral. Sin embargo, existen otras bacterias que pueden estar presentes en el

mucus, en la cavidad gastrodérmica e incluso en el esqueleto de carbonato de calcio del coral que inducen al blanqueamiento y como consecuencia causar la muerte del coral (Ritchie, 2006; Rosenberg et al., 2007).

Una forma de evaluar el grado de salud coralina *in situ* fue propuesta por Siebeck et al. (2006), quienes propusieron la tarjeta Coral Watch Health, técnica que consiste en una tarjeta comparativa sumergible la cual utiliza 6 escalas de brillantez/saturación de luz con cuatro tonos de color o morfotipos para registrar el estado de salud (Figura 2). Este sistema se ha utilizado por organizaciones mundiales y proyectos de investigación para la evaluación del grado de salud de ecosistemas arrecifales (Fabricius, 2006; <http://www.coralwatch.org/>). Las especies empleadas en la generación de la tarjeta este estudio fueron *P. damicornis*, *Montipora digitata*, *Stylophora pistillata* y *Platygyra daedelea*.



Figura 2. Tarjeta Coral Health Chart, para el monitoreo *in situ* de los estados de salud coralina.

Sin embargo, como esta técnica solo mide el grado de decoloración como un indicador aparente de la densidad zooxantelar; por lo tanto se requieren técnicas más precisas y especializadas para tener un mejor entendimiento de estos ecosistemas.

Las comunidades microbianas son muy importantes en la salud de corales ya que bajo ciertas condiciones fisiológicas la presencia de estos microorganismos puede modificar la estructura de las comunidades arrecifales al ser benéficas o patógenos causantes de enfermedades; entre las que

podemos encontrar banda negra, puntos blancos, banda blanca, mancha amarilla, entre otras (Patterson et al., 2002; Cervino et al., 2004; Richardson et al., 2004). Por lo antes mencionado, es necesario realizar estudios que permitan caracterizar las poblaciones de bacterias presentes en los ecosistemas coralinos que se encuentran bajo un estado de estrés crónico respecto a comunidades con mejor condición fisiológica y conocer el rol que representan las bacterias en estos ecosistemas. El objetivo del presente trabajo es caracterizar la comunidad microbiana del coral *Pocillopora capitata* de los arrecifes de La Boquita y Bahía Carrizales, Colima por estimación de la biodiversidad y abundancia de poblaciones bacterianas durante el verano mediante técnicas genómicas. Este estudio es uno de los pioneros en emplear la secuenciación masiva en estudio de corales como herramienta de la metagenómica, lo que implica conocer las comunidades bacterianas a partir de la amplificación del 16S ARNr de las muestras de coral sin la necesidad de hacer cultivos bacterianos de los tejidos y podría ser la base de investigaciones futuras en el conocimiento de la microbiota de corales.

II. ANTECEDENTES

2.1 Blanqueamiento: Generalidades

La pérdida de la relación simbiótica entre el pólipo y el dinoflagelado es el fenómeno conocido como blanqueamiento coralino que depende de factores abióticos y bióticos; sin embargo, es posible que también dependa del tipo de clado asociado al género *Symbiodinium* presente en el coral afectando su resistencia al blanqueamiento. Douglas (2003) reconoce que en este género se presentan variaciones moleculares considerables en los genes del ARN ribosomal, agrupándose en dos clados, el ribotipo A, y el otro incluye desde el B hasta el F. Los ribotipos A y B son cosmopolitas por lo que se encuentran altamente distribuidos a través del Atlántico e Indo Pacífico, aunque el ribotipo C es poco común y posiblemente ausente en altas latitudes (>35-40°). En este mismo estudio se reconoció que el ribotipo C característico de las especies *Montastrea* el cual tiende a ser más sensible al blanqueamiento cuando se expone a elevadas temperaturas e irradiancia.

En la actividad metabólica de un coral saludable interactúan el simbiote y el pólipo para contribuir al crecimiento, reproducción del pólipo de coral y resistencia a morir del simbiote (Rosenberg et al., 2009). Sin embargo, debido a las lesiones que se presenta en el coral bajo el estado de blanqueamiento, Stedman (2005) y Rosenberg et al. (2009) consideran este fenómeno como una enfermedad, ya que es un proceso que tiene como resultado daño tisular o alteraciones en sus funciones fisiológicas produciendo signos visibles, como la reducción del mucus, pérdida del tejido e inhibición en la reproducción sexual, lo que puede ocasionar la muerte del coral.

2.2 Estudios previos en la zona de estudio

En México se han realizado diversos estudios orientados a conocer el estado de salud de ecosistemas arrecifales, los factores que ocasionan la pérdida de estos nichos ecológicos y el grado de afectación que presentan, coincidiendo que los efectores naturales, en especial el incremento de la temperatura es la principal causa de la decoloración en corales y por lo tanto del blanqueamiento (Marinés et al., 2005; Liñán-Cabello et al., 2006; 2008); sin embargo, específicamente para el Pacífico Oriental, el aporte de sedimentos llega a ser un factor importante que impacta sobre las comunidades coralinas, ya que la sedimentación conlleva a la pérdida de cobertura (Reyes-Bonilla et al., 2002;); sin embargo, también este puede provocar eutrofización en la zona afectando las capacidades de regeneración y crecimiento sometiendo al coral a un estado de estrés constante y por ende al blanqueamiento.

Reyes-Bonilla et al. (2005) durante un estudio en ecosistemas arrecifales del Pacífico Mexicano clasificaron las especies presentes de cada nicho; encontrando que para las comunidades coralinas de Colima incluidas las Islas Revillagigedo y los arrecifes La Boquita y Bahía Carrizales las especies de mayor abundancia son *Pocillopora capitata*, *P. damicornis* y *P. verrucosa*. El

parche de La Boquita que se encuentra cerca de la franja costera es uno de los más afectados debido a la presión turística y aportes sedimentarios por parte de la boca de la Laguna Juluapan; el segundo parche coralino Bahía Carrizales menos impactado por el turismo comienza a presentar signos de afectación, y el tercero es la comunidad coralina que se encuentra en las Islas Revillagigedo, que por su difícil acceso es poco probable que sea impactado por efectores antropogénicos (Liñán-Cabello et al., 2006; Liñán-Cabello 2008).

Zacarías-Salinas (2007) en el verano del 2004 reportó 16% de blanqueamiento en el arrecife La Boquita, mientras que en el ecosistema de Bahía Carrizales de 8.68%. Entre los factores bióticos que han sido reconocidos en estudios previos para las zonas anteriormente mencionados se encuentran el sobrecrecimiento de algas (*Ulva* spp, *Bossiella* spp y *Corallina* spp), bioerosión por parte de los peces (*Stegastes acapulcoensis*, *Thalassoma lucasanum*, *Holacanthus passer* y *Microspathodon dorsalis*) y el incremento en la radiación solar; por otro lado los factores antropogénicos reconocidos son los aportes sedimentarios, eutrofización, mal anclaje y turismo que impactan a los arrecifes degradando sus condiciones fisiológicas y por ende afectando su salud (Laurel-Sandoval, 2010; Muñiz-Anguiano 2013).

Recientes investigaciones en las zonas de estudio están encaminados a conocer de manera *in vitro* la respuesta fisiológica del coral *P. capitata* al estrés oxidativo asociado a variaciones de pH para entender los efectos de la acidificación del océano y la habilidad de respuesta del coral hacia estos cambios a través de marcadores moleculares. Por otro lado, se han evaluado técnicas de restauración, así como también los indicadores ecológicos y fisiológicos que permitan reconocer la viabilidad de las técnicas y la capacidad de regeneración y sobrevivencia del coral (Muñiz-Anguiano, 2013; Soriano-Santiago, 2013).

2.3 Generalidades de las comunidades bacterianas en corales.

La condición fisiológica del coral no solo depende de factores físicos sino también de los microorganismos presentes, como los protistas (*Thraustochytrids*), los procariontes (bacterias, arqueobacterias) y virus (Rosenberg et al., 2007); las bacterias presentan un foco de interés ya que pueden ser benéficas o patógenas para los ecosistemas arrecifales y se pueden encontrar en tres partes de la estructura del coral (Figura 3). Una de ellas es en la capa superficial del mucus que generalmente presenta bacterias benéficas que pueden ser fijadoras de nitrógeno o sintetizadores de quitina; otra es la cavidad gastrodérmica, y por último en el esqueleto de carbonato de calcio donde generalmente se encuentran bacterias que tienden a ocasionar daños fisiológicos y físicos en la estructura llevando al coral a un estado de blanqueamiento y por ende a la muerte (Bourne et al., 2005; Rosenberg et al., 2007).

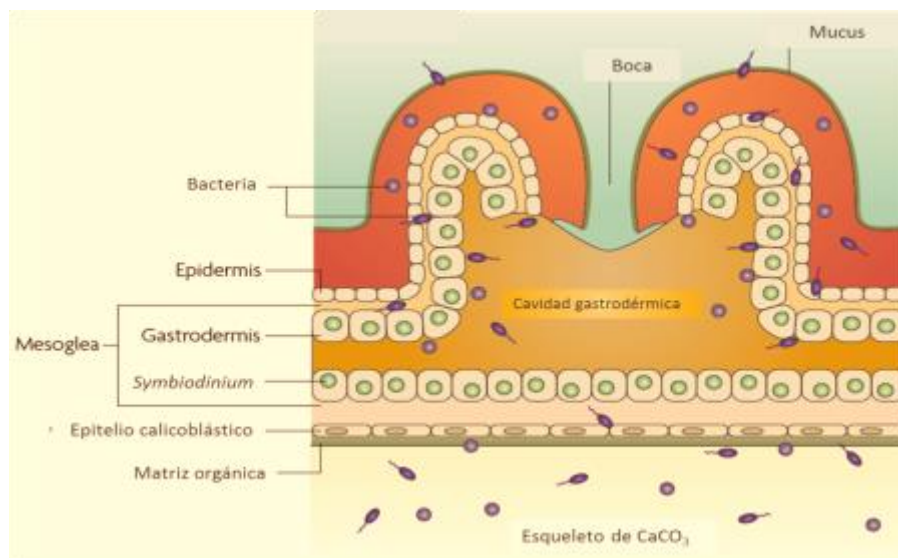


Figura 3. Estructura del tejido del coral *Oculina patagonica*, donde pueden estar presentes las bacterias (tomado de Rosenberg et al., 2007).

Por su naturaleza estos organismos secretan mucus, el cual funciona como capa protectora o como un mecanismo de alimentación para el coral

(Hubbard y Pocock, 1972; Lewis y Price, 1975). Este mucus es rico en proteínas, lípidos y polisacáridos, entre los últimos se encuentra la mucina, la cual le da la consistencia gelatinosa y puede contener glucosa, galactosa, glucosamina, galactosamina y arabinosa (Ducklow y Mitchell, 1979). Debido a la riqueza de compuestos que presenta el mucus lo hace un sustrato ideal para el crecimiento de bacterias benéficas en su mayoría. Bourne y Munn (2005) reconocen la diversidad bacteriana asociada al coral *Pocillopora damicornis*, encontrando que en tejido del coral las bacterias presentes son de la clase γ -proteobacterias (entre las que podemos encontrar las familias *Vibrionaceae*, *Enterobacteriaceae* y *Alteromonadaceae*), en cambio en el mucus las bacterias presentes son α -proteobacterias, *Cyanobacteria* y *Actinobacteria*. Kooperman et al. 2007 estudiaron los beneficios de las bacterias en el mucus del coral *Fugia granulosa*, encontrando que en organismos cultivados en laboratorio y del medio natural las bacterias más abundantes pertenecen a las α -proteobacterias, las cuales son en su mayoría fijadoras de nitrógeno. Por otro lado, Shnit-Orland y Kushmaro (2008) buscaron reconocer las bacterias asociadas a la actividad antibacterial entre ellas la clase γ -proteobacterias, los phyla *Firmicutes* y *Actinomycetes* y de bacterias aisladas reconocieron los géneros *Vibrio*, *Pseudoalteromonas*, *Shewanella* y *Acinetobacter*. Luna et al. (2010) encontraron comunidades microbianas viables presentes en corales sanos los géneros *Corynebacterium*, *Kocuria*, *Psychrobacter*, *Roseomonas* y *Salinibacter*, mientras que los géneros *Aerococcus*, *Agrococcus*, *Arthrobacter*, *Knoellia*, *Staphylococcus*, *Jeotgalicoccus*, *Microbacterium* y *Paracoccus* en corales enfermos y una mayor densidad de bacterias del género *Vibrio*.

2.4 Vibrios asociados al blanqueamiento

A pesar de existir conocimientos sobre las comunidades bacterianas presentes en los corales, las que presentan una mayor importancia son del género *Vibrio* porque han sido encontradas principalmente en corales bajo un

estado de decoloración o blanqueamiento. Ben-Haim et al. (2003) concluyeron que en organismos blanqueados de *P. damicornis* la infección por *V. coralliilyticus* es dependiente de la temperatura, debajo de los 22°C no se presentan signos de afectación del coral, de 24-26°C la infección resulta en blanqueamiento y de 27-29°C la infección causa una rápida pérdida del tejido y por consecuencia la muerte de coral. El principal factor de virulencia de *V. coralliilyticus* es una proteasa extracelular producida a temperaturas superiores a 26°C. En la misma especie de coral, Luna et al. (2007) coinciden que la pérdida de tejido se encuentra asociada a la presencia de bacterias del género *Vibrio*. Rosenberg y Falkovitz (2004) demostraron que la infección de *V. shiloi* en *Oculina patagonica* es quimiotáctica al mucus del coral (por la presencia del receptor β -galactosidasa, que es único en corales zooxantelados). Ritchie (2006) durante un evento de blanqueamiento logró extraer tejido sano del coral *Acropora palmata* y encontró que el coral carecía de bacterias benéficas sugiriendo que probablemente estas eran reemplazadas por bacterias del género *Vibrio*.

2.5 Uso de técnicas moleculares en Ecología Microbiana

En la actualidad para el estudio de las comunidades microbianas se utilizan herramientas moleculares, teniendo un alto impacto en la comunidad científica pues proporcionan mayor calidad y permiten la identificación de las especies bacterianas a nivel de secuencias de ADN y ARN que a su vez permiten reconocer las modificaciones en su contenido. Una de las herramientas moleculares más utilizadas para los estudios de filogenia y taxonomía bacteriana es la secuencia del gen 16S ARNr (de aproximadamente 1500pb), conocida como un cronómetro universal, es decir, presente en todas las bacterias ya que no ha cambiado a lo largo del tiempo (Rodicio et al., 2004). Una característica de este gen es que posee regiones variables y conservadas, donde las más utilizadas para estudios de caracterización de comunidades

microbianas son las regiones variables V3-V6 debido al amplio rango de bases que abarcan obteniendo una mejor caracterización de cada secuencia permitiendo así una mejor diferenciación de especies (Huse et al., 2008; Wu et al., 2012).

De los primeros estudios de diversidad bacteriana en corales donde se aplicó la técnica de Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización (DGGE por sus siglas en inglés), por secuenciación del 16S ADNr a partir de cultivos independientes fue el trabajo de Rohwer et al. (2001), quienes caracterizaron la microbiota procarionte de *Montastraea franksi* encontrando una elevada abundancia de cianobacterias y α -proteobacterias. Frías-López et al. (2002) describieron los patrones de las comunidades bacterianas entre el agua de mar y corales sanos, con enfermedad de la banda negra y la superficie de corales muertos por medio de amplificación por PCR del gen 16S ARNr con primers universales y secuenciación del 16S rDNA identificando 524 secuencias asociadas a 12 divisiones bacterianas, entre las cuales se encuentra *Clostridium* spp., *Arcobacter* spp., *Campylobacter* spp., *Cytophaga fermentans*, *Cytophaga columnaris* y *Trichodesmium tenue*.

Sin embargo, la técnica de DGGE está comenzando a ser obsoleta en estudio de las comunidades microbianas, debido a que nuevas tecnologías innovadoras y accesibles como las plataformas de secuenciación masiva entre las que se encuentran el 454 de Roche, el Solexa de Illumina y uno de las más recientes es el PGM (Personal Genome Machine) Ion Torrent de Life Technologies. La secuenciación masiva significa obtener miles e incluso millones de secuencias de fragmentos cortos (target sequence) de una o varias muestras en una sola corrida o bien miles de bases de una secuencia que corresponden a un genoma completo (Whole-genome sequence) de una especie en particular. Estas tecnologías pueden ser empleadas principalmente para dos tipos de estudios, cuando se quiere conocer el genoma completo de un microorganismo se requiere fragmentar el ADN y luego volver a unir las secuencias individualmente para ensamblar el genoma; y cuando se secuencia

parte de un gen o secuencia objetivo, en este caso se requiere amplificar la región que se quiere secuenciar utilizando primers que llevan acoplados adaptadores donde uno de ellos funciona como primer para las reacciones de amplificación, cuantificación y secuenciación de los fragmentos de ADN en cambio el otro adaptador su función es unirse a un sustrato (en este caso las ISPs) en algunos casos códigos de barras que se utilizan para identificar cada muestra (Withley et al., 2012).

Hay una gran variedad de estudios que emplean la secuenciación masiva por ejemplo para conocer la diversidad bacteriana sin usar medios artificiales ya que no todas las bacterias existentes crecen en estos medios por esta razón surge la metagenómica que es el estudio de las comunidades microbianas a partir de la extracción de todo el ADN de una muestra ambiental, para después amplificar únicamente el gen 16S ARNr por PCR, por lo que no se requiere el cultivo de los microorganismos en medios artificiales. Con este tipo de técnicas se han encontrado especies no cultivables, también es posible conocer las funciones e interacciones que tiene la comunidad microbiana con los hábitats que ocupan (Handelsman, 2007; Turnbaugh and Gordon, 2008; Simon and Daniel, 2011; Thomas et al., 2012).

En este caso estamos proponiendo el uso de la secuenciación masiva del gen 16S ARNr para evaluar la comunidad de bacterias utilizando el Ion Personal Genome Machine (PGM™) de Life Technologies™, una de las tecnologías más recientes, simple, escalable. La tecnología Ion Torrent™ utiliza sensores basados en semiconductores para llevar a cabo mediciones en tiempo real de iones de hidrógeno, que se producen durante el proceso de secuenciación al incorporarse los nucleótidos complementarios a cada una de las cadenas molde (Rothberg et al., 2011). La combinación de fluido, micromaquina y la tecnología de semiconductores permite la traducción directa de la información genética (ADN) a la información digital y genera rápidamente muchos datos de alta calidad. Básicamente el flujo del trabajo de la plataforma del PGM de Ion Torrent™ comienza con la creación de la librería de ADN o

ARN, una vez terminada esta fase, se requiere inmovilizar los fragmentos a secuenciar sobre un sustrato específico (conocidas como ISPs) permitiendo la amplificación clonal por PCR de emulsión (ePCR) y su posterior enriquecimiento para llevar a cabo el proceso de secuenciación. Las lecturas hechas por el secuenciador se transfieren automáticamente al servidor Torrent, en donde las señales iónicas se convierten en las bases y se almacenan en archivos estándares de la industria SFF (Standard Flowgram Format File por sus siglas en inglés) o FASTQ. El formato SFF es un archivo en formato binario que contiene los resultados de todas las lecturas de las secuencias de las muestras; en cambio el formato FASTQ es un archivo en formato texto conformado por la descripción de la secuencia en una sola línea (FASTA) usando símbolos IUPAC y la calidad de cada base de cada secuencia (Q derivado de Quality score) ambos archivos son derivados de las plataformas de secuenciación masiva. Por lo anterior se requiere realizar un análisis bioinformático empleando programas que permitan describir y procesar los datos obtenidos en este formato.

Los datos que generan los secuenciadores masivos son realmente las secuencias de ADN que se amplificaron, por lo que se requieren varios programas en el proceso bioinformático. Primero se necesita la limpieza de secuencias entre los que podemos encontrar programas en línea (Deconseq, Tagcleaner, entre otros) o programas que requieren instalarse (CLC Sequence Viewer, Geneious) para eliminar secuencias no útiles para el análisis (por ejemplo secuencias 18S, primers forward y reverse, los códigos de barra y los adaptadores). Luego emplear otros programas que permitan asociar una secuencia de ADN a una Unidad Operacional Taxonómica (OTUs por sus siglas en inglés). Por otro lado para estimar los parámetros ecológicos se necesitan programas que estimen la composición de las comunidades microbianas, entre otras funciones, que dependen del estudio que se esté realizando. Wu et al. (2012) emplean el programa Ribosomal Database Project Classifier (RDP) cuya base de datos para asignar taxonómicamente una secuencia de ADN a una especie es NCBI (National Center for Biotechnology Information) y presenta un

umbral de confianza del 80%, incrementando la proporción de secuencias que son correctamente clasificadas a nivel género; empleando este programa ellos describieron la composición de la comunidad bacteriana del rumen bovino a partir de la pirosecuenciación del gen 16S ARNr, obteniendo un total de 21 phylum, 31 clases, 91 familias, 219 géneros y 1079 OTUs. La Unidad Operacional Taxonómica (OTU) es un término que se aplica para identificar algo que ha sido investigado, este puede ser un individuo, especie, género, cepa, etc.

Otro programa que ha sido empleado y recomendado para análisis de datos metagenómicos principalmente de comunidades microbiales derivados de plataformas de secuenciación masiva es el QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) con funciones completas que permiten comparar y analizar los datos de comunidades microbianas (hongos, bacterias, virus y arqueas) para describir las estructuras de las comunidades de manera gráfica y textual (Caporaso et al., 2010; Caporaso et al., 2012; Witheley et al., 2012). Básicamente para el análisis de la información se utilizan tres protocolos, el primero representa la revisión de las bases de datos necesarios para el desarrollo de QIIME, estos archivos son las secuencias (.fna) y el mapping file (.txt) que es generado por el usuario y que debe contener el nombre de cada muestra, la secuencia del barcode para cada muestra, la secuencia del linker/primer que se utilizó para amplificar y una descripción. El protocolo 2 consiste en seleccionar las Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs por sus siglas en inglés) comparándola con cada una de las secuencias y selecciona las más representativas, proporciona las asignaciones taxonómicas y construye una tabla, así como también proporciona la abundancia de cada OTU en las muestras. Por último el protocolo 3 con el cual se pueden analizar el índice ecológico de diversidad α y generar curvas de rarefacción que representan la diversidad de la muestra contra la profundidad de secuenciación (Kuezyński et al., 2011). En resumen, en la figura 4 se muestran los protocolos básicos con los que trabaja QIIME, así como los componentes de cada uno de los protocolos.

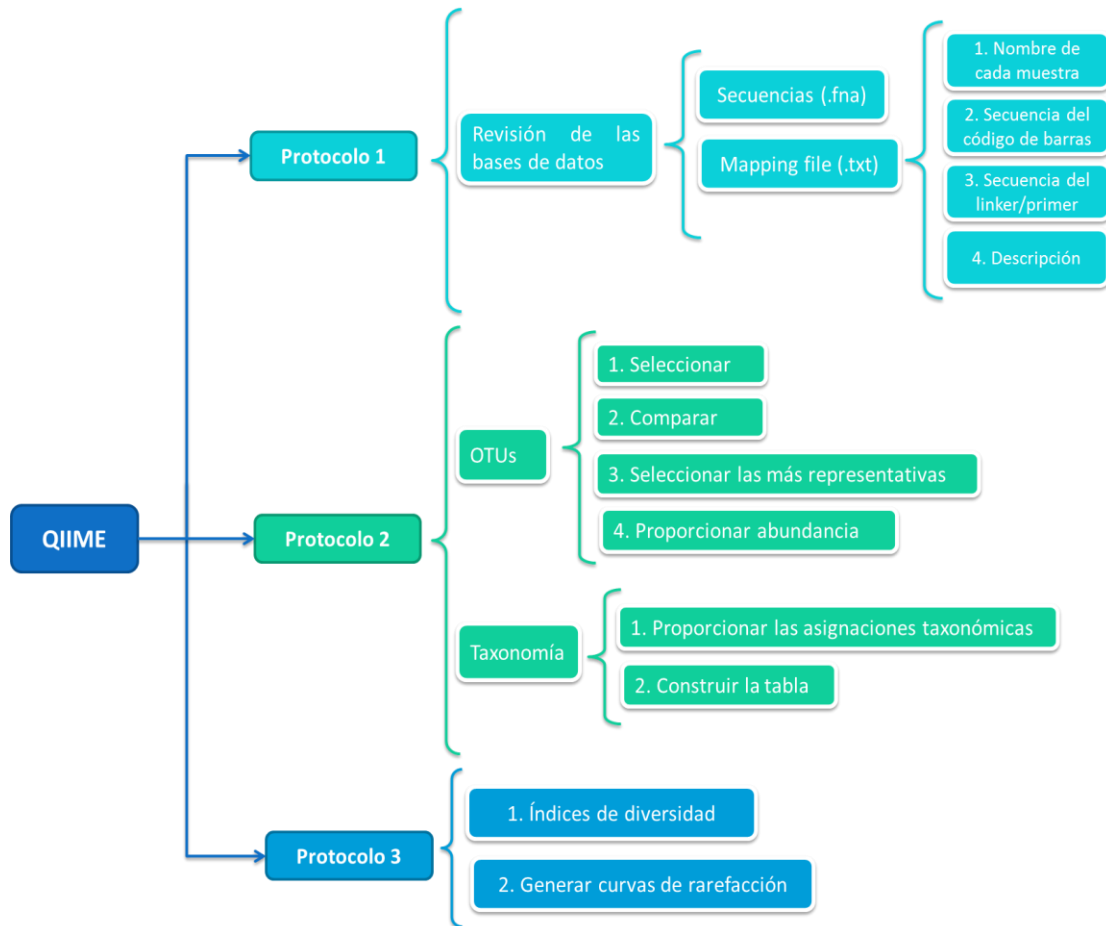


Figura 4. Diagrama de flujo de los protocolos del programa QIIME.

En México, a la fecha, no existen estudios que estén encaminados a conocer las comunidades microbianas en los ecosistemas arrecifales debido a que la prioridad ha sido conocer los factores naturales o antropogénicos que los afectan. De manera particular en los arrecifes de Manzanillo, Colima, como previamente se había descrito se han enfocado a conocer el estado de salud coralina para implementar programas de restauración de las zonas de mayor importancia. Estudios recientes en las zonas estuvieron encaminados en conocer la respuesta fisiológica al estrés oxidativo del coral *Pocillopora capitata* asociado a variaciones de pH en el agua de mar (Soriano-Santiago, 2011; Delgadillo-Nuño, 2012). Sin embargo, ninguno de estos estudios relaciona la comunidad microbiana con los arrecifes coralinos, por esto el presente estudio

trata de conocer la diversidad bacteriana en los ecosistemas arrecifales La Boquita y Bahía Carrizales empleando la plataforma de secuenciación masiva del gen 16S rRNA de Life Technologies.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Caracterizar la comunidad bacteriana del coral *Pocillopora capitata* de los parches coralinos de Manzanillo, Colima.

3.2 Objetivos Específicos

1. Identificar las bacterias presentes en organismos de *Pocillopora capitata* con diferentes grados de salud y dos tipos de tejido recolectados de dos comunidades arrecifales de la Bahía de Manzanillo.
2. Comparar las comunidades bacterianas de cada muestra de acuerdo al grado de salud coralina, tipo de tejido y sitio de muestreo.

IV. HIPOTESIS

La comunidad bacteriana del coral *Pocillopora capitata* de los parches arrecifales de Manzanillo, Colima será diferente dependiendo del grado de salud del mismo.

V. METODOLOGÍA

5.1 Área de estudio

Las zonas seleccionadas fueron los parches coralinos La Boquita ($19^{\circ}12.25'N$, $104^{\circ}28.52'W$) y Bahía Carrizales ($19^{\circ}05'50.90''N$ y $104^{\circ}26'15.68''W$). El primero ubicado dentro de la Bahía de Santiago en Manzanillo, Colima, cuenta con una extensión de $3,876\text{ m}^2$ y profundidades promedio de 3.5 m , se encuentra expuesto a un nivel elevado de estrés lumínico, así como también debido a los aportes sedimentarios y presión turística por lo que resulta en un parche coralino impactado (Figura 5.). En cambio el segundo esta ubicado a 7 km de La Boquita entre la península de Juluapan y Carrizales, tiene una extensión coralina de $14,050\text{ m}^2$ y es un sitio mediamente expuesto a factores estresantes (Liñán-Cabello et al., 2006; Zacarías-Salinas, 2007; Liñán-Cabello et al., 2008).



Figura 5. Localización de los sitios de muestreo de las comunidades arrecifales La Boquita (puntos amarillos) y Bahía Carrizales (puntos rojos) de Manzanillo, Colima.

5.2 Colecta de muestras

Las muestras fueron colectadas durante el verano de 2012 mediante buceo autónomo colectando un cabezal de *Pocillopora capitata* con sus respectivas réplicas a una distancia de 3 m entre réplica. De cada cabezal se tomaron tres fragmentos por cada estado de salud de acuerdo a la escala Coral Watch (D2, D4 y D6), a los cuales se les extrajo el mucus y tejido (pólipos) de cada fragmento colectado para cada área de estudio (La Boquita y Bahía Carrizales) obteniendo un total de 18 fragmentos. En superficie los fragmentos fueron lavados con agua de mar filtrada y esterilizada (AME), cubiertos con papel aluminio y colocados en hieleras completamente cubiertas para evitar cualquier interferencia lumínica que pueda provocar estrés y afectar el estado fisiológico de las muestras o bien evitar la producción del mucus. En el laboratorio de la Facultad de Ciencias Marinas de Manzanillo, Colima se almacenaron las muestras a -20°C. La extracción de tejido y mucus se realizó bajo condiciones de asepsia para evitar la contaminación de las muestras.

5.3 Extracción de ADN metagenómico (ADN_{met})

5.3.1 Obtención de tejido y mucus.

Se empleó la técnica de Siebeck et al. (2006) con algunas modificaciones para la limpieza de los corales. Primeramente cada fragmento se lavó con AME para eliminar epifitas y epibiontes y evitar contaminación bacteriana de otros medios; luego se descongeló la muestra a temperatura ambiente para inducir al coral a producir el mucus. El mucus se extrajo con algunas modificaciones en la metodología de Kellogg (2004), se hizo un raspado con una navaja y aguja de jeringa, ambas estériles. Después de obtener el mucus, se procedió a extraer el tejido (los pólipos) mediante el método WaterPik™ modificada de Johannes y

Wiebe (1970). El tejido se removió con aire a presión empleando una bomba de vacío a máxima presión hasta que se removió por completo el tejido a temperatura ambiente. Ambos tipos de muestras fueron colectados en tubos nuevos estériles de 1.5 ml y preservados en 1.5 ml de solución EDTA-DMSO pH 8.0. De esta forma fueron transportados al Laboratorio de Bacteriología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) Unidad Mazatlán y almacenados a -80°C.

5.3.2 Extracción de ADN_{met}

Uno de los aspectos más importantes para el proceso de secuenciación masiva es la pureza y concentración de ADN metagómico (ADN_{met}). Se utilizó el kit de extracción QiAmp[®] DNA Minikit siguiendo el protocolo de acuerdo al fabricante con modificaciones para este tipo de estudio:

1. Se pesó un promedio de 210 mg de muestras de mucus y 280 mg para las muestras de pólipos y se colocaron en tubos de 1.5 ml nuevos y estériles.
2. Se les agregó a cada tubo 100µl de suero fisiológico al 0.85% y pH 5.5, se centrifugaron a 6000 rpm, durante 60 seg a temperatura ambiente y se decantó el sobrenadante, repitiendo este proceso dos veces para lavar la muestra y eliminar la solución EDTA-DMSO pH 8.0.
3. Se agregaron 50 µl de PBS (ver anexo 1) y se homogenizo.
4. Se adicionaron 100 µl de ATL (buffer de lisis que permite el rompimiento de células y tejidos y contiene proteinasa K Qiagen[®]) y 20 µl de proteinasa K, se agitó en vortex e incubó a 56°C durante 2:30 hrs.
5. Se centrifugó a temperatura ambiente por 30 seg a 6000 rpm y adicionó 20 µl de RNAsa, se agitó 20 seg en vortex-pulso 20 seg e incubó a

temperatura ambiente por 3 min y se centrifugó nuevamente a 6000 rpm por 30 seg y a temperatura ambiente.

6. Se adicionaron 200 μ l de Buffer AL (buffer de lisis que contiene proteasa Qiagen[®] para aislar el ADN), se agitó 20 seg en vortex-pulso e incubó a 70°C por 10 min y se centrifugó a 6000 rpm por 30 seg y a temperatura ambiente.
7. Se adicionaron 200 μ l de etanol al 96%, se agitó 20 seg en vortex-pulso y centrifugó a 6000 rpm por 30 seg y a temperatura ambiente.
8. Se transfirió todo a las columnas y tubos de recolección de 2ml con filtro de silica incluidos en el kit Qiagen[®] y centrifugó a 8000 rpm durante 3 min a temperatura ambiente.
9. Se transfirió la columna a un nuevo tubo de 2 ml y descartó el otro.
10. Se adicionaron 500 μ l de Buffer AW1 (buffer de lavado concentrado) sin tocar las paredes del tubo y centrifugó a 8500 rpm por 3 min a temperatura ambiente.
11. Se transfirió la columna a un nuevo tubo y descartó el otro, se adicionaron 500 μ l de Buffer AW2 (buffer de lavado concentrado) y centrifugó a 14000 rpm por 5 min.
12. Se decantó el filtrado y centrifugó a máxima velocidad por 3 min.
13. Se pasó la columna a un tubo de 1.5 ml y descartó el de 2 ml.
14. Finalmente se adicionaron 25 μ l de agua ultrafiltrada a 18 M Ω para resuspender el pellet, se incubó a temperatura ambiente por un minuto y centrifugó a 8000 rpm por 2 min (dos veces).
15. El ADN se almacenó a 4°C hasta su uso.
16. Para verificar la calidad del ADN se corrió un gel de agarosa al 0.8% en buffer TAE 0.5X a 90 volts y 500 mAmp por 35min.

5.3.3 Cálculo de la concentración y pureza de ADN.

Se calculó la concentración de ADN por medio de espectrofotometría, a partir de la lectura de la absorbancia a 260 nm aplicando la metodología siguiente.

Preparación de las diluciones para la lectura:

1. Se diluyeron las muestras 1:100 en agua estéril (se midieron 5 µl de ADN en 495 µl de agua esteril).
2. Se midió la absorbancia a 260nm y 280nm, así como también la relación 260/280nm, utilizando el espectrofotómetro SmartSpec™ 3000 de BioRad.
3. Una vez obtenidas las absorbancias, se calculó la concentración de ADN con la siguiente fórmula:

$$\frac{(Abs_{260nm}) \times (Factor\ de\ dilución) \times 50}{1000} = \mu g/\mu l\ ADN$$

4. La pureza del ADN se conoce espectrofotométricamente a través de la relación Abs₂₆₀/280nm y se considera como ADN de buena calidad cuando la proporción entre ambos es de 1.7-1.9.

5.3.4 Amplificación del gen 16S ARNr por PCR.

Se amplificó una región de 190 pb correspondiente a la región V3 del gen 16S rRNA (Huse et al., 2008). Se usaron los primers 338F que contiene un código de barras (BC) y cuya longitud de este es de 10-12pb y el 533R (Tabla 1). Los productos de PCR amplificados corresponden a las librerías empleadas en la secuenciación masiva.

Tabla 1. Componentes de los primers 338F y 533R

Fusion A	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
trP1 primer	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT

Linker	Gat
Huse V3 338F	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG
Huse V3 533R	TTACCGCGGCTGCTGGCAC

Primer forward (Fusion A+ barcode+ linker+ Primer 338F):

CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTAAGGTAAgatACTCCTACGGGAGG
CAGCAG = 62 pb

Primer reverse (Primer 533+ trP1):

CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATTTACCGCGGCTGCTGGCAC = 42 pb

Procedimiento:

1. Se preparó una mezcla maestra de PCR por cada barcode (BC) (Tabla 2).

Tabla 2. Protocolo para preparar la mezcla maestra para amplificar el gen 16S ARNr por PCR

Reactivo	Concentración	Volumen 1x (µl)
Agua 18MΩ		18.46
Buffer 10X		1.32
dNTP's	200µM	2.5
Primer 338F	34µM (0.25µg/µl)	0.26
Primer 533R	34µM (0.25µg/µl)	0.26
Titanium® Taq DNA Polymerasa (Clontech®)		0.2
Volumen de la reacción		23
ADN		2
Volumen final		25

2. De la mezcla maestra se separaron 23µl para llevar cada reacción a 25µl, adicionalmente se toman 11.5µl tanto para el control positivo como para el negativo. Como positivo se utilizó ADN CAIM 1408 correspondiente a *Vibrio cholerae*.
3. Se utilizó el siguiente programa en el termociclador.

Tabla 3. Programa del termociclador

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	No. ciclos
Desnaturalización	95	5	1
	95	0:35	45
Alineación	56	0:35	45
Extensión	68	1:30	45
Extensión final	68	10	
	12	A	

4. Se preparó un gel de agarosa al 2% en Buffer TAE 0.5X.
5. Se adicionó 0.8 µl de gel Red (Promega®), se dejó polimerizar.
6. Se cargó el gel con 4µl de producto de PCR y 2µl de marcador de peso molecular (1Kb DNA Ladder, Promega®).
7. La electroforesis se corrió a 90 V y 500 mAmp por 35min a temp ambiente

5.3.5 Purificación de las librerías

Una vez obtenidos los productos de PCR se procedió a purificarlos utilizando el AxygenPrep-PCR® column kit.

1. A los 20 μl de PCR se le adicionaron 100 μl de Buffer PCR-A 3X y se agito en vortex.
2. Se transfirió la mezcla a la columna de PCR en un tubo de 1.5ml y centrifugó a 15000 g por 5min.
3. Se descartó el filtrado y se retornó la columna del PCR al tubo.
4. Se midieron 700 μl de Buffer W2 en la columna y se centrifugó a 15000Xg por 7 min.
5. Se descartó el filtrado y se retorna la columna al tubo.
6. Se adicionaron 400 μl de Buffer W2 y centrifugó a 15000Xg por 5 min.
7. Se descartó el filtrado y se centrifugó a 15000Xg por 3min.
8. Se dejó secar la columna en la campana de flujo laminar durante 40 min.
9. Una vez secas las columnas se adicionaron 20 μl de agua libre de nucleasas.
10. Se incubaron durante 1 min y centrifugaron a 12000Xg por 3 min.
11. Se almacenaron a 4°C hasta su uso.

5.4 Secuenciación masiva

Para el proceso de secunciación primeramente se preparó un templado que contenía todas las muestras previamente amplificadas y llevadas a una misma concentración equimolar. Después el templado se preparó inmovilizando los fragmentos a secuenciar sobre un sustrato específico el cual permitió la amplificación clonal (ePCR) y su posterior enriquecimiento. Se lavó el secuenciador, se cargó el templado en el chip 314 y se secuenció; para ver la metodología completa véase anexo 2.

5.5 Análisis bioinformático

Una vez obtenidos los archivos en formato FASTQ se unieron en un sólo archivo las secuenciaciones de mucus y pólipos para luego eliminar todas las secuencias 18S que se hayan amplificado, por lo que primero se utilizó el software en línea DECONSEQ (<http://deconseq.sourceforge.net/>) utilizando un

97% de cobertura y un 98% de identidad. Una vez obtenido el archivo en formato fasta el cual a diferencia del FASTQ este sólo contiene las bases de las secuencias obtenidas, fue usado otro software en línea TagCleaner (<http://tagcleaner.sourceforge.net/>) para eliminar los primers forward y reverse y obtener nuevamente un archivo en formato fasta. Usando el CLC Sequence Viewer cuyo programa tiene una gran variedad de herramientas bioinformáticas para el análisis, edición y visualización gráfica de secuencias. Con este programa se eliminaron todas las secuencias menores a 100 pb que son secuencias no útiles ya que la región V3 del gen 16S ARNr es un fragmento de 100-200 pb. Debido a los requerimientos del software que se empleó para el análisis de las secuencias, el archivo de formato fasta fue convertido al formato fna. Finalmente se utilizaron dos programas para obtener las OTUs, la asignación taxonómica correspondiente y los índices de diversidad α y β , y a su vez comparar la calidad de asignación taxonómica de cada uno de los programas; el primero QIIME (<http://qiime.org/>) a través de una serie de comandos ya establecidos en una terminal (véase anexo 3). El segundo RDP Classifier con un intervalo de confianza de 98%. Una vez identificadas las secuencias se aceptaron como ideales aquellas que asignaciones taxonómicas que presentaran un valor ≥ 0.5 . De igual manera se utilizó el programa Biodiversity Pro para calcular los índices ecológicos de las muestras. Véase el diagrama del flujo de trabajo del análisis bioinformático en la figura 6.

5.6 Análisis estadístico

Para conocer si existen diferencias significativas entre las muestras de mucus y pólipos, en ambos sitios de muestreo La Boquita y Carrizales, el grado de salud coralina y así como también entre los grupos de bacterias encontrados se utilizó el programa STAMP (Statistical Analysis of Metagenomic Profiles) el cual realiza pruebas de normalidad y homocedasticidad a la tabla de OTUs de acuerdo a su clasificación taxonómica con un nivel de significancia del 95% de confianza. Para el análisis de varianza se utilizó como variable dependiente la abundancia representada como un porcentaje de secuencias y como variables

independientes se tienen el grado de salud coralina, el sitio de muestreo y el tipo de muestra (mucus y pólipos). En la siguiente figura se muestra el diagrama del flujo de trabajo del análisis bioinformático desde que se obtuvieron los archivos en formato FASTQ hasta el análisis estadístico.

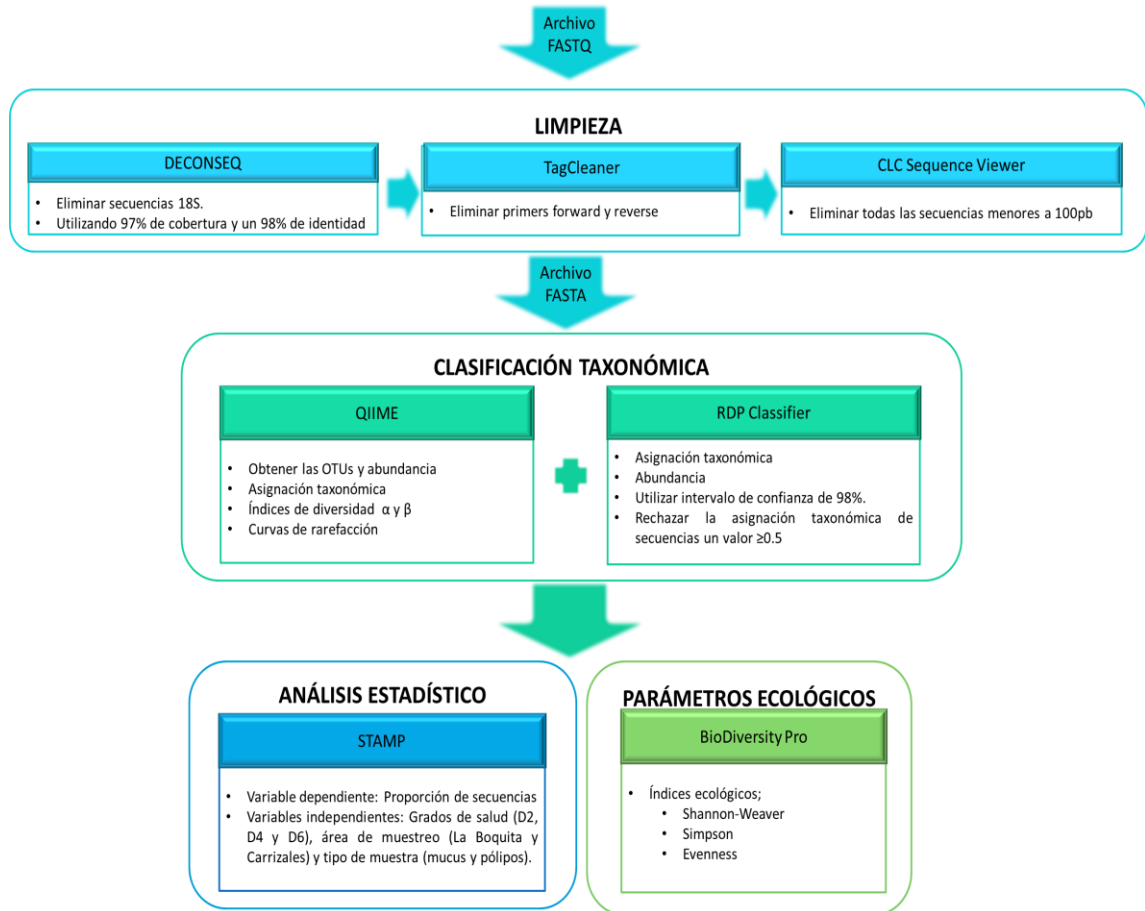


Figura 6. Diagrama de flujo del análisis bioinformático empleado en este trabajo con las secuencias obtenidas de las muestras de mucus y pólipos del coral *P. capitata*.

VI. RESULTADOS

Para cubrir el primer objetivo que fue identificar las bacterias presentes en los organismos de *Pocillopora capitata* con diferentes grados de salud recolectados de dos arrecifes de la Bahía de Manzanillo se requiere describir los resultados obtenidos del muestreo, la extracción de ADNmet, la calidad de la secuenciación masiva y parte del análisis bioinformático, tal y como se mostrará a continuación.

6.1 Muestreo

Se colectaron un total de 18 fragmentos de coral de dos comunidades arrecifales de la Bahía de Manzanillo; La Boquita (2 m de profundidad) y Carrizales (5m de profundidad), basándose en el Coral Health Chart se recolectaron organismos que presentaron grados de salud D2, D4 y D6. Durante el muestreo la temperatura en La Boquita fue de 29.9°C y la de Carrizales de 29.7°C. En el arrecife de Bahía Carrizales se podían observar claramente los corales desde la superficie, en cambio en La Boquita se presentó menor visibilidad (Fig. 7).



Figura 7. a) Fotografías de los arrecifes Bahía Carrizales, b) arrecife La Boquita en la Bahía de Santiago, Colima, Mexico tomadas durante el muestreo de verano 2012

6.2 Extracción de ADNmet

Después de la colecta se obtuvieron 36 muestras de mucus y pólipos a las cuales se les hicieron extracciones de ADNmet por medio del QiAmp[®] DNA Minikit modificando las especificaciones del fabricante. Debido al tipo de tejido de los corales, se aumentó la cantidad de muestra a 210mg para el mucus y 280mg para los pólipos. El ADN de cada una de las muestras se corrió en un gel de agarosa al 0.8% para verificar visualmente la la calidad de la extracción de ADN de las muestras (Fig. 8).

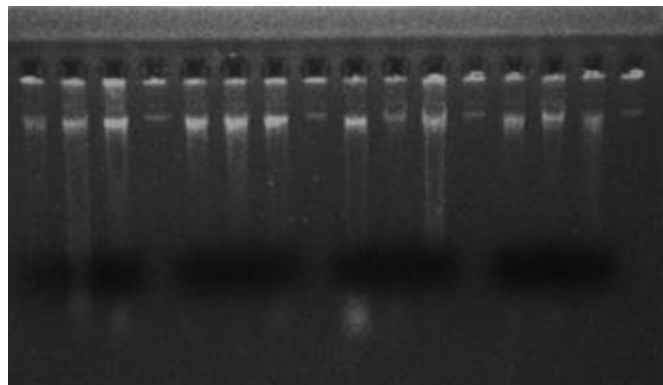


Figura 8. Fotografía del gel de agarosa al 0.8% para evaluar la calidad de ADN de las muestras de pólipos del coral *P. Capitata*.

La tabla 4 muestra los valores obtenidos de pureza y concentración de ADN. En las muestras de mucus de La Boquita el valor promedio de pureza fue de 1.443 con un intervalo de 1.072-1.751 y la concentración de 0.134 $\mu\text{g/ml}$; sin embargo para Bahía Carrizales los valores promedio fueron mayores (pureza 1.564) con un intervalo de 1.284-1.848, concentración (0.202 $\mu\text{g/ml}$). Los valores promedio de pureza no son los óptimos pero son aceptables debido a la complejidad de las extracciones. La concentración de ADN fue adecuada ya que para el proceso de secuenciación se requieren valores mayores a 0.100 $\mu\text{g/ml}$.

Tabla 4. Pureza y concentración de ADN de las muestras de mucus del coral *P. capitata* de las comunidades coralinas de Manzanillo, Colima.

Clave	Abs 260	Abs 280	Pureza (260/280)	Concentración de ADN ($\mu\text{g/ml}$)
SB12M	0.021	0.014	1.496	0.105
SB14M	0.033	0.020	1.700	0.165
SB16M	0.035	0.020	1.751	0.175
SB22M	0.027	0.018	1.522	0.135
SB24M	0.029	0.021	1.360	0.145
SB26M	0.011	0.009	1.148	0.055
SB32M	0.039	0.028	1.204	0.195
SB34M	0.021	0.019	1.072	0.105
SB36M	0.025	0.015	1.733	0.125
SC12M	0.028	0.021	1.373	0.140
SC14M	0.045	0.034	1.339	0.225
SC16M	0.033	0.022	1.510	0.165
SC22M	0.046	0.036	1.284	0.230
SC24M	0.037	0.022	1.634	0.185
SC26M	0.043	0.024	1.804	0.215
SC32M	0.040	0.025	1.560	0.200
SC34M	0.038	0.020	1.848	0.190
SC36M	0.054	0.031	1.728	0.270

La clave de las muestras significa lo siguiente: la S corresponde a la temporada que es verano, la B o C al lugar de procedencia (La Boquita o Bahía Carrizales), el número siguiente (1,2 y 3) corresponde al número de la réplica; y el ultimo numero (2, 4 y 6) el grado de salud. La M corresponde a las muestras de mucus y la P a las muestras de pólipos.

En las muestras de los pólipos el valor promedio de la pureza de las muestras (tabla 5) de La Boquita fue 1.658 con un intervalo de 1.220-1.974 a comparación con el de Carrizales (1.582) cuyo intervalo fue 1.368-1.833, pero las concentraciones de los pólipos fueron menores 0.158 $\mu\text{g/ml}$ para el primer sitio de muestreo y 0.236 $\mu\text{g/ml}$ para el segundo (Tabla 5). En las muestras de pólipos la pureza de ADN mejoró e incluso la concentración de ADN fue mayor que las observadas en las muestras de mucus.

Tabla 5. Pureza y concentración de ADN de las muestras de pólipos del coral *P. capitata* de las comunidades coralinas de Manzanillo, Colima.

Clave	Abs 260	Abs 280	Pureza (260/280)	Concentración de ADN ($\mu\text{g/ml}$)
SB12P	0.037	0.023	1.657	0.185
SB14P	0.033	0.017	1.939	0.165
SB16P	0.037	0.023	1.657	0.185
SB22P	0.054	0.032	1.702	0.270
SB24P	0.016	0.013	1.220	0.080
SB26P	0.025	0.016	1.605	0.125
SB32P	0.029	0.023	1.241	0.145
SB34P	0.027	0.014	1.974	0.135
SB36P	0.026	0.018	1.923	0.130
SC12P	0.053	0.029	1.833	0.265
SC14P	0.041	0.023	1.747	0.205
SC16P	0.047	0.033	1.426	0.235
SC22P	0.043	0.029	1.490	0.215
SC24P	0.051	0.037	1.368	0.255
SC26P	0.059	0.041	1.428	0.295
SC32P	0.039	0.023	1.690	0.195
SC34P	0.045	0.029	1.546	0.225
SC36P	0.046	0.027	1.709	0.230

La clave de las muestras significa lo siguiente: la S corresponde a la temporada que es verano, la B o C al lugar de procedencia (La Boquita o Bahía Carrizales), el número siguiente (1,2 y 3) corresponde al número de la réplica; y el ultimo numero (2, 4 y 6) el grado de salud. La M corresponde a las muestras de mucus y la P a las muestras de pólipos

Una vez que fueron hechos los cálculos de las concentraciones de ADN se procedió a amplificar la región V3 del gen 16S de todas las muestras utilizando los primers diseñados que amplifican entre 100-200pb. En este caso se obtuvo una amplificación de 158 pb (Fig. 9); se muestra la fotografía del gel de agarosa al 2% con el cual se puede ver la amplificación del gen 16S ARNr de las muestras de pólipos, como control positivo se utilizó CAIM 1408 (*Vibrio cholerae*) y negativo la master mix, así como su marcador de peso molecular de 100 pb.

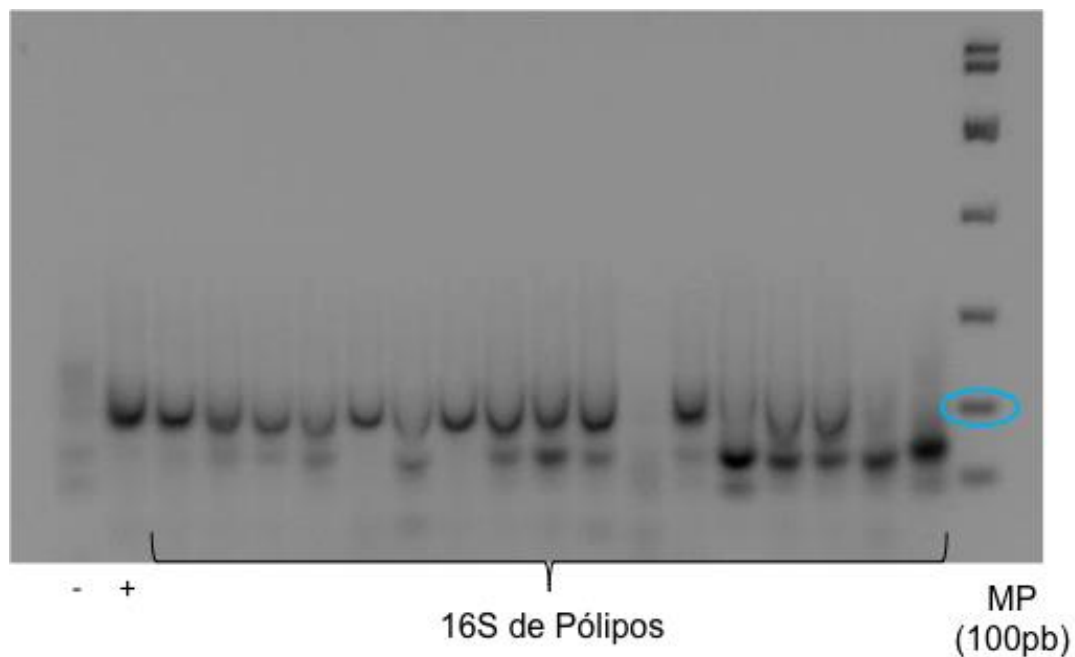


Figura 9. Fotografía del gel de agarosa al 2% de la amplificación de la región V3 del gen 16S ARNr con su código de barras de las muestras de pólipos. Control positivo ADN CAIM 1408 (*Vibrio cholerae*) y control negativo la mezcla maestra.

6.3 Secuenciación Masiva

6.3.1 Cuantificación de las librerías

El protocolo para la cuantificación de las librerías se hace generalmente por qPCR; sin embargo, éste se realizó por medio del Qubit® debido a que las diluciones no se ajustaban a la curva estándar. Las mayores concentraciones se encontraron en las muestras de mucus de La Boquita y las menores en las muestras de pólipos de Bahía Carrizales (tabla 6).

Tabla 6. Cuantificación de las librerías de las muestras de mucus y pólipos del coral *P. capitata* de los dos sitios de muestreo.

Muestra	Qubit (ng/ml)	Muestra	Qubit (ng/ml)
SB12M	13,500	SB12P	44,900
SB14M	10,400	SB14P	8,490
SB16M	18,800	SB16P	3,780
SB22M	21,000	SB22P	3,100
SB24M	17,700	SB24P	2,560
SB26M	16,500	SB26P	2,560
SB32M	13,800	SB32P	1,740
SB34M	10,100	SB34P	3,660
SB36M	18,200	SB36P	3,300
SC12M	13,800	SC12P	3,220
SC14M	15,700	SC14P	2,940
SC16M	19,300	SC16P	3,900
SC22M	10,900	SC22P	11,200
SC24M	5,010	SC24P	11,800
SC26M	13,700	SC26P	11,500
SC32M	13,400	SC32P	3,050
SC34M	9,820	SC34P	2,320
SC36M	9,290	SC36P	15,900

La clave de las muestras significa lo siguiente: la S corresponde a la temporada que es verano, la B o C al lugar de procedencia (La Boquita o Bahía Carrizales), el número siguiente (1,2 y 3) corresponde al número de la réplica; y el último número (2, 4 y 6) el grado de salud. La M corresponde a las muestras de mucus y la P a las muestras de pólipos

6.3.2 Cargado del Chip e ISPs

Una vez cuantificadas las librerías, diluidas a una misma concentración y enriquecidas, se lleva a cabo el proceso de secuenciación; sin embargo, existe

una parte crítica que es el cargado de chip ya que la calidad de la secuenciación depende de la eficiencia del cargado, es por esta razón que Ion Torrent en su plataforma genera un reporte de la calidad del mismo, esto puede visualizarse en las figuras 10a y 10b, entre más se acerca a la coloración roja mejor eficiencia del cargado, pero, en caso contrario un color azul indica la baja calidad; tal y como se muestra en las figuras. La figura 10a representa el chip 314 de la muestras de mucus y se observa que este cargado tuvo poca eficiencia (51%) comparado con la figura 10b que pertenece al chip de los pólipos (73%).

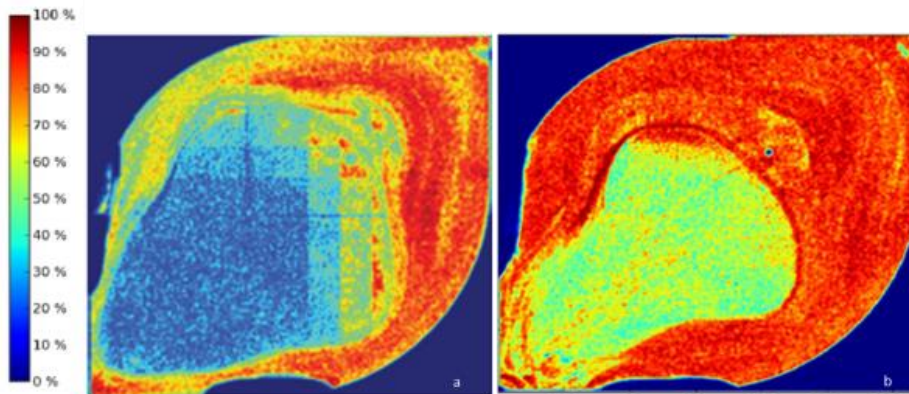


Figura 10. Imagen del cargado del chip 314 con las muestras del mucus de coral (a) y de los pólipos (b) que forma parte del reporte de Ion Torrent.

Esta parte visual se completa con el porcentaje de celdas con ISPs (IonSpheres, esferas que tienen adheridos fragmentos del ADN bacteriano, tabla 7), así como también el porcentaje de ISPs vivas, control y la librería final que se secuenció. Como se puede observar en la tabla 7, el mayor porcentaje de celdas con ISPs se encuentra en el chip perteneciente a los pólipos, esto quiere decir que el 73% del chip estuvo cargado con una ISP, de ahí un 95% fueron ISP vivas, es decir con el fragmento adherido y viable para secuenciar y el 2% fueron ISP control, es decir, esferas que contienen fragmentos de prueba con secuencias conocidas y generalmente son de 100 pb. Por lo tanto para las muestras de pólipos la librería tenía un 98% de ISPs para secuenciar. En el

caso contrario las muestras del mucus sólo el 51% de las celdas tenían ISPs, de las cuales solo el 88% eran esferas vivas y un 13% eran esferas control, indicando la poca eficiencia del cargado del chip es decir el porcentaje de celdas que poseían una esfera que pudiera contener ADN bacteriano y fuera amplificado.

Tabla 7. Valores de secuenciación de de las muestras de mucus y pólipos del coral *P. capitata* de los arrecifes La Boquita y Bahía Carrizales.

	Mucus (%)	Pólipos (%)
Celdas con ISPs	51	73
ISPs vivas	88	95
ISPs control	13	2
Librería ISPs	73	98

6.3.3 Reporte de secuencias de Ion Torrent PGM

Se secuenció un total de 36 muestras de las cuales 18 estaban derivadas del mucus (378,425 lecturas) y las otras 18 de pólipos (528,271 lecturas); por lo tanto se obtuvo un total de 906,696 lecturas, con un promedio de longitud de lectura de 158 pb, valor que reside dentro de lo esperado para la región V3 (100-200 pb). Cada uno de los archivos en formato FASTQ fue compactado en un solo archivo para su análisis bioinformático.

6.4 Análisis Bioinformático

Previamente a analizar las secuencias utilizando QIIME, estas se limpiaron de toda contaminación (secuencias 18S), se cortaron los primers y los códigos de barras y se eliminó toda aquella secuencia menor a 100pb. Con ello se visualizó que estos primers diseñados también amplificaron secuencias 18S del coral y de menor longitud a lo esperado, por lo tanto, esto podría indicar que los primers no son tan específicos para la región V3. Con CLC Sequence viewer un total de 120,195 lecturas (13%) fueron eliminadas ya que no se ajustaban a la longitud requerida. Las secuencias totales, las cortadas y las útiles de las

muestras de mucus de La Boquita y de Bahía Carrizales se muestran en la tabla 8; en general el promedio de secuencias que fueron utilizadas para la secuenciación fue de 16,695 y en particular se observa que hay una mayor cantidad de secuencias en las muestras del primer sitio que en las del segundo sitio, pero esto no significa que todas las secuencias hayan sido relacionadas con una OTU.

Tabla 8. Listado de secuencias útiles de las muestras de mucus de La Boquita y Bahía Carrizales.

Muestra	SECUENCIAS		
	Total	Cortadas (≥100bp)	Útiles
SB12M	23,497	2,817	20,680
SB14M	21,255	5,704	15,551
SB16M	19,415	8,685	10,730
SB22M	15,447	1,972	13,475
SB24M	20,658	2,334	18,324
SB26M	39,148	6,000	33,148
SB32M	15,087	1,197	13,890
SB34M	27,604	5,356	22,248
SB36M	16,498	2,654	13,844
SC12M	11,407	1,487	9,920
SC14M	22,483	3,389	19,094
SC16M	16,011	1,418	14,593
SC22M	21,535	1,870	19,665
SC24M	7,656	761	6,895
SC26M	18,294	3,724	14,570
SC32M	18,744	1,064	17,680
SC34M	21,488	3,227	18,261
SC36M	23,269	5,324	17,945
Promedio	12,972	3,277	16,695

La clave de las muestras significa lo siguiente: la S corresponde a la temporada que es verano, la B o C al lugar de procedencia (La Boquita o Bahía Carrizales), el número siguiente (1,2 y 3) corresponde al número de la réplica; y el ultimo numero (2, 4 y 6) el grado de salud. La M corresponde a las muestras de mucus y la P a las muestras de pólipos

De manera similar en la tabla 9 se muestran la cantidad de secuencias obtenidas por muestra y localidad de las muestras de pólipos, el promedio de secuencias útiles fue de 23,191 un número mayor comparado con las muestras de mucus, de igual manera la mayor cantidad de secuencias útiles se encuentra en las muestras de La Boquita, previamente se observó que había un mayor porcentaje de celdas con ISPs en el chip de los pólipos que en el de los mucus, por lo tanto, quizás un chip con un alto porcentaje de celdas con ISPs indica una mayor cantidad de secuencias obtenidas.

Tabla 9. Listado de secuencias viables de las muestras de mucus de La Boquita y Bahía Carrizales.

SECUENCIAS			
Muestra	Totales	Cortadas (≥100pb)	Útiles
SB12P	24,963	5,806	19,117
SB14P	14,931	1,429	13,502
SB16P	22,463	3,261	19,202
SB22P	6,013	658	5,355
SB24P	55,778	6,448	49,330
SB26P	54,576	9,506	45,070
SB32P	69,889	4,689	65,210
SB34P	17,141	1,941	15,200
SB36P	30,171	2,387	27,784
SC12P	17,832	1,414	16,418
SC14P	8,885	898	7,987
SC16P	10,531	1,136	9,395
SC22P	18,389	1,575	16,814
SC24P	36,640	3,354	33,286
SC26P	23,782	6,776	17,006
SC32P	7,229	626	6,603
SC34P	18,932	2,648	16,284
SC36P	40,532	6,660	33,872
Promedio	26,593	3,401	23,191

La clave de las muestras significa lo siguiente: la S corresponde a la temporada que es verano, la B o C al lugar de procedencia (La Boquita o Bahía Carrizales), el número siguiente (1,2 y 3) corresponde al número de la réplica; y el último número (2, 4 y 6) el grado de salud. La M corresponde a las muestras de mucus y la P a las muestras de pólipos

6.4.1 QIIME

Una vez que fueron cortadas y limpiadas las secuencias se procedió a utilizar QIIME empleando un total de 717,948 secuencias (de las cuales 300,513 fueron de mucus y 417,435 de pólipos) para reconocer el número de OTUs, así como también las gráficas que representan la abundancia de las mismas para cada una de las clasificaciones taxonómicas. Por lo tanto, para las 36 muestras un total de **22,661 OTUs** fueron identificadas, la mínima lectura fue de 5,355 seqs/muestra y la máxima fue de 65,210 seqs/muestra por lo tanto el promedio de lectura fue de 17,379 seqs/muestra.

La profundidad de cobertura es el número de veces que una base de ADN en una región objetivo es cubierta por lectura. Se observa de manera general que la profundidad de secuenciación que se logró obtener fue adecuada para los fines de este estudio, pues se logró caracterizar una buena parte de la comunidad bacteriana de las muestras de mucus y pólipos de coral *P. capitata* (Figura 11); siendo de mejor calidad y mayor número de secuencias asociadas a una OTU las muestras de mucus, tanto para los organismos derivados de La Boquita como de Bahía Carrizales; a excepción de tres muestras de pólipos cuya profundidad fue mucho mayor comparada con la de mucus.

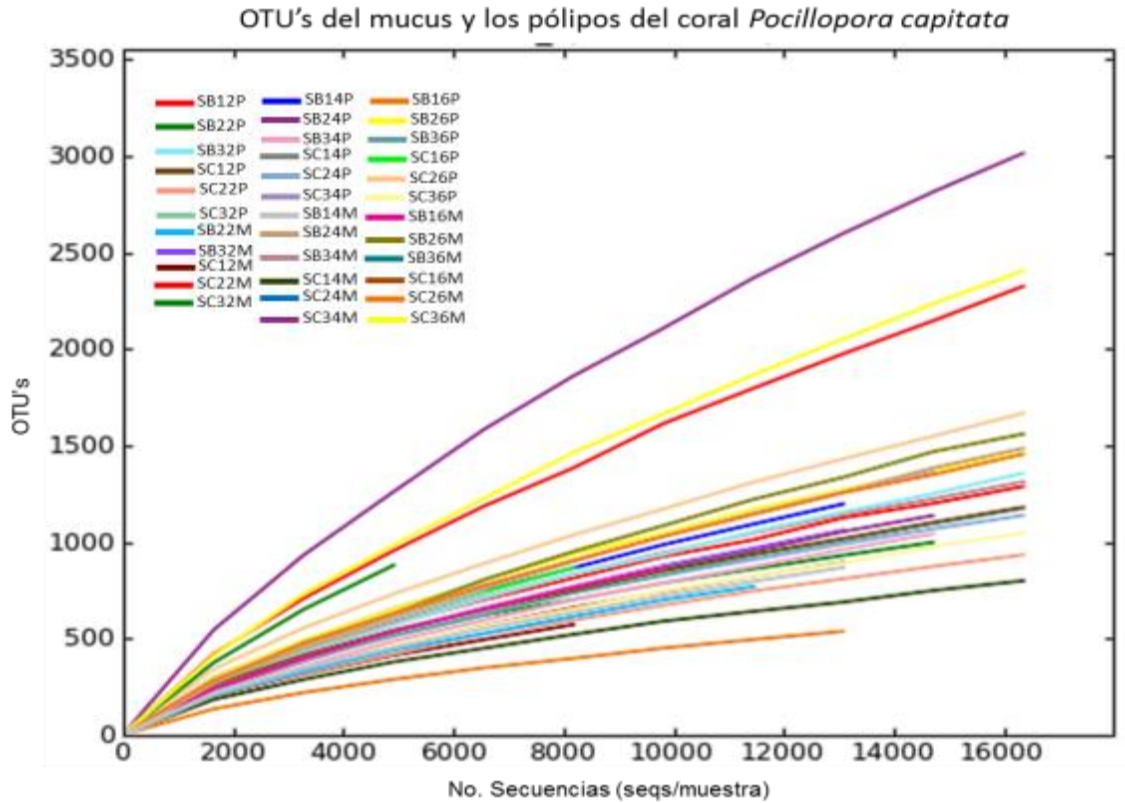


Figura 11. Curvas de rarefacción del número de OTUs identificadas con respecto al número de secuencias presentes en las muestras de La Boquita y Bahía Carrizales.

Si observamos las curvas de rarefacción de acuerdo al sitio al que pertenecen las muestras que generalmente presentan una mayor cantidad de secuencias asignadas a una OTU y por lo tanto las de mejor calidad pertenecen al arrecife La Boquita, sin embargo, en las muestras de Bahía Carrizales a pesar de que hay una cantidad considerable de secuencias en las muestras no todas fueron identificadas o asignadas a una OTU.

En la figura 12 se muestra de manera separada la profundidad de secuenciación que se obtuvo en las muestras de pólipos (a) y mucus (b), observándose que la mejor profundidad de secuenciación se presentó en las muestras de mucus pues en la mayoría de las muestras se obtuvo una buena cantidad de secuencias que fueron mapeadas y asignadas a una OTU, y a excepción de todas las muestras de pólipos tres muestras presentaron un elevado número de secuencias mapeadas e incluso en estas si se quisiera

seguir secuenciando probablemente incrementaría el número de secuencias mapeadas y por lo tanto el número de OTUs. Si la curva comienza a hacerse asintótica es muy probable que la información que obtengamos ya no sea útil pues estaríamos obteniendo el mismo número de OTUs lo que implica un gasto innecesario; por lo tanto, de acuerdo a las curvas obtenidas para ambos muestreos el número de OTUs obtenidos es suficiente para lograr decir que la profundidad de secuenciación fue buena.

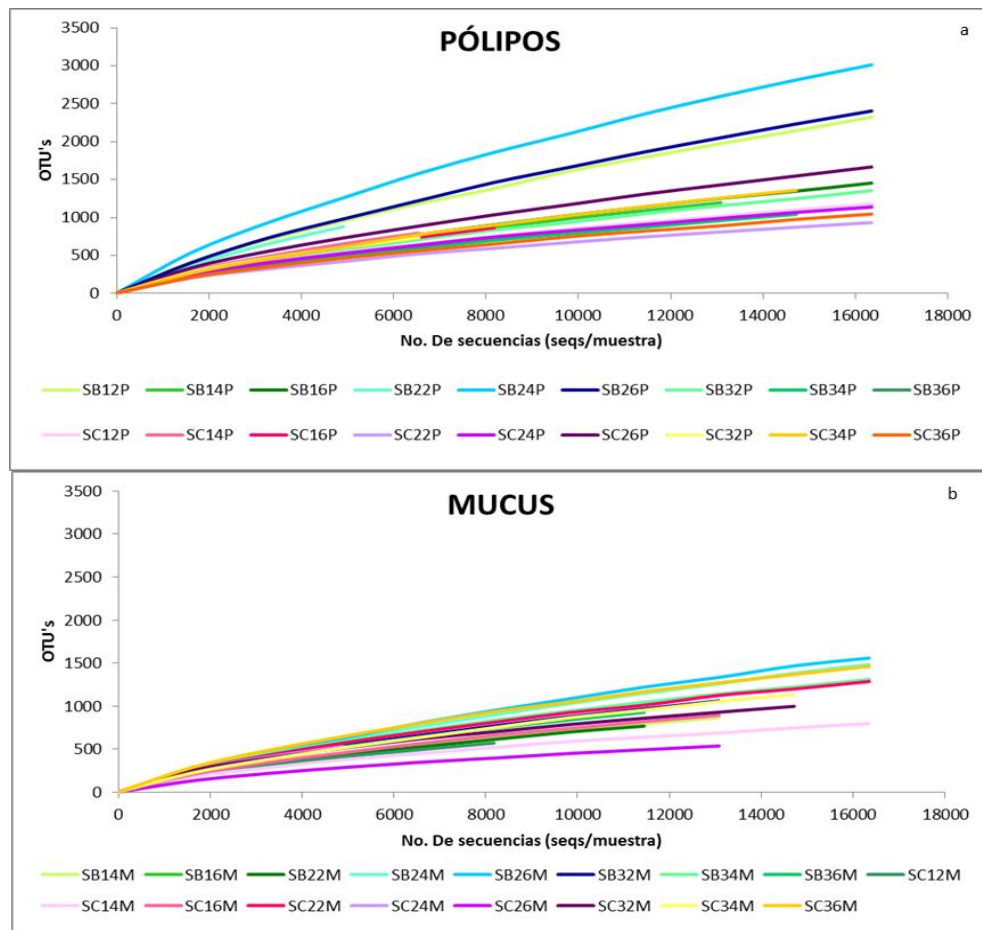


Figura 12. Curvas de rarefacción del número de OTUs asignadas al número de secuencias que se obtuvieron por muestras de pólipos (a), y de mucus (b) del coral *P. Capitata* de La Boquita y Bahía Carrizales.

Sin embargo, estas curvas de rarefacción no sólo nos proporcionan la profundidad de la secuenciación; sino también sirven para medir la diversidad de especies. Por lo que al presentar un mayor número de OTUs asignados a las

secuencias, como sucede en las muestras de pólipos, se esperaría que presentaran una mayor diversidad de especies; el número de OTUs presentes en las muestras de mucus se encuentra por debajo de los 1500 a diferencia de los 3000 encontrados en pólipos.

Una vez que se obtienen las curvas de rarefacción indicando cuales de las muestras tuvieron mayor profundidad de análisis, se analizó la tabla de las 22,261 OTUs obtenidas y a pesar de haber limpiado las secuencias para tener una mayor calidad en el análisis, los resultados mostraron que algunas de las muestras presentaron secuencias que no pudieron ser identificadas. En la figura 13 se observan todas las muestras de pólipos y mucus con su respectivo porcentaje de secuencias clasificadas (secuencias que fueron asociadas a una OTU) y no clasificadas (aquellas que no fueron asignadas). Las muestras que presentan una mayor cantidad de secuencias no clasificadas se encuentran en el grado de salud D6 y las de menor porcentaje en las de grado de salud D2. De acuerdo al tipo de tejido de manera general las muestras de pólipos presentan una mayor cantidad de secuencias no clasificadas que secuencias identificadas dentro del dominio Bacteria.

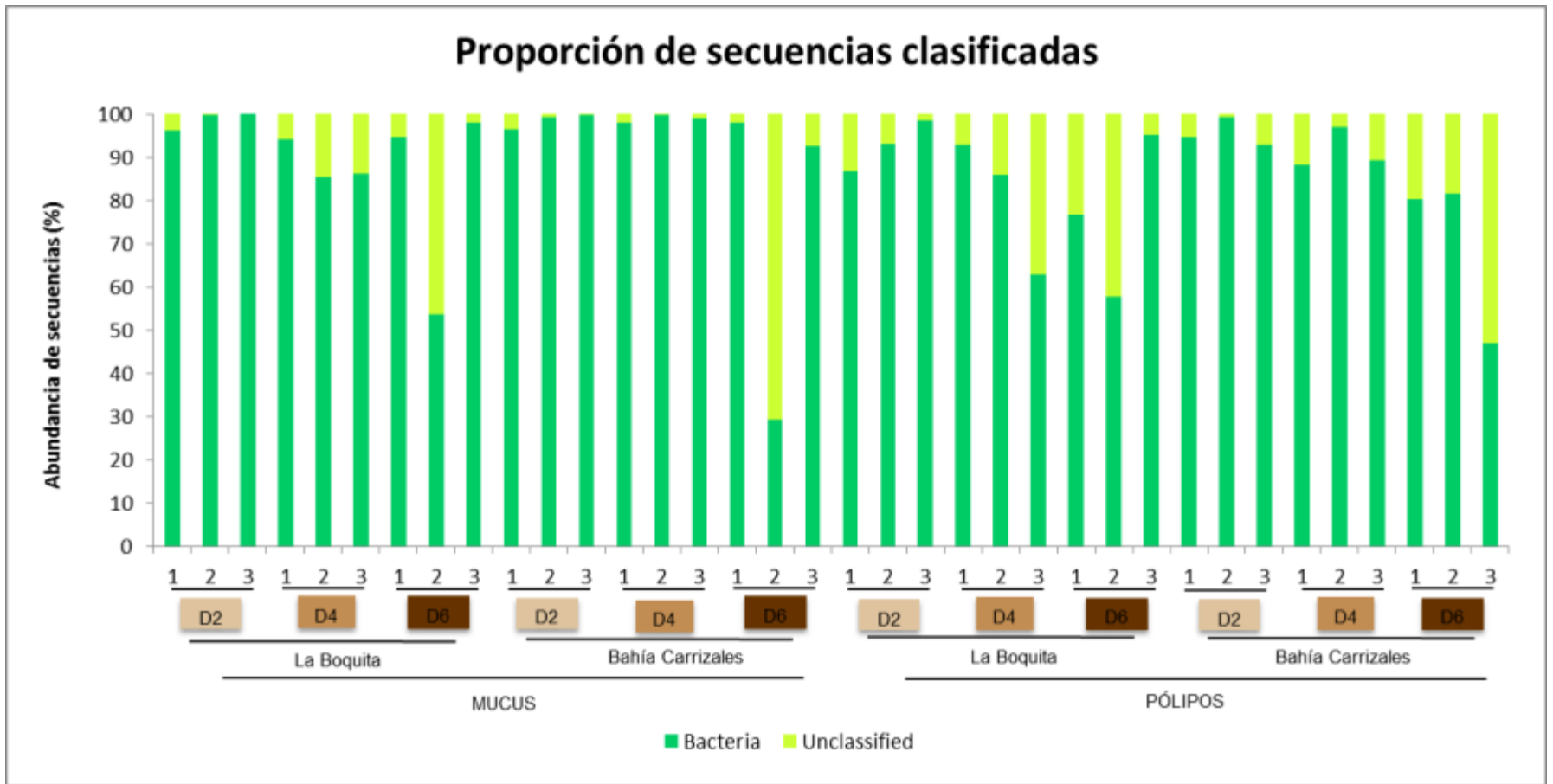


Figura 13. Gráfica de proporción de secuencias clasificadas como bacterias y no clasificadas de las 36 muestras de mucus y pólipos de corales de los arrecifes de Manzanillo, Colima. El número 1, 2 y 3 representan las réplicas, y, D2, D4 y D6 me representan el grado de salud de acuerdo al CoralWatch.

Una vez que se agruparon las secuencias no clasificadas y fueron separadas se procedió a reconocer el número de taxa identificados en cada categoría taxonómica así como el número de secuencias presentes en ellas. En la tabla 10 se muestra que un total de 24 phyla, 107 familias, 99 géneros y 24 especies fueron reconocidos. Mientras más profunda sea la clasificación taxonómica que hace QIIME mayor número de secuencias que no son identificadas y en esta tabla no se tienen consideradas el número de secuencias no clasificadas (Unclassified) que fue de 85,416.

Tabla 10. Número de taxa identificados con su respectivo número de secuencias de todas las muestras del coral *P. capitata*.

	Phylum	Clase	Orden	Familia	Género	Especies
Taxa Identificados	24	52	82	107	99	24
No. Secuencias	415425	406461	377163	147996	109374	852
Secuencias no identificadas	93613	102577	131875	137813	399664	508186

Los 24 phyla reconocidos por QIIME fueron *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Armatimonadetes*, *Bacteroidetes*, *Chlamydiae*, *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *GN02*, *Lentisphaerae*, *Nitrospirae*, *OD1*, *Planctomycetes*, *Poribacteria*, *Proteobacteria*, *SBR1093*, *Tenericutes*, *Thermi*, *TM7*, *Verrucomicrobia* y *WS3*, y los grupos Unclassified y Unidentified. Analizando a nivel phyla de manera general, en la figura 14 se muestra la estructura bacteriana del coral *P. capitata*, observando que el phylum mayormente predominante es el *Proteobacteria* y se encuentra presente en la mayoría de las muestras; le sigue *Chlorobi* representada de manera significativa en la réplica 3 del grado de salud 4 de Bahía Carrizales tanto de mucus como de pólipos (SC34M y SC34P), después el phylum *Bacteroidetes* presente en todas las muestras pero con mayor proporción en las muestras cuyo origen es La Boquita, por último de los phyla representativos están las *Actinobacteria* y *Cyanobacteria* que también están presentes en todas las muestras, sin embargo en un porcentaje menor al 1%; el resto se encuentra conformado por los demás phyla encontrados.

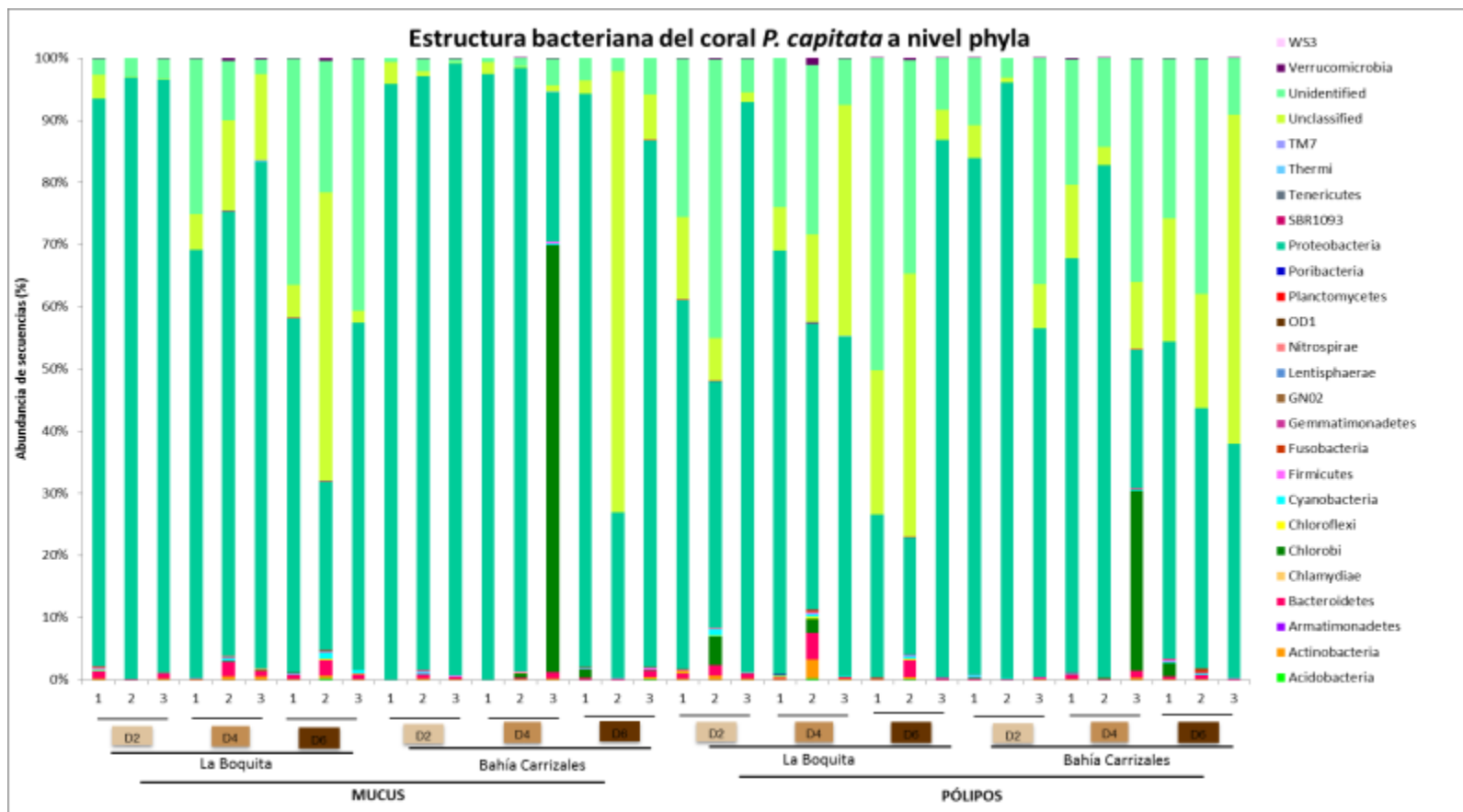


Figura 14. Estructura bacteriana del coral *P. capitata* a nivel phyla de las 36 muestras de mucus y pólipos de corales de los arrecifes de Manzanillo, Colima. El número 1, 2 y 3 representan las réplicas, y, D2, D4 y D6 me representan el grado de salud de acuerdo al CoralWatch.

Debido al elevado porcentaje de *Proteobacterias* presentes en las muestras de mucus y pólipos del coral *P. capitata* hace evidente que las clases más abundantes fueron las gamma (γ), beta (β) y alfa (α) *proteobacterias* resultando que las primeras mencionadas son las que tienen mayor presencia tanto en corales de La Boquita como de Bahía Carrizales. No obstante, a pesar de que se tiene muy marcada la presencia de las clases mencionadas existen otras menos abundantes que no se aprecian visualmente (para ver la lista completa de las clases identificadas ver anexo 4). La proporción de secuencias que se encuentran como No clasificadas (Unclassified en inglés (UC)) y No identificadas (Unidentified (UI)) comienzan a incrementar; las muestras que presentan alto porcentaje son las de mucus y pólipos de la réplica 2 del grado de salud 6 tanto de La Boquita como de Bahía Carrizales (SB26M, SB26P, SC26M y SC26P), así como también se puede observar en la réplica 3 del grado de salud 6 de las muestras de pólipos de Carrizales (Fig.15).

En la figura 16 se aprecian los 82 órdenes identificados en todas las muestras tanto en las muestras de mucus como de pólipos de acuerdo al grado de salud y de ambos arrecifes; esto para ver como se distribuyen los órdenes en cada una y si existen diferencias entre las mismas muestras de la misma categoría; siguiendo la tendencia de acuerdo a los phyla encontrados se observa que los órdenes más representativos fueron ***Enterobacteriales***, ***Burkholderiales***, ***Legionellales*** y ***Rhodobacteriales*** (lista completa de órdenes ver en anexo 5), pero sin dejar de notar que cada vez existe mayor cantidad de secuencias UC y UI, así como también la presencia de los otros grupos, que por tener un porcentaje de secuencias menor a 1% no se encuentran en todas las muestras y pueden no ser visibles. Hablando sólo de las diferencias de abundancia entre el tipo de tejido (mucus y pólipos) se observa como las *Enterobacteriales* son mayormente abundantes en las muestras de mucus con respecto a las de pólipos, comportamiento similar se observa en las *Burkholderiales*; por otro lado, las *Legionellales* y *Rhodobacteriales* se encuentran igualmente abundantes en ambos tipos de tejidos. De acuerdo al sitio de muestreo las *Enterobacteriales*, como anteriormente se menciona la mayor

abundancia se presenta en las muestras de mucus, pero en Carrizales su abundancia es más mayor. El segundo orden abundante, tanto en La Boquita como en Carrizales presenta la misma abundancia; *Legionellales* y *Rhodobacterales*, mayor abundancia en La Boquita.

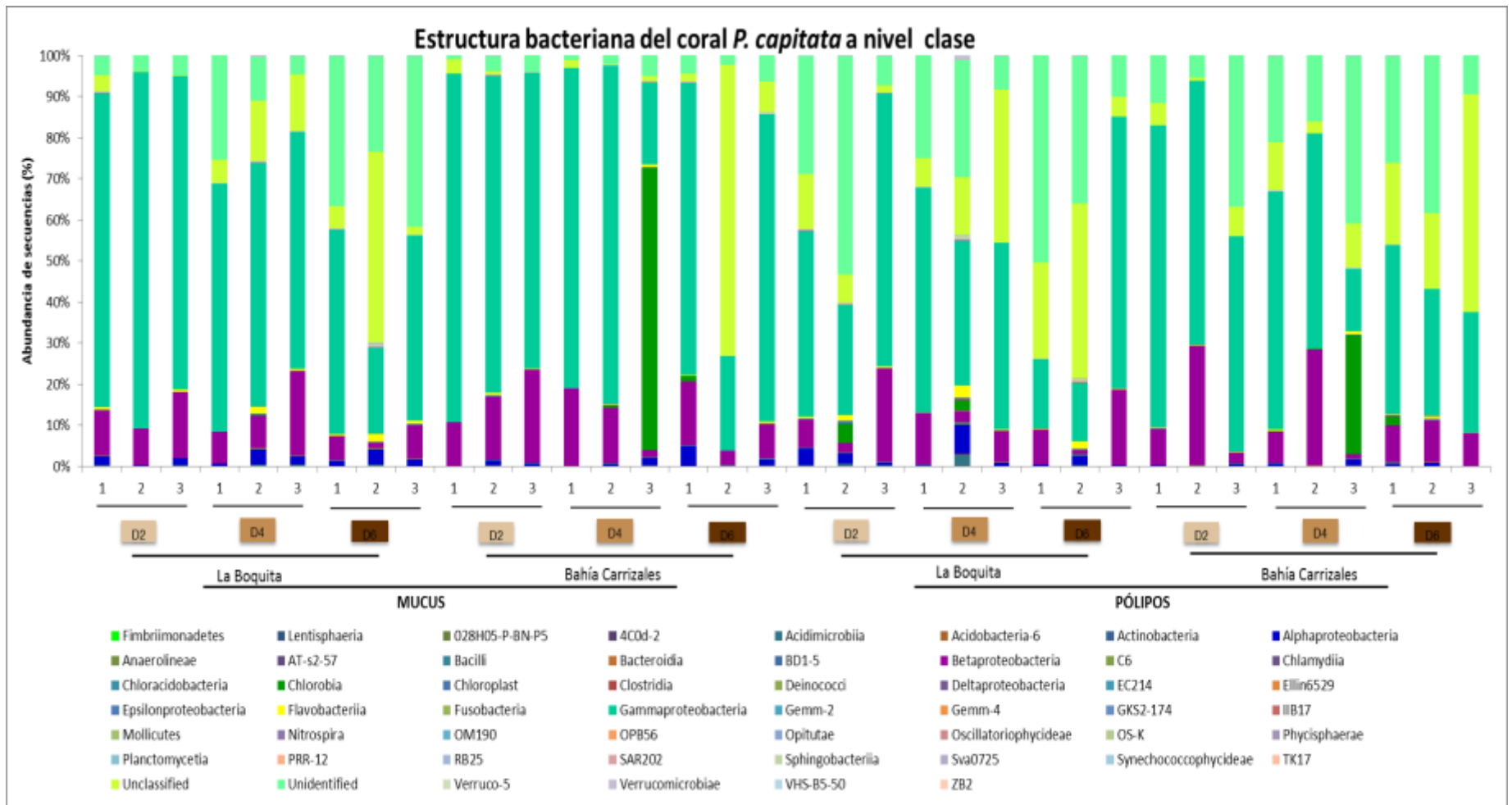


Figura 15. Estructura bacteriana del coral *P. capitata* a nivel clase de las 36 muestras de mucus y pólipos de corales de los arrecifes de Manzanillo, Colima. El número 1, 2 y 3 representan las réplicas, y, D2, D4 y D6 me representan el grado de salud de acuerdo al CoralWatch

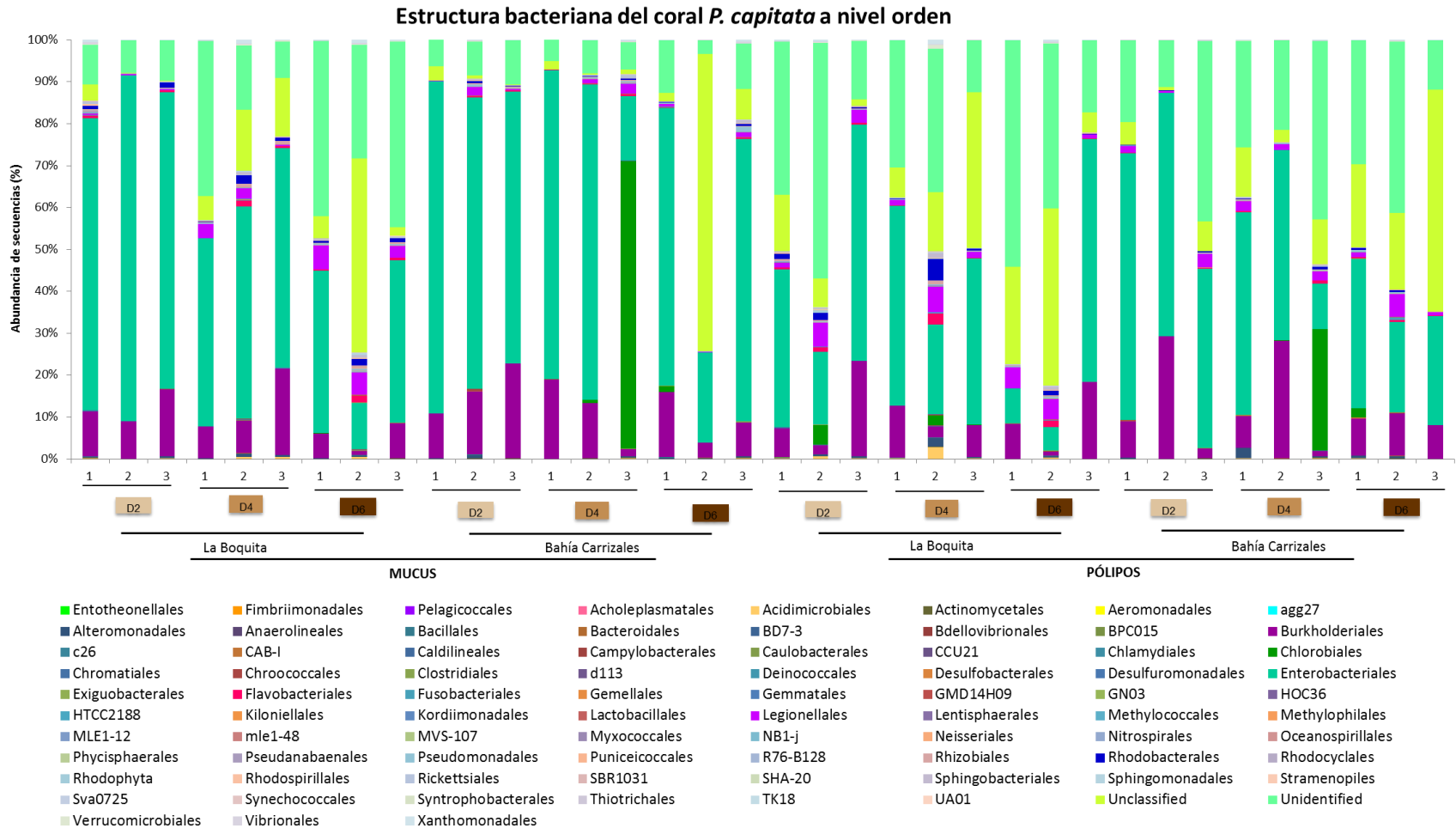


Figura 16. Estructura bacteriana del coral *P. capitata* a nivel orden de las 36 muestras de mucus y pólipos de corales de los arrecifes de Manzanillo, Colima. El número 1, 2 y 3 representan las réplicas, y, D2, D4 y D6 me representan el grado de salud de acuerdo al CoralWatch.

De las 107 familias que fueron identificadas, las más representativas las familias *Enterobacteriaceae*, *Burkholderiaceae*, *Francisellaceae* y *Rhodobacteraceae*, se mantiene casi igual el porcentaje de bacterias UC y UI al que se presenta en el nivel anterior. Se denota que la familia *Chlorobiaceae* se encuentra muy abundante en la réplica 3 del grado de salud 4 de Bahía Carrizales de las muestras de mucus y pólipos, así como también se puede notar las familias identificadas en cada una de las muestras y las diferencias que presentan entre ellas debido a la presencia y/o ausencia de algunas familias en las 36 muestras procesadas (Fig. 17, lista completa de familias identificadas ver anexo 6).

La estructura bacteriana a nivel género e incluso especie no es práctico representarla de manera gráfica debido a que el porcentaje de secuencias UC y UI incrementa ya que QIIME no logró reconocer dichas secuencias en estos niveles. Las bacterias más representantes a nivel género son las *Gluconacetobacter*, *Burkholderia* y *Francisella* (lista completa de géneros identificados ver anexo 6). A nivel especie se reconocieron *Propionibacterium acnes*, *Exiguobacterium aurantiacum*, *Photobacterium damsela*, *Veillonella dispar*, *Hydrocarboniphaga effusa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Wautersiella falsenii*, *Lactococcus garvieae*, *Stenotrophomonas geniculata*, *Hyphomonas jannaschiana*, *Acinetobacter johnsonii*, *Pontibacter korlensis*, *Pseudoalteromonas luteoviolacea*, *Prochlorococcus marinus*, *Thalassobius mediterraneus*, *Prevotella melaninogenica*, *Rothia mucilaginosa*, *Photobacterium rosenbergii*, *Acinetobacter schindleri*, *Staphylococcus sciuri*, *Vibrio shilonii*, *Bacillus thermoamylovorans*, *Sphingomonas wittichi* y *Xanthomonadales xanthomonadales*.

Estructura bacteriana del coral *P. capitata* a nivel familia

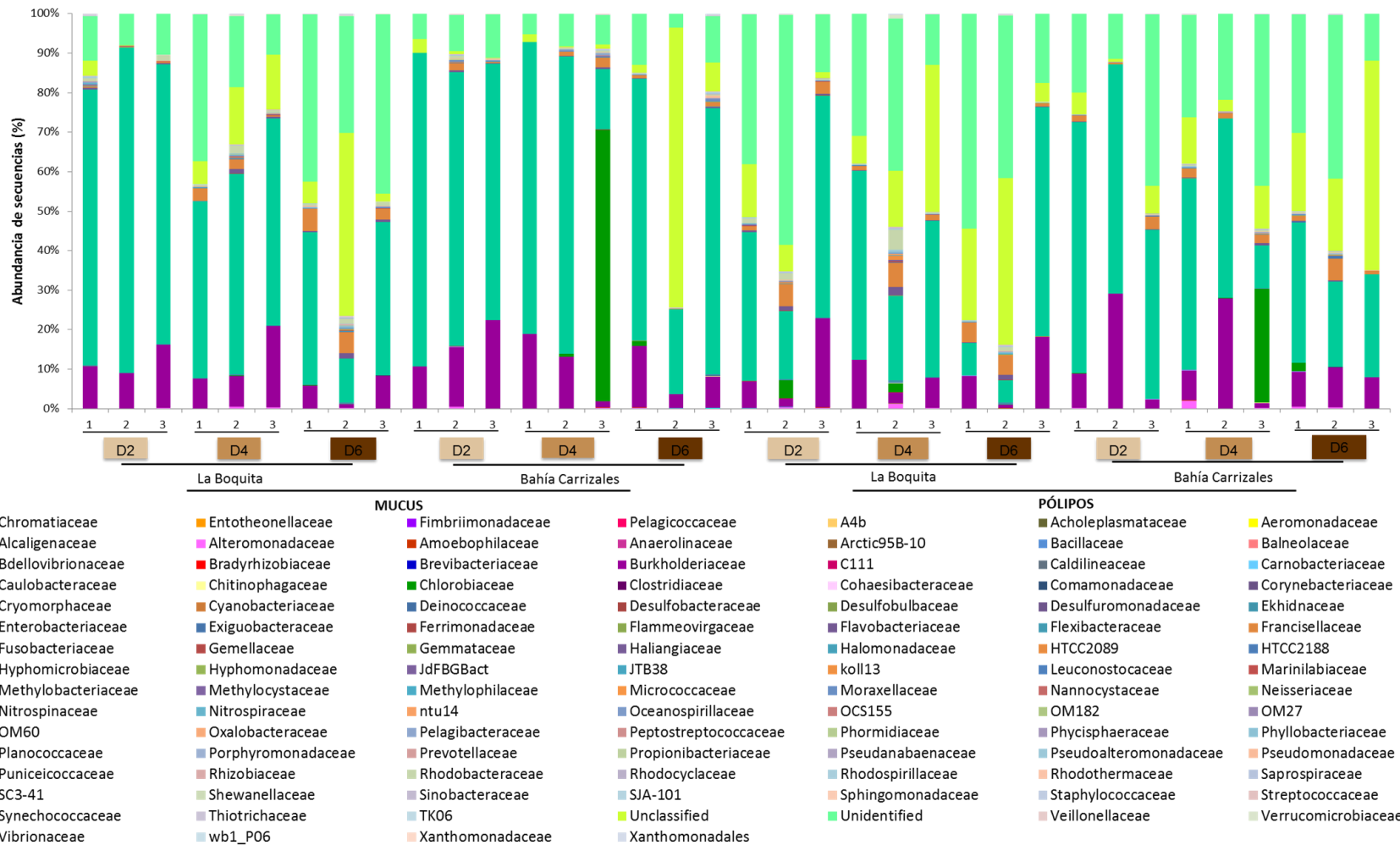


Figura 17. Estructura bacteriana del coral *P. capitata* a nivel familia de las 36 muestras de mucus y pólipos de corales de los arrecifes de Manzanillo, Colima. El número 1, 2 y 3 representan las réplicas, y, D2, D4 y D6 me representan el grado de salud de acuerdo al CoralWatch

En la tabla 11 se observan los phyla, clases, órdenes, familias y géneros más abundantes con respecto al porcentaje de secuencias asociadas a una OTU de acuerdo al tipo de tejido (mucus y pólipos), sitio de muestreo (La Boquita y Bahía Carrizales) y grado de salud (D2, D4 y D6) identificados por QIIME.

Tabla 11. Taxa más abundantes y representativos según QIIME del coral *P. capita* de acuerdo al sitio de muestreo, tipo de tejido y grado de salud coralina. UC: unclassified; UI: unidentified.

Variable	Phylum	Clase	Orden	Familia	Género	
Sitios de muestreo	La Boquita	<i>Actinobacteria</i> <i>Bacteroidetes</i> <i>Chlorobi</i> <i>Proteobacteria</i> UC, UI	α -proteobacteria β -proteobacteria <i>Chlorobia</i> <i>Flavobacteria</i> γ -proteobacteria <i>Sphingobacteria</i> UC, UI	<i>Acidomicrobiales</i> <i>Alteromonadales</i> <i>Burkholderiales</i> <i>Chlorobiales</i> <i>Enterobacteriales</i> <i>Flavobacteriales</i> <i>Legionellales</i> <i>Rhodobacteriales</i> UC, UI <i>Xanthomonadales</i>	<i>Burkholderiaceae</i> <i>Chlorobiaceae</i> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Flavobacteriaceae</i> <i>Francisellaceae</i> <i>Rhodobacteriaceae</i> UC, UI	<i>Burkholderia</i> <i>Francisella</i> <i>Gluconacetobacter</i> UC, UI
	Bahía Carrizales	<i>Chlorobi</i> <i>Proteobacteria</i> UC, UI	α -proteobacteria β -proteobacteria <i>Chlorobia</i> γ -proteobacteria UC, UI	<i>Burkholderiales</i> <i>Chlorobiales</i> <i>Enterobacteriales</i> <i>Legionellales</i> UC, UI	<i>Burkholderiaceae</i> <i>Chlorobiaceae</i> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Francisellaceae</i> UC, UI	<i>Burkholderia</i> <i>Francisella</i> <i>Gluconacetobacter</i> <i>Prosthecochloris</i> UC, UI
Tipo de tejido	Mucus	<i>Bacteroidetes</i> <i>Chlorobi</i> <i>Proteobacteria</i> UC, UI	α -proteobacteria β -proteobacteria <i>Chlorobia</i> <i>Flavobacteria</i> γ -proteobacteria UC, UI	<i>Burkholderiales</i> <i>Chlorobiales</i> <i>Enterobacteriales</i> <i>Legionellales</i> <i>Rhodobacteriales</i> UC, UI	<i>Burkholderiaceae</i> <i>Chlorobiaceae</i> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Francisellaceae</i> UC, UI	<i>Burkholderia</i> <i>Francisella</i> <i>Gluconacetobacter</i> <i>Prosthecochloris</i> UC, UI
	Pólipos	<i>Actinobacteria</i> <i>Bacteroidetes</i> <i>Chlorobi</i>	<i>Acidimicrobiia</i> α -proteobacteria β -proteobacteria	<i>Acidomicrobiales</i> <i>Alteromonadales</i> <i>Burkholderiales</i>	<i>Alteromonadaceae</i> <i>Burkholderiaceae</i> <i>Chlorobiaceae</i>	<i>Alteromonas</i> <i>Burkholderia</i> <i>Francisella</i>

Grado de salud		<i>Proteobacteria</i> UC, UI	<i>Chlorobia</i> <i>Flavobacteria</i> <i>γ-proteobacteria</i> UC, UI	<i>Chlorobiales</i> <i>Enterobacteriales</i> <i>Flavobacteriales</i> <i>Legionellales</i> <i>Rhodobacteriales</i> UC, UI	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Flavobacteriaceae</i> <i>Francisellaceae</i> <i>Rhodobacteriaceae</i> UC, UI	<i>Gluconacetobacter</i> <i>Prosthecochloris</i> UC, UI
	D2	<i>Actinobacteria</i> <i>Bacteroidetes</i> <i>Proteobacteria</i> UC, UI	<i>Acidimicrobiia</i> <i>α-proteobacteria</i> <i>β-proteobacteria</i> <i>Chlorobia</i> <i>Flavobacteria</i> <i>γ-proteobacteria</i> <i>Sphingobacteria</i> UC, UI	<i>Acidomicrobiales</i> <i>Alteromonadales</i> <i>Burkholderiales</i> <i>Chlorobiales</i> <i>Enterobacteriales</i> <i>Flavobacteriales</i> <i>Legionellales</i> <i>Rhizobiales</i> <i>Rhodobacteriales</i> <i>Sphingobacteriales</i> UC, UI	<i>Burkholderiaceae</i> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Flavobacteriaceae</i> <i>Francisellaceae</i> <i>Rhodobacteriaceae</i> UC, UI	<i>Burkholderia</i> <i>Francisella</i> <i>Gluconacetobacter</i> UC, UI
	D4	<i>Actinobacteria</i> <i>Bacteroidetes</i> <i>Chlorobi</i> <i>Proteobacteria</i> UC, UI	<i>Acidimicrobiia</i> <i>α-proteobacteria</i> <i>β-proteobacteria</i> <i>Chlorobia</i> <i>Flavobacteria</i> <i>γ-proteobacteria</i> UC, UI	<i>Acidomicrobiales</i> <i>Alteromonadales</i> <i>Burkholderiales</i> <i>Chlorobiales</i> <i>Enterobacteriales</i> <i>Flavobacteriales</i> <i>Legionellales</i> <i>Rhodobacteriales</i> UC, UI	<i>Burkholderiaceae</i> <i>Chlorobiaceae</i> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Flavobacteriaceae</i> <i>Francisellaceae</i> <i>Rhodobacteriaceae</i> UC, UI	<i>Burkholderia</i> <i>Francisella</i> <i>Gluconacetobacter</i> <i>Prosthecochloris</i> UC, UI
	D6	<i>Bacteroidetes</i> <i>Proteobacteria</i> UC, UI	<i>α-proteobacteria</i> <i>β-proteobacteria</i> <i>Flavobacteria</i> <i>γ-proteobacteria</i> UC, UI	<i>Burkholderiales</i> <i>Enterobacteriales</i> <i>Flavobacteriales</i> <i>Legionellales</i> UC, UI	<i>Burkholderiaceae</i> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Francisellaceae</i> UC, UI	<i>Burkholderia</i> <i>Francisella</i> <i>Gluconacetobacter</i> UC, UI

6.4.2 Ribosomal Database Project (RDP Classifier)

Con QIIME muchas de las secuencias no fueron asociadas a una OTU y esto podría deberse a las bases de datos que posee que son GREENGENES Y SILVA 111, por lo que para completar el análisis y verificar si había diferencias en el análisis taxonómico se decidió realizar el análisis con el programa Ribosomal Database Project (RDP) cuya base de datos es el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés); este programa analiza cada una de las secuencias obtenidas y clasifica taxonómicamente, no obstante con este programa se requiere indicar un nivel de similitud que generalmente se usa un 80%, aun así trata de asignar taxonómicamente cada una de las secuencias; sin embargo lo hace indicando el nivel de similitud con el que fue asociado por lo que al realizar el análisis aquellas secuencias cuyo valor fuera <0.5 estas fueron nombradas como UNIDENTIFIED (UI).

En la gráfica 18 se muestra la estructura bacteriana del coral *P. capitata*, en la cual se observa que la mayor parte de secuencias identificadas como Bacterias se encuentran en la mayoría de las muestras en especial en las muestras de pólipos y grados de salud D2 y D4. Las muestras del grado de salud D6 tanto de mucus como de pólipos, por el contrario presentan una elevada cantidad de secuencias que fueron asignadas como Unidentified y solo una pequeña proporción fueron identificadas como Arqueas; sin embargo, en la gráfica no se observan debido a que esta proporción de secuencias es mucho menor en comparación con los otros dos grupos.

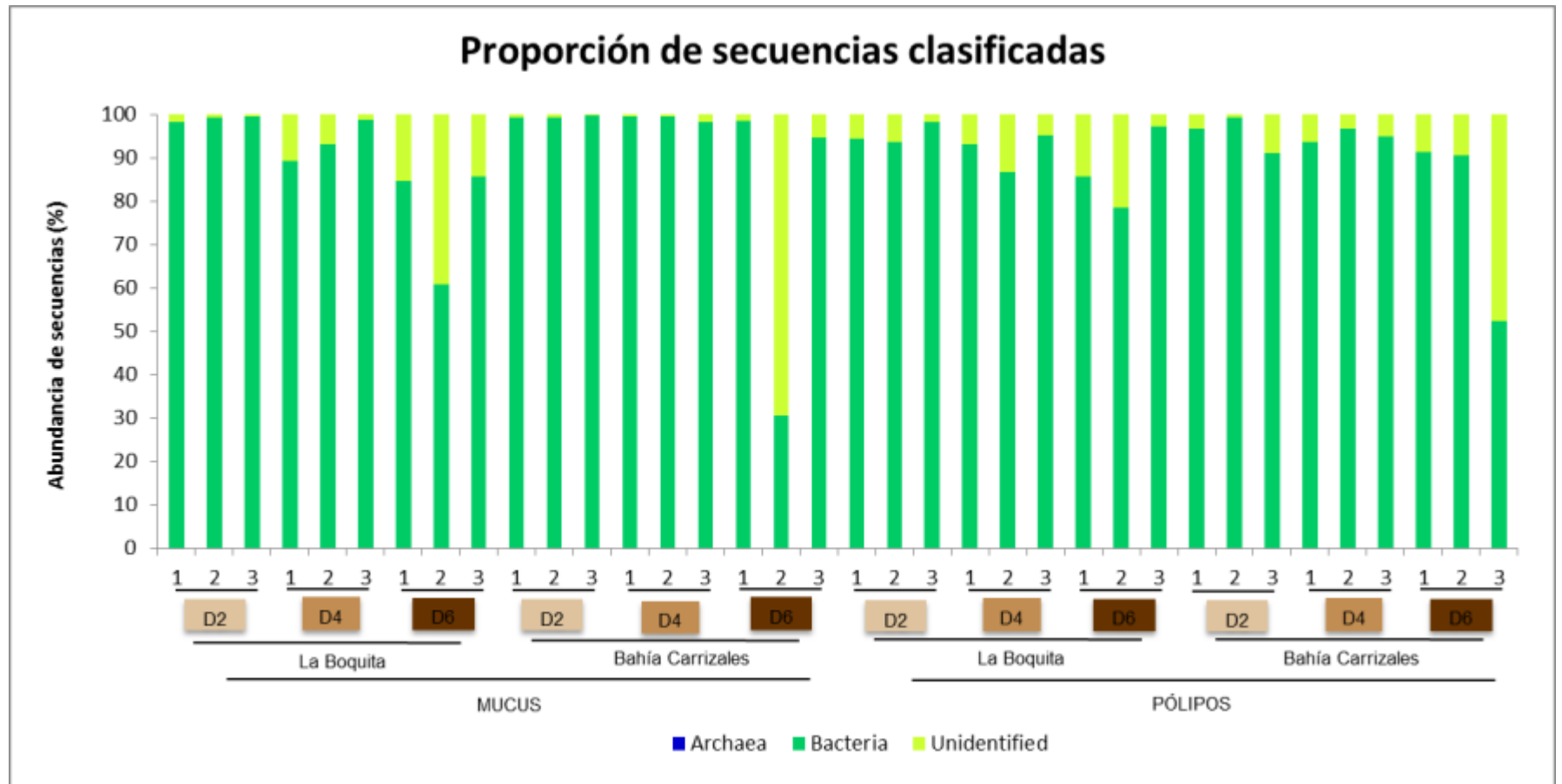


Figura 18. Estructura bacteriana del coral *P. capitata* a nivel dominio de las 36 muestras de mucus y pólipos de corales de los arrecifes de Manzanillo, Colima. El número 1, 2 y 3 representan las réplicas, y, D2, D4 y D6 me representan el grado de salud de acuerdo al CoralWatch

Una vez que se han clasificado las secuencias en sus dos los dominios presentes en estas muestras en la tabla 12 podemos observar el número de taxa que fueron identificados en cada clasificación, observando que, a diferencia de QIIME que solo encontró 24 phyla con RDP fue posible identificar 26 además de los 2 phyla presentes en el dominio de las Arqueas, asimismo, dentro del dominio de las bacterias se pudo caracterizar un total de 601 géneros a diferencia de QIIME que sólo determinó 99; sin embargo, a partir de orden las secuencias que aunque fueron identificadas debido al bajo nivel de confianza fueron asignadas como no identificadas (UI). A pesar de haber obtenido también secuencias UI, con este software se podría tener un análisis más preciso ya que permite identificar un mayor número de familias y por lo tanto de géneros que con el QIIME y una ventaja que proporciona el nivel de confianza o similitud de la secuencia obtenida con la que fue asignada.

Tabla 12. Número de taxa presentes en cada clasificación taxonómica tanto de las Arqueas como Bacterias.

Dominio	Phylum	Clase	Orden	Familia	Género
Archaea	2	1	-	-	-
Bacteria	26	58	119	245	600

Los dos phyla identificados en el dominio Arquea fueron *Crenarchaeota* y *Euryarchaeota*, y del dominio Bacteria fueron *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Aquificae*, *Armatimonadetes*, *Bacteroidetes*, *BRC1*, *Chlamydiae*, *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria/Chloroplast*, *Deferribacteres*, *Deinococcus-Thermus*, *Fibrobacteres*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Lentisphaerae*, *Nitrospira*, *OD1*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *SR1*, *Tenericutes*, *TM7*, *Verrucomicrobia* y *WS3*, además del grupo *Unidentified*. Realizando el mismo análisis que se hizo con QIIME para conocer la estructura de la comunidad microbiana se comienza observando en la figura 19 cada uno de los phyla presentes en cada una de las muestras, con ello podemos denotar que los más

abundantes en el dominio Bacteria son las *Proteobacteria*, el *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Chlorobi* y *Cyanobacteria/Chloroplast*; aunque estas últimas en mucho menor proporción que el primer phylum; y, por mencionar los dos phyla identificados dentro del dominio Arquea fueron *Euryarchaeota* y *Crenarchaeota*, aunque estos no fueran tan representativos. Al igual que con QIIME podemos observar que comienza a incrementar la cantidad de secuencias que fueron UI en la mayoría de las muestras. De manera general, las muestras de pólipos de ambos sitios de muestreo presentan una mayor presencia del phylum *Firmicutes*; sin embargo, su abundancia fue mayor en las muestras derivadas de La Boquita. A pesar de que el phylum *Bacteroidetes* se encuentra presente en la mayoría de las muestras de mucus y de pólipos, de igual forma que el phylum anterior su presencia fue mayor en las muestras derivadas de La Boquita de grado de salud D4 y D6

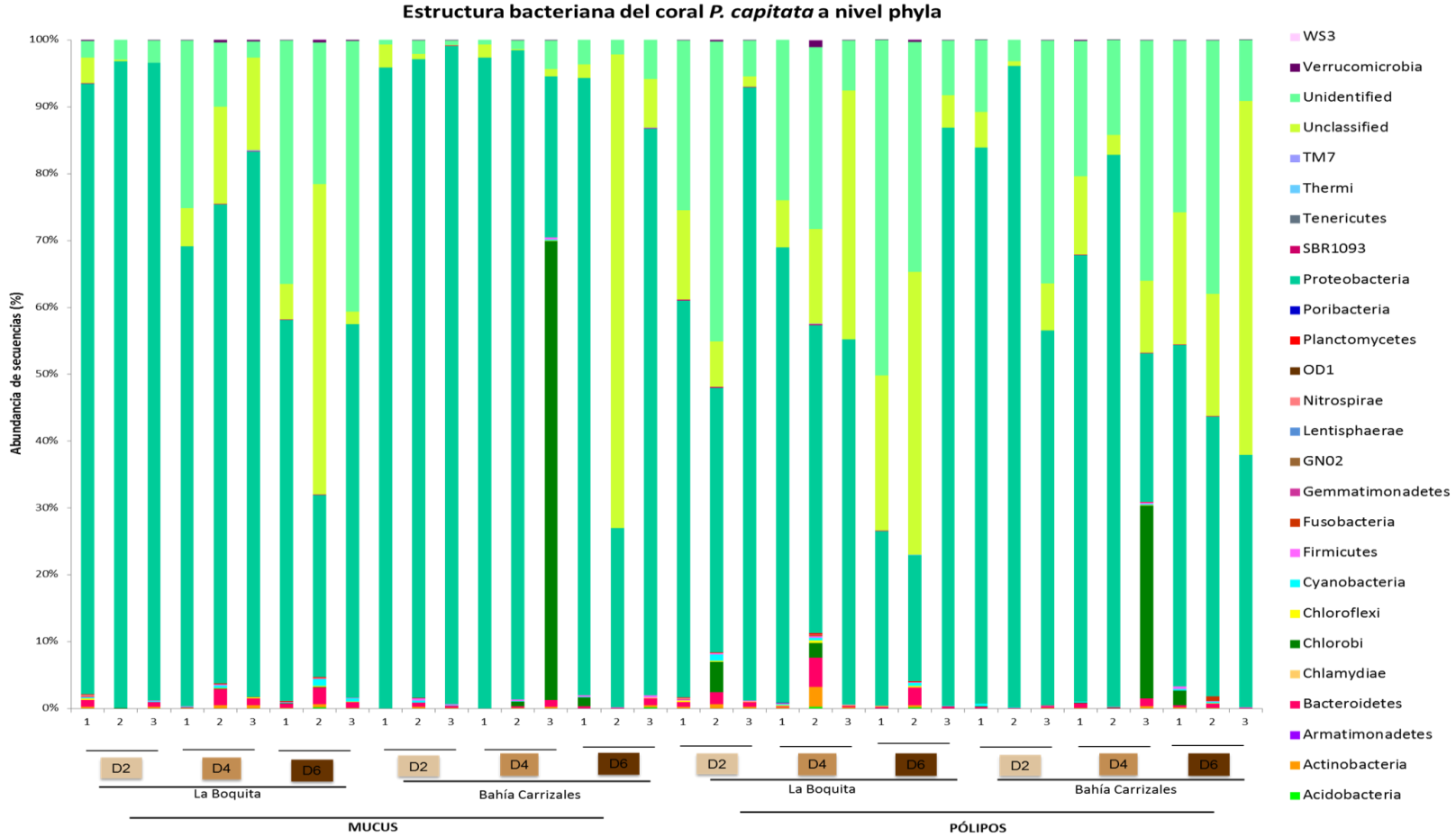


Figura 19. Estructura bacteriana del coral *P. capitata* a nivel phylum de las 36 muestras de mucus y pólipos de corales de los arrecifes de Manzanillo, Colima. El número 1, 2 y 3 representan las réplicas, y, D2, D4 y D6 me representan el grado de salud de acuerdo al CoralWatch.

De las 60 clases que en total fueron identificadas, solamente una se encontró dentro del dominio Arquea la cual fue *Thermoprotei*, las 58 restantes fueron del dominio Bacteria (ver lista completa en anexo 8), Sin embargo, las que tuvieron una mayor abundancia fueron las γ , β y α - *proteobacterias*, las primeras son las más abundantes y a pesar de que las tres están presentes en todas las muestras las que tienen una mayor abundancia son las de mucus. De manera particular, las γ -proteobacteria son abundantes en los grados de salud D2 y de la α -proteobacteria resultan ser más abundantes en las muestras cuyo origen es La Boquita tanto de mucus como de pólipos. Otra clase cuya presencia es visible es *Flavobacteria* perteneciente al phylum *Bacteroidetes* y que se encuentran presentes en la mayoría de las muestras tanto de mucus como de pólipos, sin embargo, esta clase se encuentra mayormente presente en las muestras de La Boquita. Solo por mencionar la clase *Chlorobi* se encuentra de manera representativa en la réplica 3 de Bahía Carrizales tanto la muestra de mucus como en la de pólipo, aunque más representada en la primera. Por último, la clase *Actinobacteria* a pesar de encontrarse presente en todas las muestras, su presencia es más visible en aquellas cuyo origen es La Boquita y de manera más particular en la réplica 2 del grado de salud D4 de pólipos. Cabe mencionar que las secuencias UI incrementan principalmente en los grados de salud D4 y D6 (Fig. 20).

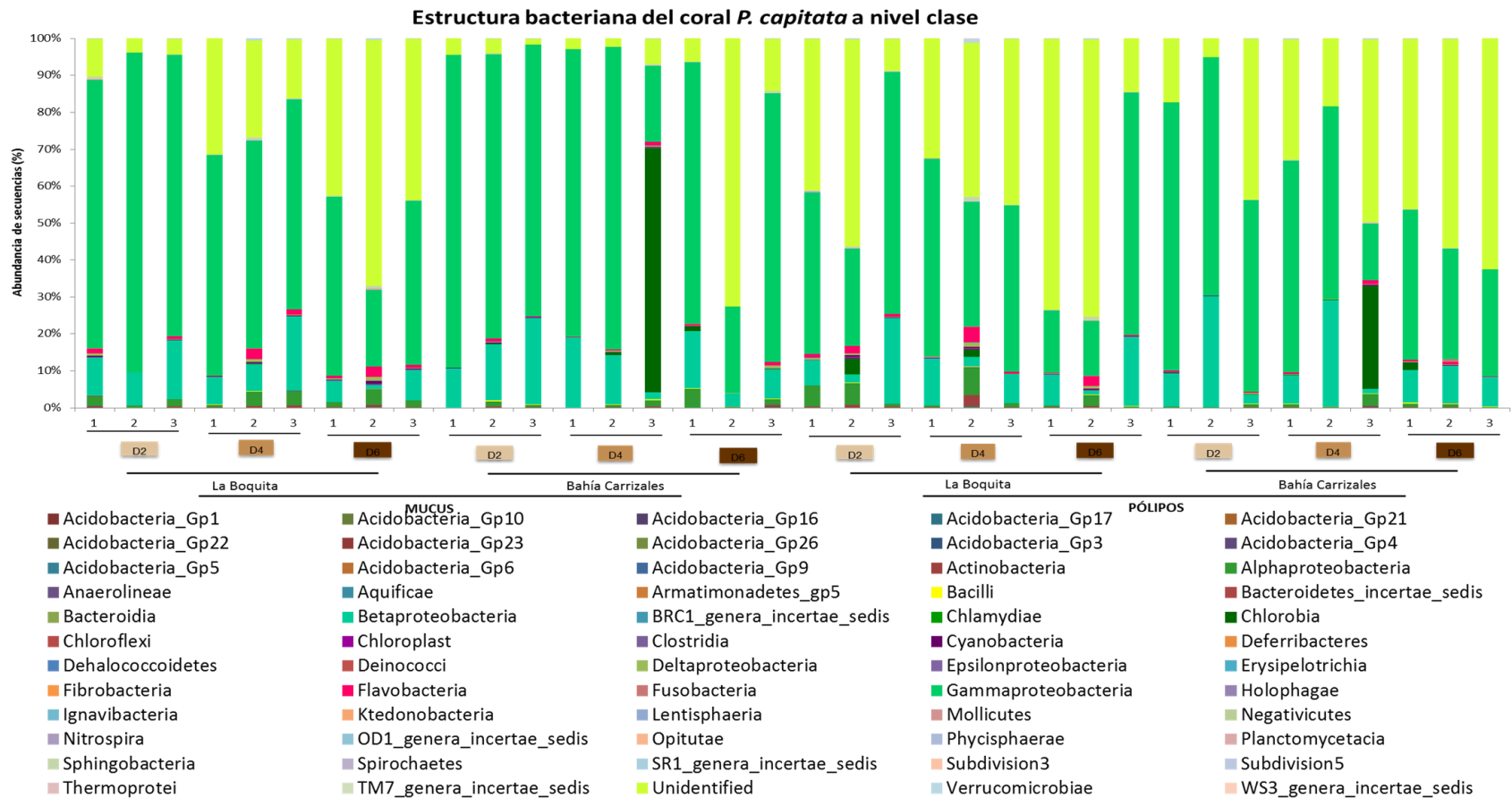


Figura 20. Estructura bacteriana del coral *P. capitata* a nivel clase de las 36 muestras de mucus y pólipos de corales de los arrecifes de Manzanillo, Colima. El número 1, 2 y 3 representan las réplicas, y, D2, D4 y D6 me representan el grado de salud de acuerdo al CoralWatch.

En la figura 21 podemos observar claramente cuáles fueron los órdenes más abundantes, denotando que en la mayoría de las muestras y principalmente en las de mucus fueron las *Enterobacteriales*. Otro orden abundante fue los *Thiotrichales*, también presente en la mayoría de las muestras, sin embargo, en aquellas derivadas de La Boquita tanto de mucus como de pólipos su abundancia fue más representativa. El orden de las *Burkholderiales* se encontró presente en todas las muestras aunque se observa más representado en las muestras de mucus, comportamiento algo similar al orden *Enterobacteriales*. En el orden de las *Flavobacteriales* se encuentra distribuido en las muestras de mucus y pólipos pero más abundante en las pertenecientes a La Boquita y de acuerdo al grado de salud en el D6. El orden Rhodospirillales aunque se encuentre en la mayoría de las muestras su presencia es más visible en las muestras de mucus y de manera particular en la réplica 1 del grado de salud D6 de Carrizales. Por último el orden Chlorobiales resulta ser más abundante en las muestras del grado de salud D4 de Carrizales que en el resto de las muestras. El grupo de secuencias no identificadas es mayor en las muestras de pólipos particularmente en las del grado de salud D6 para los dos sitios de origen que son La Boquita y Bahía Carrizales; sin embargo, principalmente en el primer sitio (lista completa de órdenes identificados ver anexo 9).

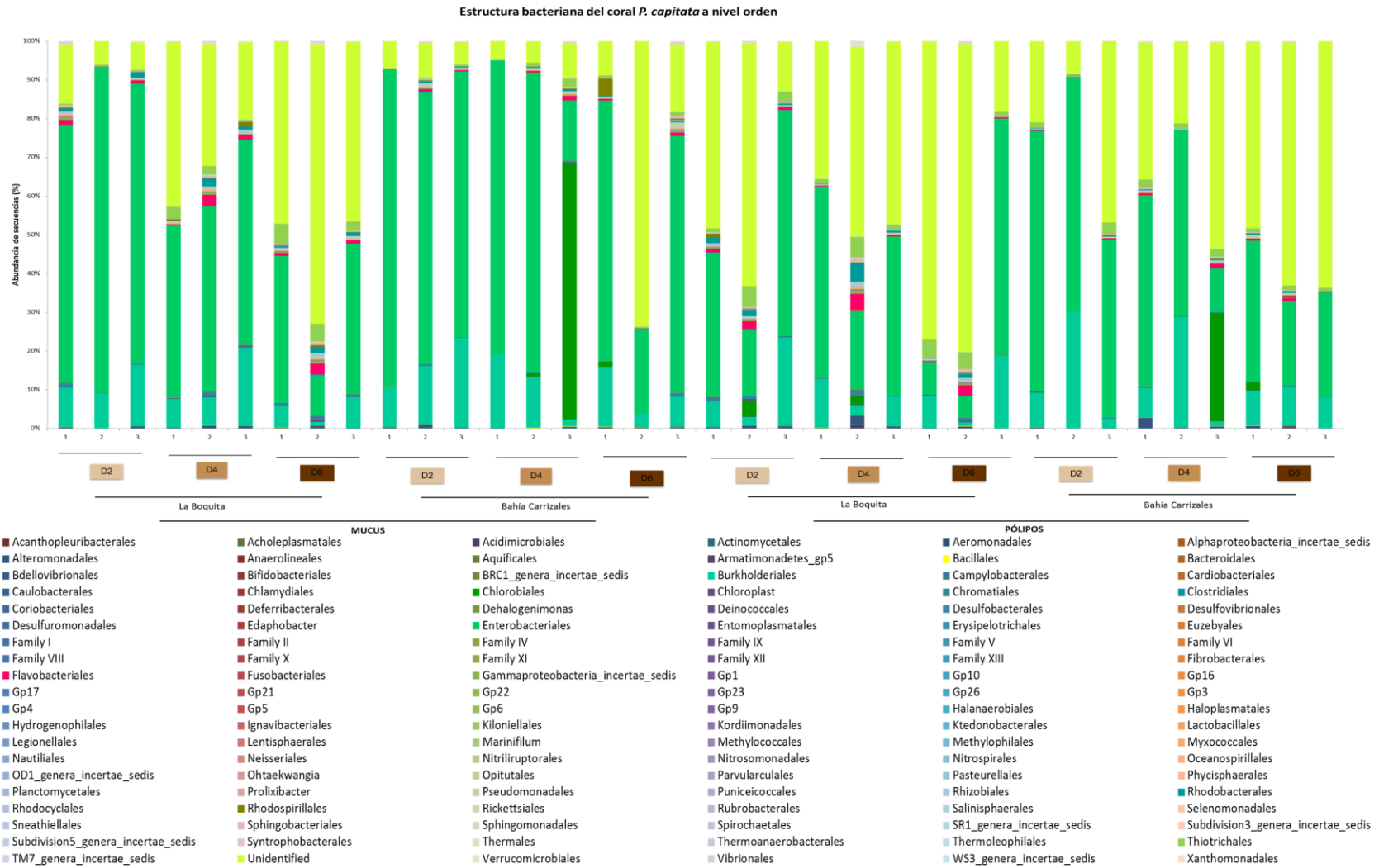


Figura 21. Estructura bacteriana del coral *P. capitata* a nivel orden de las 36 muestras de mucus y pólipos de corales de los arrecifes de Manzanillo, Colima. El número 1, 2 y 3 representan las réplicas, y, D2, D4 y D6 me representan el grado de salud de acuerdo al CoralWatch.

En la figura 22 se observa la distribución de cada una de las familias en cada una de las muestras (anexo 10 lista completa de familias identificadas), y con ello se denota que de las familias presentes la que tiene mayor abundancia es la *Enterobacteriaceae* que se encuentra en la mayoría de las muestras; sin embargo, en las muestras de mucus es más representativa en comparación a los pólipos, y, de acuerdo al grado de salud la abundancia es mayor en las muestras de grado de salud D2. Otra familia cuya abundancia es representativa es la *Burkholderiaceae*, la cual tiene un comportamiento similar a la familia anterior, es decir, más abundante en las muestras de mucus y grado de salud D2. *Flavobacteriaceae* es una familia abundante tanto en muestras de mucus como de pólipos de La Boquita principalmente ya que en Carrizales no es tan representativa; de acuerdo al grado de salud es más abundante en D4 y D6. La familia *Francisellaceae* tanto en las muestras de mucus como en las de pólipos de La Boquita resulta ser más abundante, sin menospreciar su presencia en las muestras de pólipos de Carrizales y de acuerdo al grado de salud es más abundante en el D6. La *Rhodobacteraceae*, a pesar de encontrarse presente en la mayoría de las muestras es más representativa en las de pólipos de La Boquita. Por último la familia *Alteromonadaceae* representativa en las muestras de pólipos de ambos sitios. No debemos olvidar el grupo reconocido como Unidentified el cual comienza a incrementar su número de secuencias presentes en este grupo y principalmente en las muestras de pólipos tanto del grado de salud D6 y un poco menos D2; una excepción en las muestras de mucus en el grado de salud D6 es el que presenta un mayor incremento dentro de las muestras de este tipo de tejido.

Estructura bacteriana del coral *P. capitata* a nivel familia

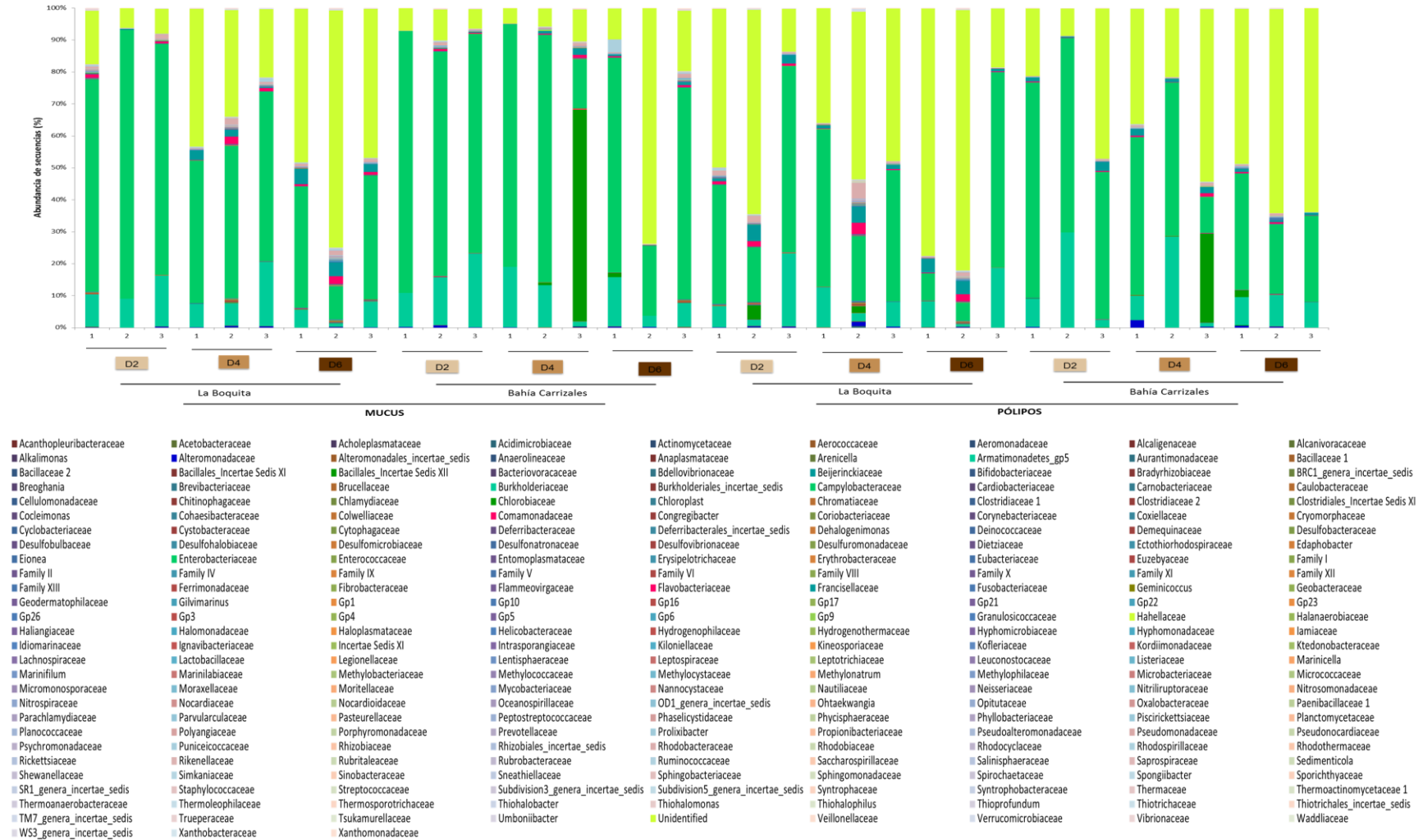


Figura 22. Estructura bacteriana del coral *P. capitata* a nivel familia de las 36 muestras de mucus y pólipos de corales de los arrecifes de Manzanillo, Colima. El número 1, 2 y 3 representan las réplicas, y, D2, D4 y D6 me representan el grado de salud de acuerdo al CoralWatch.

De igual manera que con QIIME, para el programa RDP se presenta la tabla 13 se observan los phyla, clases, órdenes, familias y géneros más abundantes con respecto al porcentaje de secuencias asociadas a una OTU de acuerdo al tipo de tejido (mucus y pólipos), sitio de muestreo (La Boquita y Bahía Carrizales) y grado de salud (D2, D4 y D6) identificados por RDP.

Tabla 13. Taxa más abundantes y representativos según RDP Classifier del coral *P. capita* de acuerdo al sitio de muestreo, tipo de tejido y grado de salud coralina. UI: Unidentified.

Variable	Phylum	Clase	Orden	Familia	Género	
Sitios de muestreo	La Boquita	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Acidomicrobiales</i>	<i>Alteromonadaceae</i>	<i>Alkalibacter</i>
		<i>Bacteroidetes</i>	<i>α-proteobacteria</i>	<i>Alteromonadales</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Alteromonas</i>
		<i>Chlorobi</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Chitiophaganaceae</i>	<i>Bergeyella</i>
		<i>Cyanobacteria/ Chloroplast</i>	<i>β-proteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Chlorobiaceae</i>	<i>Burkholderia</i>
		<i>Firmicutes</i>	<i>Chlorobia</i>	<i>Chlorobiales</i>	<i>Chromatiaceae</i>	<i>Francisella</i>
		<i>Proteobacteria</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Chromatiales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Chlorobium</i>
		<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Flavobacteria</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Serratia</i>
		UI	<i>γ-proteobacteria</i>	<i>Desulfobacterales</i>	<i>Francisellaceae</i>	UI
			<i>Sphingobacteria</i>	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Vibrionaceae</i>	
			<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Flavobacteriales</i>	UI	
		UI	<i>Rhizobiales</i>			
			<i>Rhodobacteriales</i>			
			<i>Sphingobacteriales</i>			
			<i>Vibrionales</i>			
			<i>Verrucomicrobiales</i>			
			UI			
	Bahía Carrizales	<i>Bacteroidetes</i>	<i>α-proteobacteria</i>	<i>Alteromonadales</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Alkalibacter</i>
		<i>Chlorobi</i>	<i>β-proteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Chlorobiaceae</i>	
		<i>Firmicutes</i>	<i>Chlorobia</i>	<i>Chlorobiales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Burkholderia</i>
		<i>Proteobacteria</i>	<i>Flavobacteria</i>	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Eubacteriaceae</i>	
UI		<i>γ-proteobacteria</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Francisella</i>	

			UI	<i>Myxococcales</i> <i>Rhizobiales</i> <i>Thiotrichales</i> <i>Xanthomonadales</i> UI	<i>Francisellaceae</i> <i>Lachnospiraceae</i> UI	<i>Chlorobium</i> <i>Serratia</i> UI
Tipo de tejido	Mucus	<i>Bacteroidetes</i> <i>Chlorobi</i> <i>Firmicutes</i> <i>Proteobacteria</i> UI	α -proteobacteria <i>Bacteroidia</i> β -proteobacteria <i>Chlorobia</i> <i>Flavobacteria</i> γ -proteobacteria UI	<i>Alteromonadales</i> <i>Bacteroidales</i> <i>Burkholderiales</i> <i>Chlorobiales</i> <i>Enterobacteriales</i> <i>Flavobacteriales</i> <i>Rhodospirillales</i> <i>Sphingobacteriales</i> <i>Thiotrichales</i> <i>Xanthomonadales</i> UI	<i>Burkholderiaceae</i> <i>Chlorobiaceae</i> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Flavobacteriaceae</i> <i>Francisellaceae</i> <i>Lachnospiraceae</i> <i>Rhodospirillaceae</i> <i>Xanthomonadaceae</i> UI	<i>Burkholderia</i> <i>Francisella</i> <i>Chlorobium</i> <i>Serratia</i> UI
	Pólipos	<i>Actinobacteria</i> <i>Bacteroidetes</i> <i>Chlorobi</i> <i>Firmicutes</i> <i>Proteobacteria</i> <i>Verrucomicrobia</i> UI	<i>Actinobacteria</i> α -proteobacteria <i>Bacteroidia</i> β -proteobacteria <i>Chlorobia</i> <i>Flavobacteria</i> γ -proteobacteria <i>Sphingobacteria</i> <i>Verrucomicrobiae</i> UI	<i>Alteromonadales</i> <i>Bacteroidales</i> <i>Burkholderiales</i> <i>Chlorobiales</i> <i>Chromatiales</i> <i>Enterobacteriales</i> <i>Flavobacteriales</i> <i>Myxococcales</i> <i>Rhizobiales</i> <i>Rhodobacterales</i> <i>Rhodospirillales</i> <i>Sphingobacteriales</i> <i>Thiotrichales</i> <i>Vibrionales</i> <i>Verrucomicrobiales</i> <i>Xanthomonadales</i> UI	<i>Alteromonadaceae</i> <i>Burkholderiaceae</i> <i>Chlorobiaceae</i> <i>Chromatiaceae</i> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Eubacteriaceae</i> <i>Flavobacteriaceae</i> <i>Francisellaceae</i> <i>Lachnospiraceae</i> <i>Rhodobacteraceae</i> <i>Vibrionaceae</i> <i>Xanthomonadaceae</i> UI	<i>Alkalibacter</i> <i>Alteromonas</i> <i>Burkholderia</i> <i>Francisella</i> <i>Chlorobium</i> <i>Serratia</i> <i>Rhodobium</i> UI
Grado de salud	D2	<i>Actinobacteria</i> <i>Bacteroidetes</i> <i>Chlorobi</i> <i>Cyanobacteria/</i>	<i>Actinobacteria</i> α -proteobacteria <i>Bacteroidia</i> β -proteobacteria	<i>Alteromonadales</i> <i>Bacteroidales</i> <i>Burkholderiales</i> <i>Chlorobiales</i>	<i>Alteromonadaceae</i> <i>Burkholderiaceae</i> <i>Chlorobiaceae</i> <i>Desulfobacteraceae</i>	<i>Alkalibacter</i> <i>Alteromonas</i> <i>Burkholderia</i> <i>Chlorobium</i>

	<i>Chloroplast</i> <i>Firmicutes</i> <i>Proteobacteria</i> <i>Verrucomicrobia</i> UI	<i>Chlorobia</i> <i>Flavobacteria</i> γ - <i>proteobacteria</i> <i>Sphingobacteria</i> <i>Verrucomicrobiae</i> UI	<i>Chromatiales</i> <i>Desulfobacterales</i> <i>Enterobacteriales</i> <i>Flavobacteriales</i> <i>Rhizobiales</i> <i>Rhodobacteriales</i> <i>Sphingobacteriales</i> <i>Thiotrichales</i> <i>Vibrionales</i> <i>Verrucomicrobiales</i> UI	<i>Chromatiaceae</i> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Eubacteriaceae</i> <i>Flavobacteriaceae</i> <i>Francisellaceae</i> <i>Lachnospiraceae</i> <i>Rhodobacteraceae</i> UI	<i>Serratia</i> <i>Francisella</i> UI
D4	<i>Bacteroidetes</i> <i>Chlorobi</i> <i>Firmicutes</i> <i>Proteobacteria</i> UI	α - <i>proteobacteria</i> <i>Bacteroidia</i> β - <i>proteobacteria</i> <i>Chlorobia</i> <i>Flavobacteria</i> γ - <i>proteobacteria</i> <i>Sphingobacteria</i> UI	<i>Alteromonadales</i> <i>Bacteroidales</i> <i>Burkholderiales</i> <i>Chlorobiales</i> <i>Chromatiales</i> <i>Enterobacteriales</i> <i>Flavobacteriales</i> <i>Rhodobacteriales</i> <i>Sphingobacteriales</i> <i>Thiotrichales</i> UI	<i>Alteromonadaceae</i> <i>Burkholderiaceae</i> <i>Chlorobiaceae</i> <i>Desulfobacteraceae</i> <i>Chromatiaceae</i> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Eubacteriaceae</i> <i>Flavobacteriaceae</i> <i>Francisellaceae</i> <i>Lachnospiraceae</i> <i>Rhodobacteraceae</i> UI	<i>Alkalibacter</i> <i>Alteromonas</i> <i>Burkholderia</i> <i>Chlorobium</i> <i>Serratia</i> UI
D6	<i>Actinobacteria</i> <i>Bacteroidetes</i> <i>Firmicutes</i> <i>Proteobacteria</i> UI	<i>Actinobacteria</i> α - <i>proteobacteria</i> <i>Bacteroidia</i> β - <i>proteobacteria</i> <i>Flavobacteria</i> γ - <i>proteobacteria</i> <i>Sphingobacteria</i> UI	<i>Alteromonadales</i> <i>Bacteroidales</i> <i>Burkholderiales</i> <i>Enterobacteriales</i> <i>Flavobacteriales</i> <i>Myxococcales</i> <i>Rhodobacteriales</i> <i>Rhodospirallales</i> <i>Sphingobacteriales</i> <i>Thiotrichales</i> UI	<i>Burkholderiaceae</i> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Flavobacteriaceae</i> <i>Francisellaceae</i> <i>Lachnospiraceae</i> <i>Rhodobacteraceae</i> UI	<i>Burkholderia</i> <i>Serratia</i> UI

Debido a que a nivel género fueron identificados 600 (lista completa ver anexo 10), se optó por las gráficas pastel; sin embargo, estas serán agrupadas por tipo de tejido (mucus y pólipos) y por grado de salud (D2, D4 y D6). Por lo tanto, en la figura 20 se observa que el género más abundante fue *Serratia* cuya abundancia es mayor al 50% tanto en las muestras de mucus de Bahía Carrizales (63%) y de La Boquita (59%), así como en las muestras de pólipos de La Boquita (42%) y Carrizales (48%). Otros géneros cuyo porcentaje de abundancia es representativo son *Burkholderia*, en las muestras de Carrizales con un 13% en ambos tejidos y en La Boquita 12% en las muestras de mucus y 11% en pólipos; *Francisella*, principalmente presente en las muestras de pólipos de La Boquita (3%) y en mucus 2% contrario a las muestras de Carrizales con 1% y 2% en pólipos; *Chlorobium*, abundante en las muestras de Carrizales, y el grupo de secuencias UI mayor en las muestras de pólipos con un 7% en La Boquita y 10% en Carrizales.

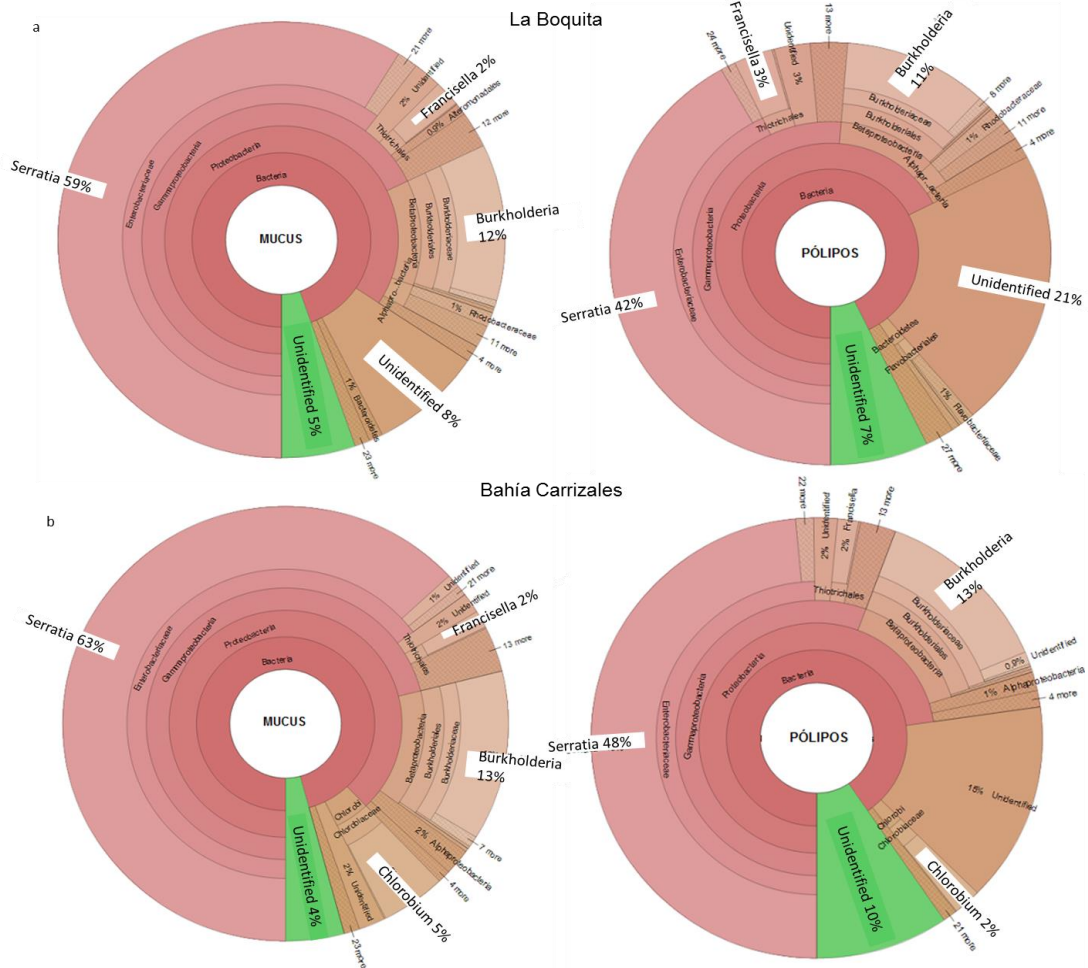


Figura 23. Estructura bacteriana general a nivel género del coral *P. capitata* de las muestras de mucus y pólipos; a) La Boquita; b) Bahía Carrizales.

De acuerdo al grado de salud todas las muestras de mucus y pólipos, podemos ver en la figura 24 como se encuentran distribuidos todos los géneros que fueron identificados en las muestras de mucus y se observa que las muestras del grado de salud D6 (coral sano) presentan una mayor variedad que las muestras del D2 aunque también una gran cantidad de secuencias fue agrupada como UI. También se observa que en todas las muestras del mucus el género más abundante fue *Serratia* cuyo porcentaje fue superior al 50%, la única excepción es la muestra SBD6M cuya abundancia es menor presentando solo un 46%, contrario a la muestra de Carrizales el cual el género *Serratia* tiene una abundancia del 60%, cabe recalcar que la mayor abundancia se

presenta en las muestra del grado de salud D2 tanto de La Boquita como de Carrizales con 71% y 70% respectivamente; en D4 este género se encuentra más abundante en Carrizales con un 59% y 57% para La Boquita. El género *Burkholderia* en las muestras de mucus de Carrizales tanto en el grado de salud D2 como D6 (15% y 11% respectivamente) resulta ser más abundante con respecto a las de La Boquita (12% y 9%), contrario al grado de salud D4 el cual su presencia es mayor en La Boquita que en Carrizales (14% y 12% respectivamente). *Francisella* es más abundante en las muestras de La Boquita en los grados de salud mayores D4 y D6 (2% y 3%), el D2 tanto de La Boquita como de Carrizales presenta solo 1% al igual que el D6 de la última área mencionada, D4 de Carrizales presento la misma abundancia que el D4 de La Boquita. De manera muy particular el género *Chlorobium* en el grado D4 de Carrizales se hace presente con un 14% de abundancia. El grupo UI es <1% en los grados de salud D2 tanto de La Boquita como de Carrizales y D4 del último sitio mencionado contrario al grado de salud D6 en donde en ambas localidades su abundancia se encuentra superior al 10%.

El género *Serratia* resulta ser el más abundante en primer lugar en las muestras de mucus y en segundo de pólipos. De acuerdo al grado de salud se observa que es mayor su presencia en D2 y decrece conforme incrementa el grado de salud; sólo a excepción en D6 de Carrizales la abundancia de este género es abundante comparado con D4. Otro género es el *Burkholderia* el cual presenta un comportamiento similar al anterior, ya que la mayor abundancia se presenta en las muestras del grado de salud D2, solo excepcionalmente en la muestra de pólipos de Carrizales del grado de salud D4 fue elevado. *Francisella* contrario a los géneros anteriormente mencionados cuya mayor abundancia se encuentra en los organismos de Carrizales, en este género la mayor abundancia se encuentra en las muestras derivadas de La Boquita y cuyos grados de salud son elevados D4 y D6, de manera especial en D6 de Carrizales la presencia de este género es sólo de 1%. *Chlorobium* en D4 de Carrizales se presenta en un 5% que es en menor proporción que en la muestra de mucus de este mismo grado de salud y localidad como anteriormente se había observado.

El grupo de secuencias identificadas como UI es mayor en las muestras de grado de salud D6 en especial en la de Carrizales con un 22% y 11% en La Boquita, en los grados de salud D2 de La Boquita, D2 y D4 de Carrizales el porcentaje de presencia es <5% y un intermedio con un 8% en D4 de La Boquita (Fig.25).

En la figura 26 se muestran los tres géneros más abundantes y el grupo UI con su respectiva abundancia en porcentaje de las muestras de La Boquita. Los tres géneros abundantes pertenecen al phylum *Proteobacteria* y a la clase *γ.proteobacteria*; se observa claramente que tanto el género *Serratia* como el *Burkholderia* disminuyen conforme incrementa el grado de salud, contrario a la abundancia de las secuencias UI, ya que estas incrementan en los mejores grados de salud (D4 y D6).

En la figura 27 de igual manera a la anterior, muestra los cuatro géneros más abundantes, agregando uno más que solo se encontró presente en el grado de salud D4 que es el género *Chlorobium*. El género *Serratia* resultó ser uno de los más abundantes en ambos tipos de muestras, aunque de manera muy particular en el grado de salud D6 de la muestra de mucus este género resultó ser muy abundante en comparación con las muestras del mismo grado

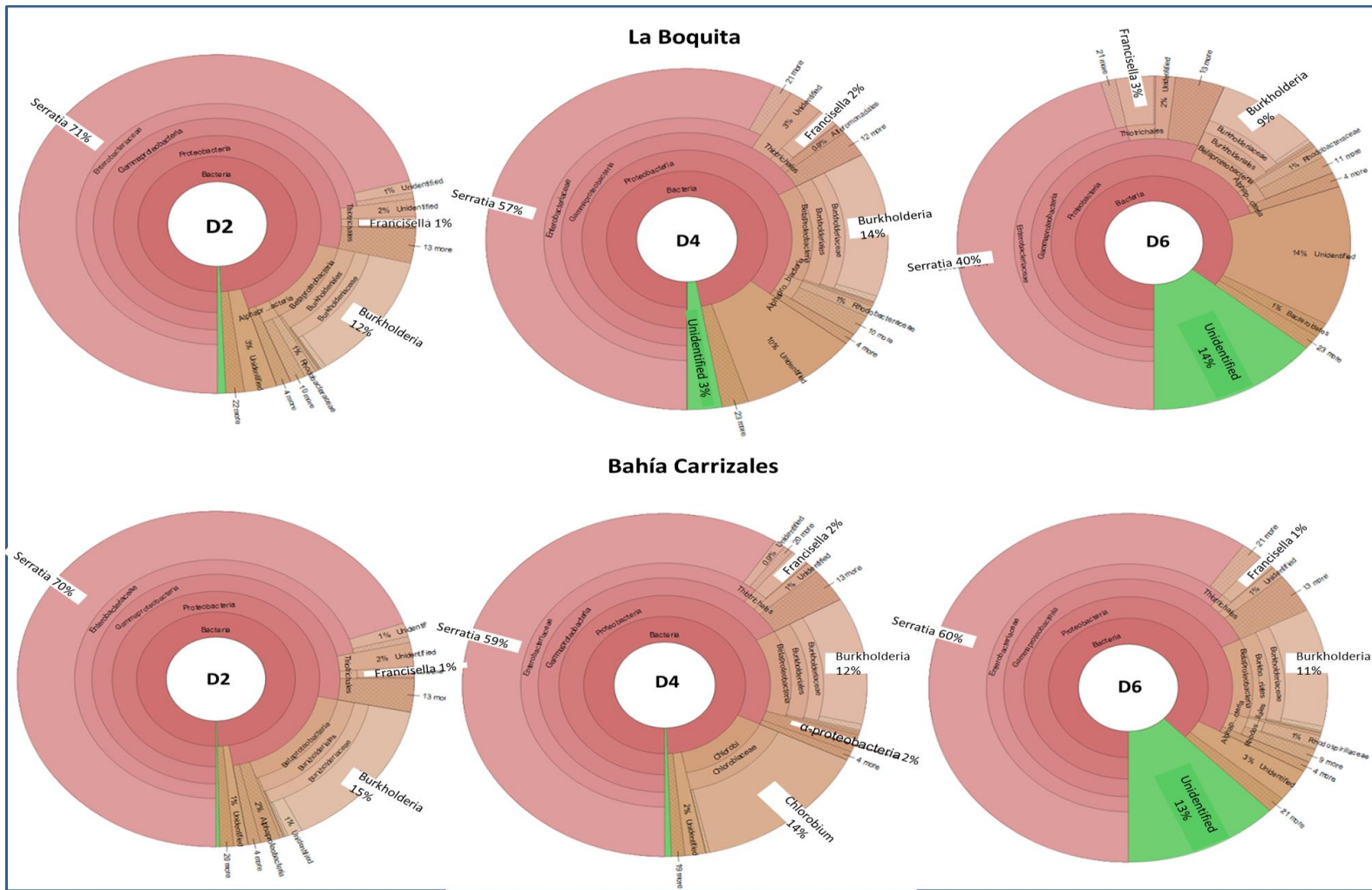


Figura 24. Estructura bacteriana general a nivel genero del coral *P. capitata* de las muestras de mucus de acuerdo al grado de salud de La Boquita y Bahía Carrizales

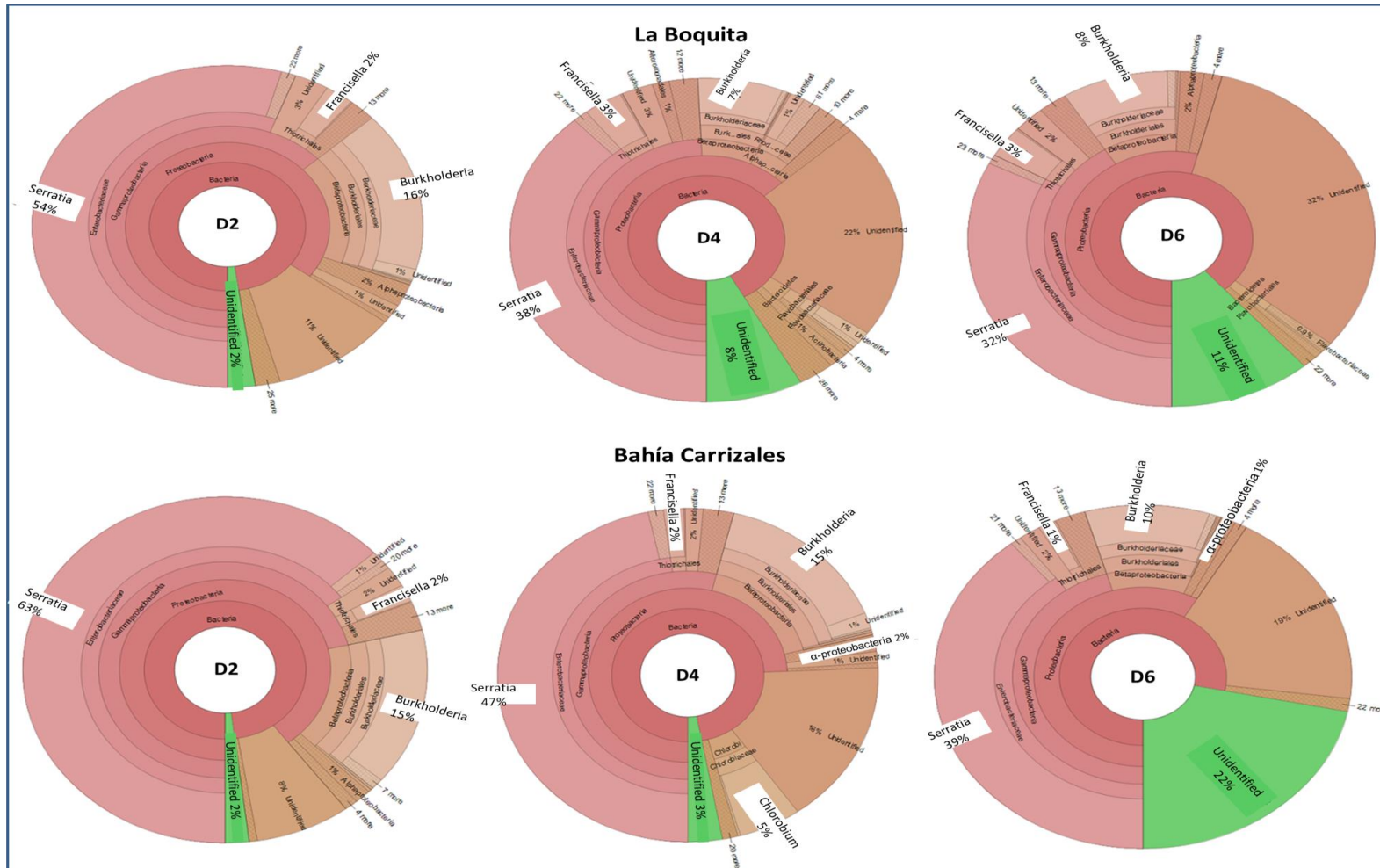


Figura 25. Estructura bacteriana general a nivel genero del coral *P. capitata* de las muestras de pólipos de acuerdo al grado de salud de La Boquita y Bahía Carrizales

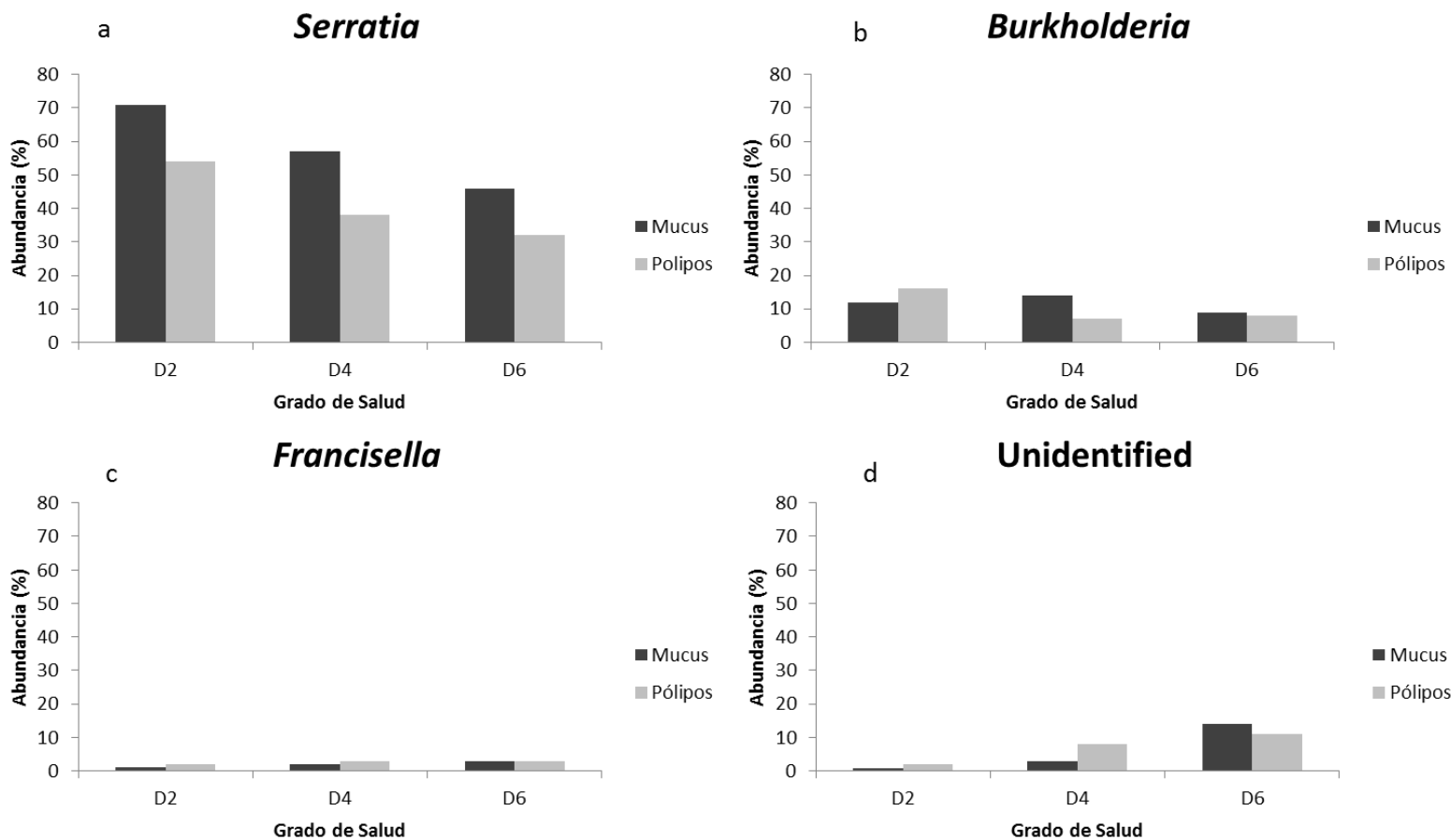


Figura 26. Porcentajes de abundancia de OTUs a nivel género obtenidos mediante el programa RDP Classifier de las muestras de mucus y pólipos de La Boquita; a) *Serratia*, b) *Burkholderia*, c) *Francisella* y d) Unidentified

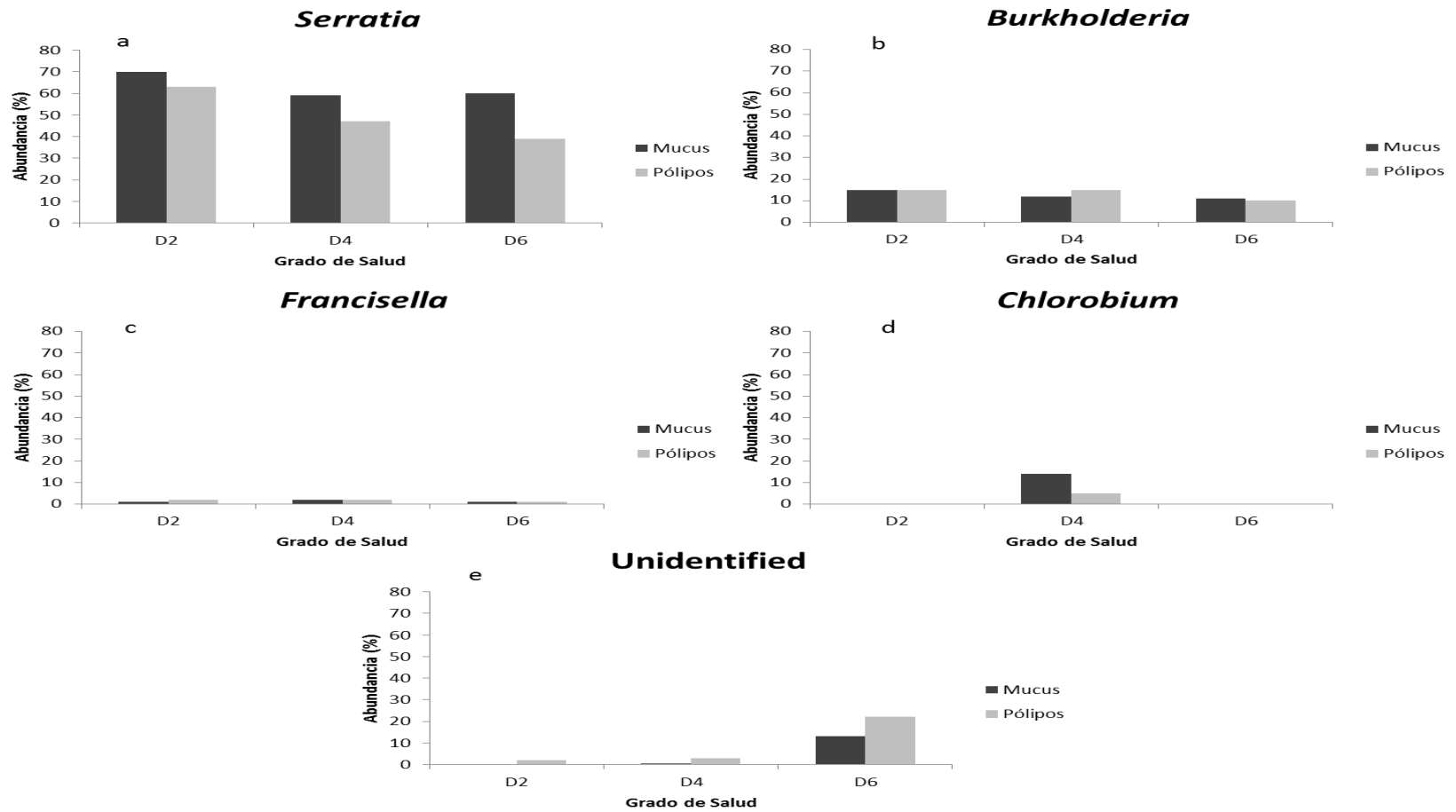


Figura 27. Porcentaje de abundancia de OTUs a nivel género obtenidos mediante el programa RDP Classifier de las muestras de mucus y pólipos de Bahía Carrizales; a) *Serratia*, b) *Burkholderia*, c) *Francisella*, d) *Chlorobium* y e) Unidentified.

6.5 Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó la tabla de OTUs derivada del programa RDP Classifier debido a que se identificó un mayor número de géneros comparado con QIIME, a pesar del grupo de secuencias Unidentified; por lo que a partir de las diferencias significativas existentes entre las variables independientes que fueron: 1) el grado de salud coralina (D2, D4 y D6), 2) el sitio de muestreo (La Boquita y Bahía Carrizales) y 3) el tipo de muestra (mucus y pólipos); la variable que posee un mayor número de taxones con diferencias significativas es la variable número 2 y la de menor número de taxones con diferencias significativas es la 1. Cabe recalcar que en la variable de los grados de salud también se observa que a nivel dominio se presentaron diferencias significativas entre las bacterias y el grupo Unidentified (Tabla 14).

Tabla 14. Número de taxa que presentan diferencias significativas ($p < 0.05$) en cada una de las variables independientes y clasificación taxonómica.

	Dominio (N=3)	Phyla (N=29)	Clase (N=60)	Orden (N=120)	Familia (N=246)	Género (N=601)
Mucus y pólipos	0	3	2	3	7	16
Sitios (La Boquita y Carrizales)	0	10	18	33	56	75
Grados de salud (D2, D4 y D6)	2	2	2	2	2	4

De manera general de acuerdo al grado de salud en el análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en inglés) se puede observar la manera en que se encuentran distribuidas las muestras, de tal manera que la mayoría de las muestras se podrían agrupar en 5 grupos, el primero de color azul claro incluye muestras del grado de salud D2, D4 y D6 y en su mayoría muestras de Carrizales, el segundo grupo de color amarillo son muestras completamente del grado D4 por lo que pudieran ser más homogéneos sus

componentes; el tercer grupo de color verde que incluye en su mayoría muestras con grado de salud D6; sin embargo, también incluye del grado de salud D2 y D4, aunque las muestras de estos grados son de pólipos; el penúltimo grupo de color morado que incluye prácticamente el grado D6 a excepción de una D2 de pólipos, y por último el grupo más alejado es el que está conformado por dos muestras del grado de salud D4 cuyo tejido es diferente al igual que resulta ser de diferentes localidades. El PCA de acuerdo a los sitios de extracción de origen de las muestras y el del tipo de tejido no se presentan pues tiene una distribución similar al de los grados de salud (Fig. 28).

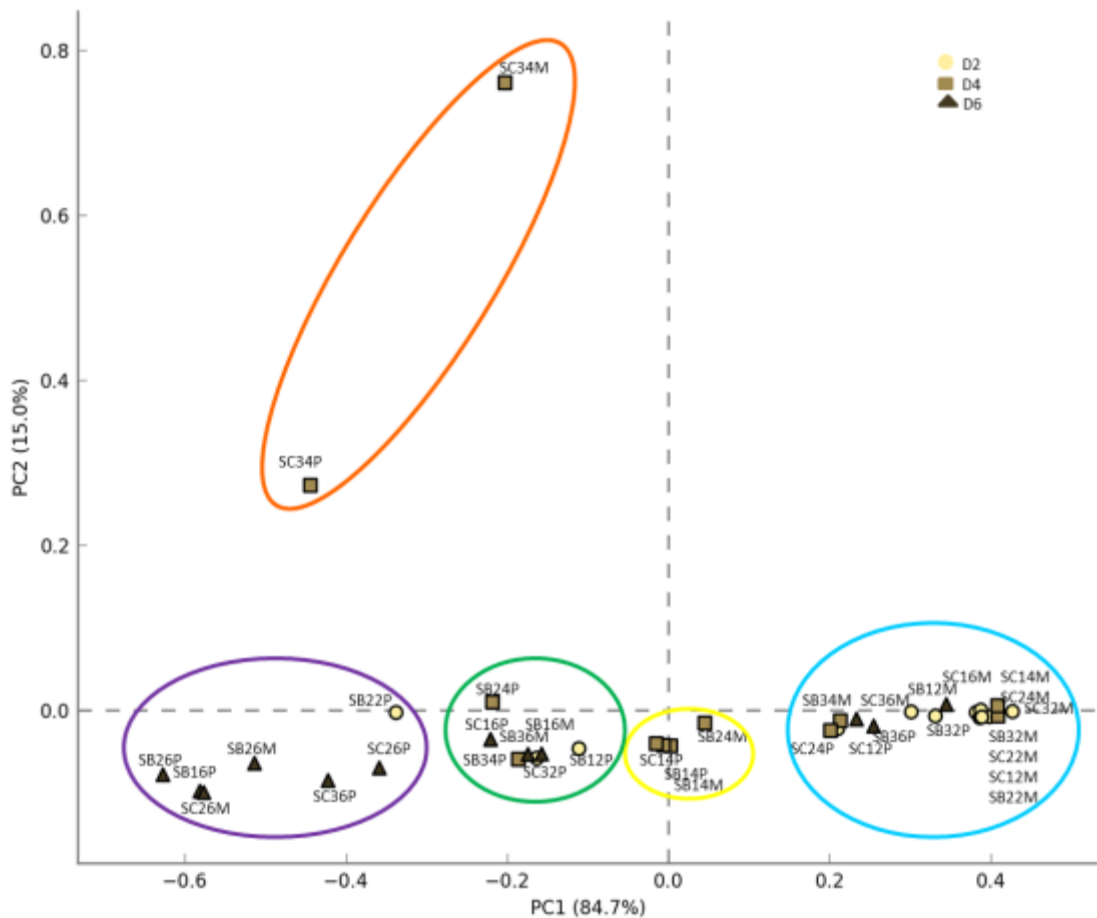


Figura 28. Distribución de la comunidad bacteriana en las muestras en el análisis de componentes principales de acuerdo al grado de salud; los círculos indican el D2, los cuadros D4 y los triángulos representan el grado D6.

Analizando la primera variable independiente que fue entre el tipo de tejido ya sea mucus o pólipos, se observa que a nivel phyla los taxones que presentan diferencias significativas fueron *Choroflexi*, *Proteobacteria*; a nivel clase solo existen diferencias significativas en la γ -*proteobacterias*; a nivel orden los 2 taxones con diferencias significativas fueron *Enterobacteriales*, *Lactobacillales*; a nivel familia, *Bacterovoracaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Kofleriaceae*, *Microbacteriaceae*, *Planococaceae* y *Streptococcaceae*, y a nivel género los que presentaron diferencias significativas fueron *Delftia*, *Acidoborax*, *Acinetobacter*, *Algibacter*, *Coxiella*, *Erythrobacter*, *Hellea*, *Kofleria*, *Lactococcus*, *Mesorhizobium*, *Serratia*, *Sporosarcina*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Verrucomicrobium*; sin olvidar que en todos los niveles taxonómicos el grupo Unidentified presentó diferencias significativas. Como a nivel phylum el único que presentó diferencias significativas fue el *Proteobacteria* en la siguiente figura se muestra como quedó diferenciado entre ambos tipos de tejido denotando que hay una mayor abundancia de este phylum en las muestras de mucus que de pólipos.

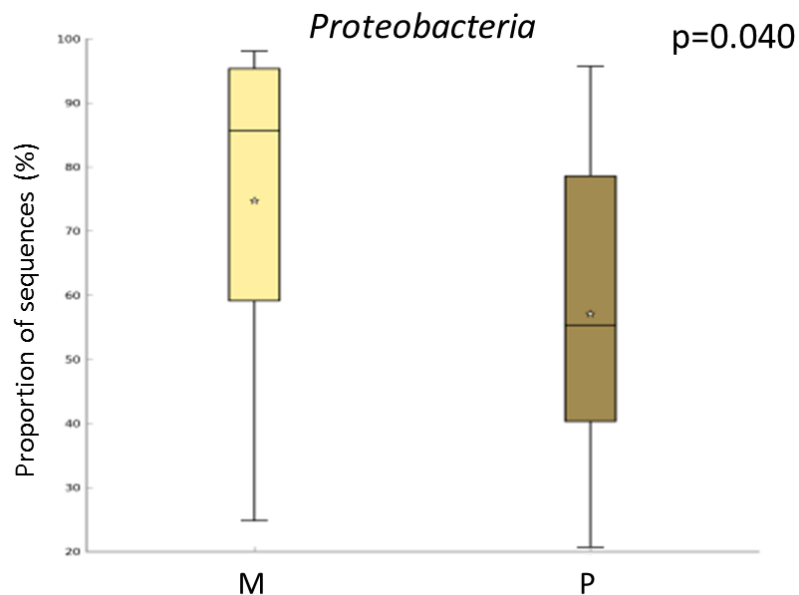


Figura 29. Diferencias significativas del phylum *Proteobacteria* de acuerdo a su abundancia en las muestras de mucus y pólipos ($p < 0.05$).

Por lo anteriormente descrito con respecto a la abundancia que se tiene del género *Serratia* que pertenece al phylum *Proteobacteria* en la siguiente figura se muestran las diferencias significativas que hubo para esta variable de este género y se debe a que hay una mayor presencia de ***Serratia* en el mucus que en los pólipos** (Fig. 30).

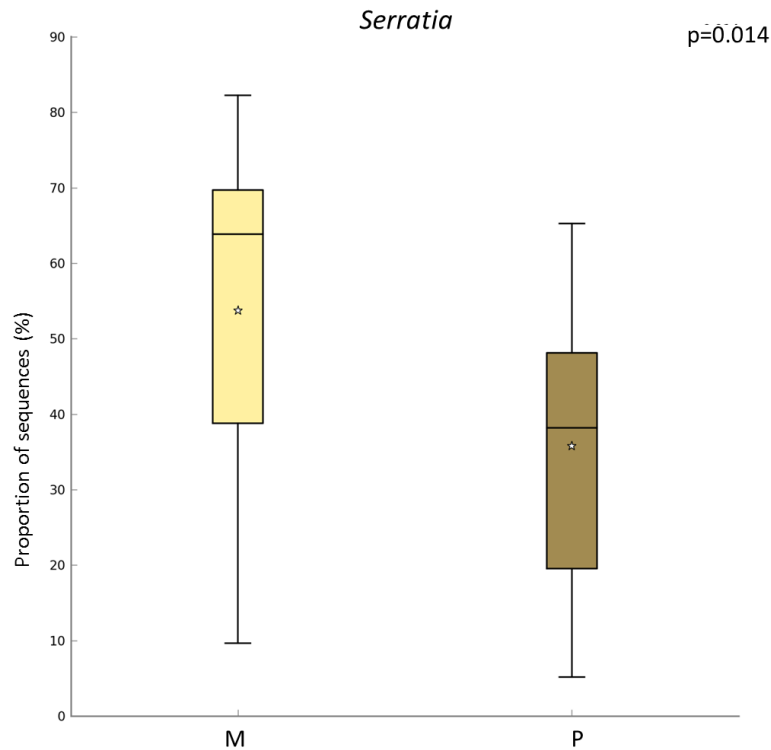


Figura 30. Diferencias significativas del género *Serratia* de acuerdo a su abundancia en las muestras de mucus y pólipos ($p < 0.05$).

La segunda variable independiente que es los sitios de muestreo (La Boquita y Bahía Carrizales) fue la que obtuvo un mayor número de taxones que presentaron diferencias significativas; sin embargo, debido a ello no se podrán mencionar todos los taxones. A nivel phylum los que presentaron diferencias significativas fueron *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria/Chloroplast*, *Verrucomicrobia*, *TM7*, *Planctomycetes*, *Nitrospira* y *Lentisphaera*. A nivel clase de los taxones de mayor importancia fueron *Verrucomicrobiae*, α -*proteobacterias*, *Flavobacterias*, δ -*proteobacteria*, entre otros. A nivel orden los *Flavobacteriales*, *Cromatiales*, *Desulfubacterales*, *Thiotrichales*,

Rhodobacterales, *Rhizobiales*, entre otros; analizando a nivel género de entre los importantes que presentan diferencias significativas se tiene el género *Francisella*, *Desulfobacter*, *Lactococcus* y *Ulvibacter*, este último tiene solo presencia en organismos de La Boquita y es ausente en Carrizales. Se denota que en esta variable no se presentan diferencias significativas en el grupo UI. En la figura 31 se muestran las diferencias significativas que se presentaron a nivel phylum en algunos de los taxones, en a) se muestra la gráfica correspondiente al phylum *Acidobacteria* observando que hay una mayor presencia abundancia en el sitio SB (La Boquita) que en SC (Carrizales), esto se observa de manera similar en los otros phyla; sin embargo, en d) correspondiente al phylum *Verrucomicrobia* presenta una mayor similitud de distribución que en los otros. En *Bacteroidetes* que es 29b y 20c correspondiente al phylum *Cyanobacteria/Chloroplast* se muestra que en ambos phyla debido a que existe una mayor abundancia en La Boquita que en Carrizales las diferencias significativas entre estos sitios es más representativa.

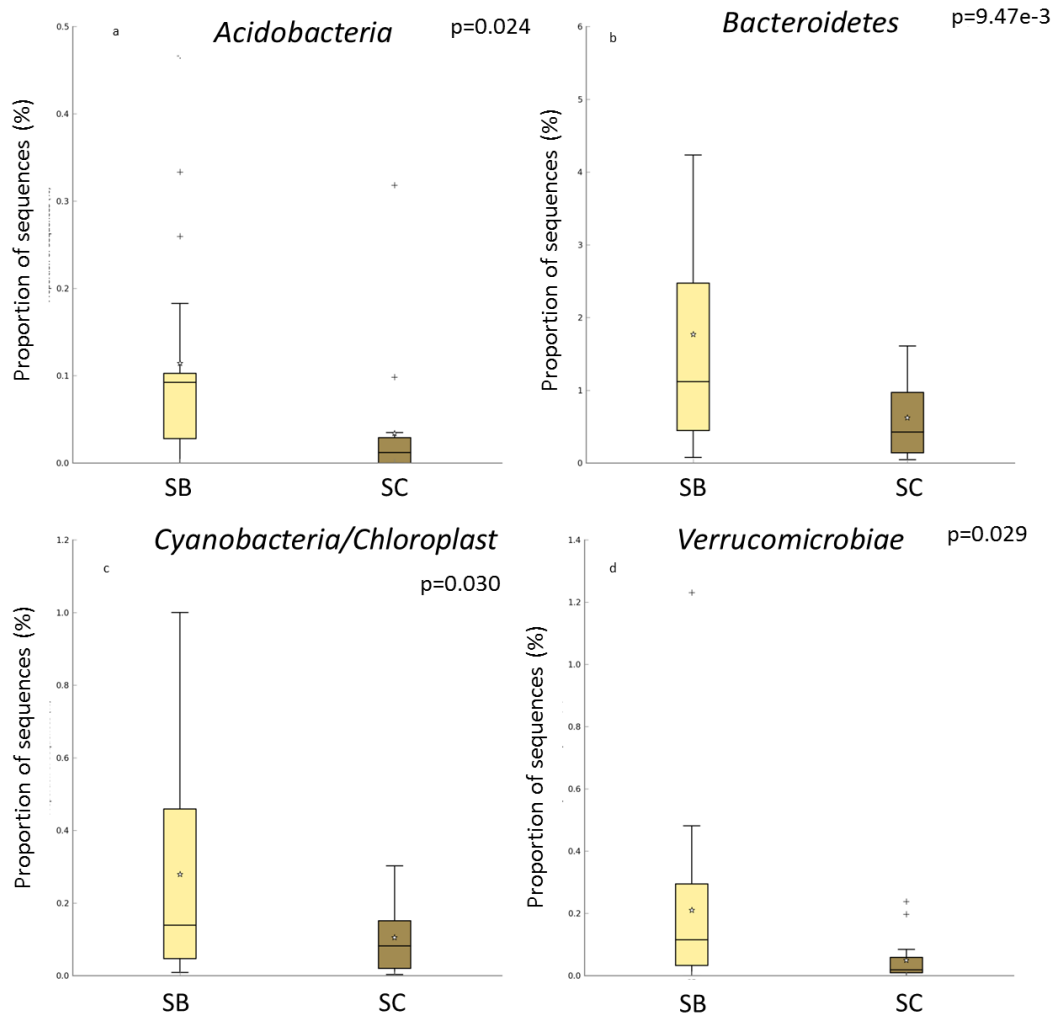


Figura 31. Diferencias significativas entre los sitios de muestreo La Boquita (SB) y Carrizales (SC) del phylum: a) *Acidobacteria*, b) *Bacteroidetes* c) *Cyanobacteria/Chloroplast* d) *Verrucomicrobia* ($p < 0.05$).

A nivel género algunos de los taxones que presentaron diferencias significativas se muestran en la siguiente figura, en donde en a) corresponde al género *Francisella* donde debido a su elevada abundancia en las muestras derivadas de La Boquita hacen que existan diferencias entre ambos sitios; en el caso de b) que corresponde al género *Lactococcus* las diferencias se deben a que este género sólo se presenta en las muestras derivadas de Carrizales resultando ausente en las de La Boquita; por último en c) que corresponde al género *Ulvibacter* que al contrario del anteriormente mencionado, este sólo se presenta en las muestras de La Boquita y no en las de Carrizales lo que hace que existan diferencias significativas de este género en entre sitios.

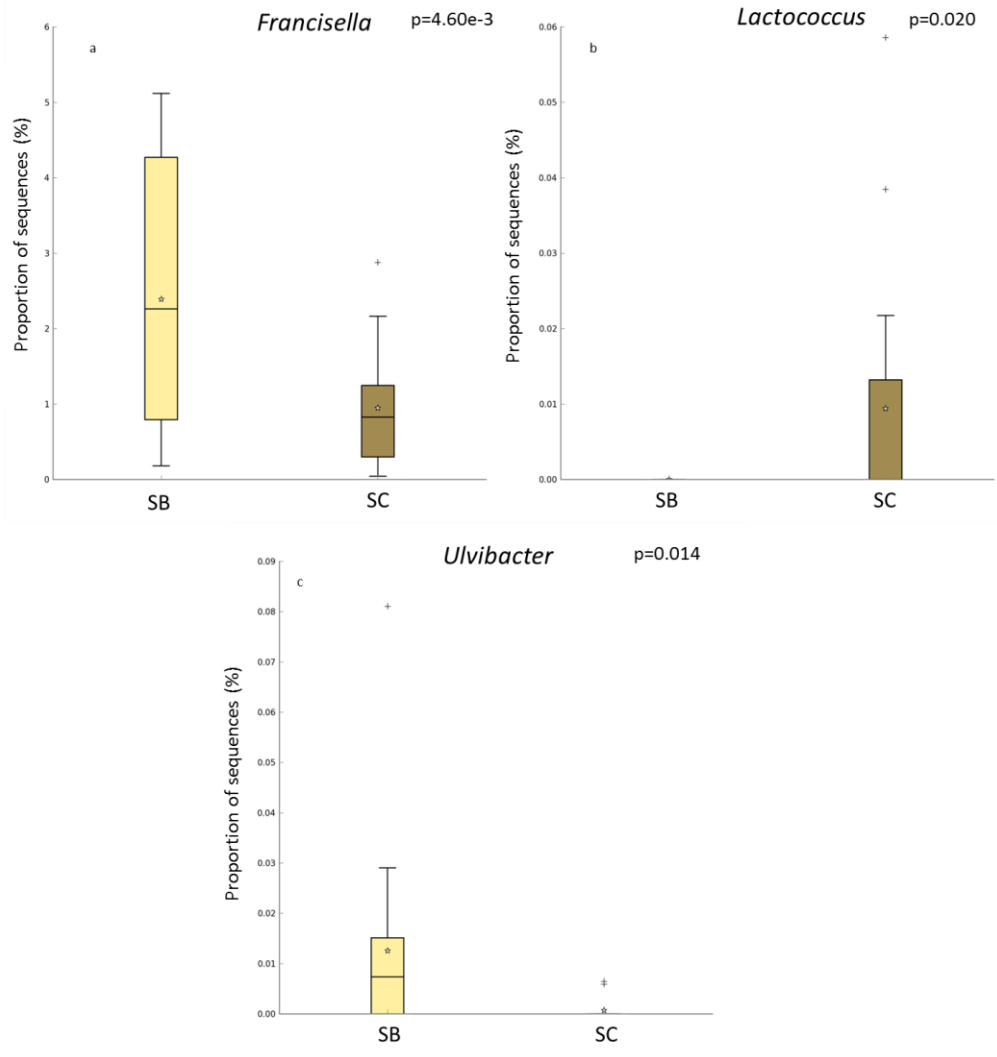


Figura 32. Diferencias significativas entre los sitios de muestreo La Boquita (SB) y Carrizales (SC) del género: a) *Francisella* b) *Lactococcus* c) *Ulvibacter* ($p < 0.05$).

Por último en la tercera variable independiente que es entre el grado de salud (D2, D4 y D6) fue la que de manera general present menor número de taxones con diferencias significativas; sin embargo, esta variable desde nivel dominio presenta diferencias, es decir se presentan diferencias significativas en el dominio Bacteria y en el grupo UI tal como se observa en la figura 33, cuyas diferencias significativas se deben a la elevada abundancia de secuencias UI en el grado de salud D6, lo que podrían ser atribuidas a microorganismos benéficos para el coral y el hecho de no haber sido identificadas atribuirse a la base de datos del programa; el phylum que presentó diferencias significativas fue *Proteobacteria* y UI; la clase estadísticamente diferente fue γ -

proteobacterias y el UI; el orden *Enterobacteriales* y el UI presentaron diferencias, de igual manera la familia *Enterobacteriaceae* y el grupo UI y finalmente los géneros con diferencias significativas fueron *Delftia*, *Prevotella*, *Serratia* y el grupo UI.

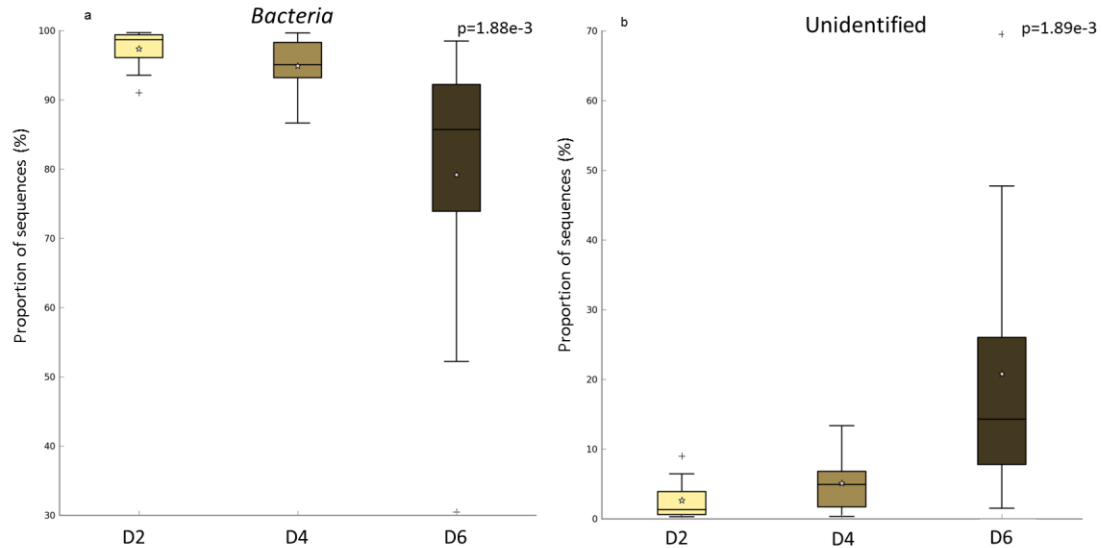


Figura 33. Diferencias significativas entre los grados de salud coral enfermo (D2), intermedio (D4) y sano (D6) de: a) dominio Bacteria b) grupo Unidentified ($p < 0.05$).

De los únicos tres géneros que en esta variable presentaron diferencias significativas el de mayor relevancia es el género *Serratia* y se dan principalmente entre los grados D2 y D6 (Fig 34a). En el género *Delftia* se presentan las diferencias más marcadas entre el grado D6 y D2, algo similar al género *Serratia*; sin embargo, este es de manera contraria pues la mayor abundancia se encuentra en el grado D6 lo que hace que existan dichas diferencias (Fig 34b). Por último el género *Prevotella*, el cual claramente sólo se observa en las muestras del grado de salud D2 lo que hace posible que existan diferencias significativas en este género (Fig 34c).

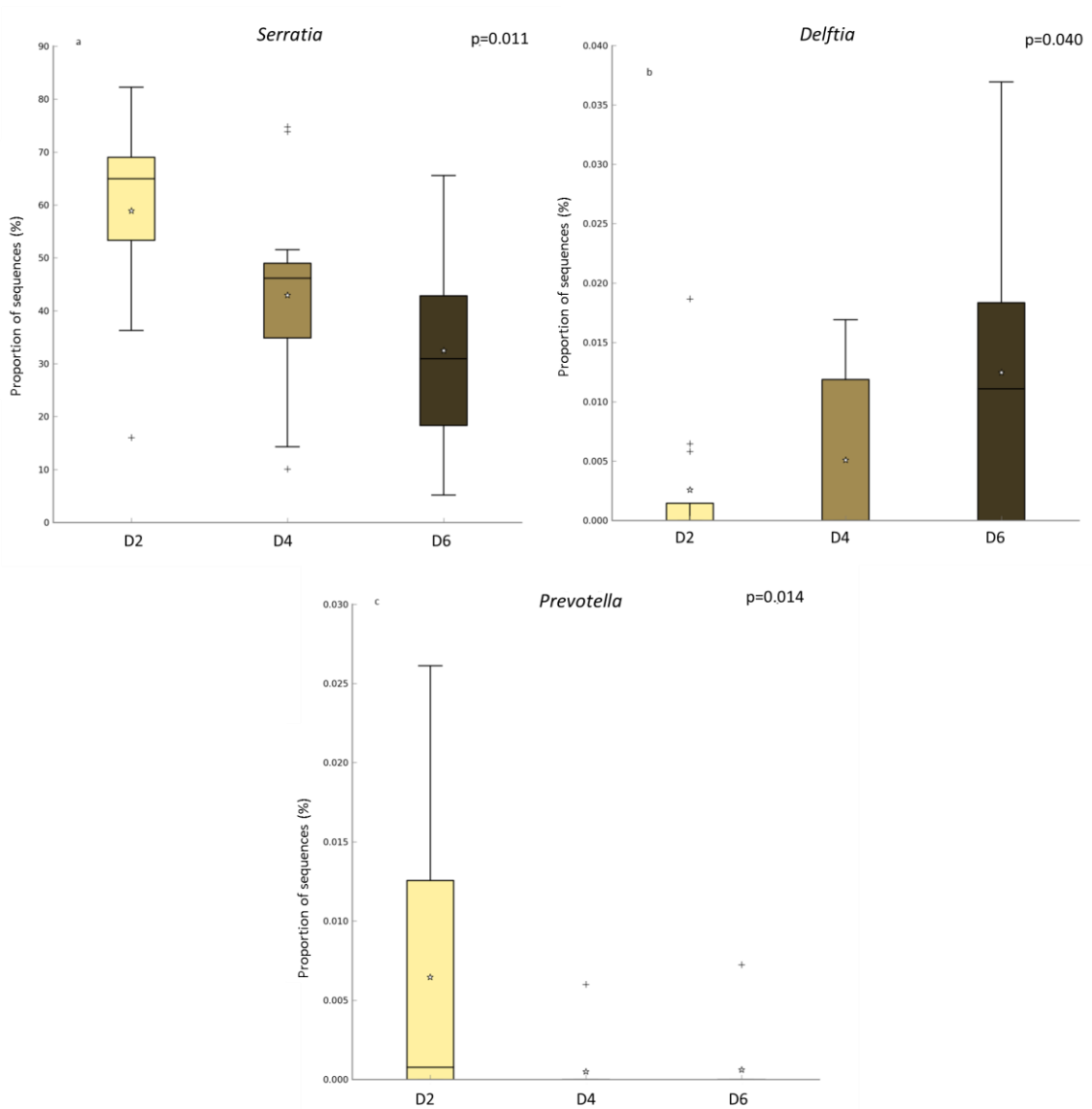


Figura 34. Diferencias significativas entre los grados de salud coral enfermo (D2), intermedio (D4) y sano (D6) a nivel género: a) *Serratia* b) *Delftia* c) *Prevotella* ($p < 0.05$).

Se observa claramente que el género *Serratia* presenta diferencias significativas en dos de las variables independientes y estas son entre el tipo de tejido donde resultó ser más abundante en las muestras de mucus que de pólipos y entre los grados de salud D2 y D6 cuya abundancia es mayor en el primer grado mencionado, haciendo posible la presencia de diferencias significativas dentro de esta variable.

En la siguiente tabla se hace un resumen de los taxones que presentaron diferencias significativas en cada una de las categorías taxonómicas para cada variable independiente; sin embargo, para el caso de la variable independiente entre sitios de muestreo debido al elevado número de taxones que presentaron diferencias significativas a partir del nivel clase, solo se pusieron los que presentaban mayor abundancia. Los géneros comunes entre el tipo de tejido (mucus y pólipos) y los sitios de muestreo (La Boquita y Carrizales) fue *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Verrucomicrobium*; entre el tipo de tejido y los grados de salud, los géneros comunes fueron: *Delftia*, *Serratia* y el grupo Unidentified. Por último, entre los sitios de muestreo y el grado de salud no se presentan géneros comunes.

Tabla 15. Taxones que presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en cada una de las categorías taxonómicas para cada variable independiente.

	Dominio (N=3)	Phylum (N=29)	Clase (N=60)	Orden (N=120)	Familia (N=246)	Género (N=601)
Mucus y pólipos		<i>Choroflexi</i> <i>Proteobacteria</i> <i>Unidentified</i>	γ - <i>proteobacterias</i> <i>Unidentified</i>	<i>Enterobacteriales</i> <i>Lactobacillales</i> <i>Unidentified</i>	<i>Bacterovoracaceae</i> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Kofleriaceae</i> <i>Microbacteriaceae</i> <i>Planococaceae</i> <i>Streptococcaceae</i> <i>Unidentified</i>	<i>Delftia</i> <i>Acidoborax</i> <i>Acinetobacter</i> <i>Algibacter</i> <i>Coxiella</i> <i>Erythrobacter</i> <i>Hellea</i> <i>Kofleria</i> <i>Lactococcus</i> <i>Mesorhizobium</i> <i>Serratia</i> <i>Sporosarcina</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Streptococcus</i> <i>Verrucomicrobium</i> <i>Unidentified</i>
Sitios (La Boquita y Carrizales)		<i>Acidobacteria</i> <i>Bacteroidetes</i> <i>Cyanobacteria/</i> <i>Chloroplast</i> <i>Verrucomicrobia</i> <i>TM7</i> <i>Planctomycetes</i> <i>Nitrospira</i> <i>Lentisphaera</i>	<i>Verrucomicrobiae</i> α - <i>proteobacterias</i> <i>Flavobacterias</i> δ - <i>proteobacteria</i> (Entre otros)	<i>Flavobacteriales</i> <i>Cromatiales</i> <i>Desulfubacterales</i> <i>Thiotrichales</i> <i>Rhodobacterales</i> <i>Rhizobiales</i> (Entre otros)	<i>Francisellaceae</i> <i>Streptococcaceae</i> <i>Flavobacteriaceae</i> <i>Peptococcaceae</i> 1	<i>Francisella</i> <i>Desulfobacter</i> <i>Lactococcus</i> <i>Ulvibacter</i> <i>Verrucomicrobium</i> <i>Streptococcus</i>

Grados de salud (D2, D4 y D6)

<i>Bacteria Unidentified</i>	<i>Proteobacteria Unidentified</i>	<i>γ-proteobacterias Unidentified</i>	<i>Enterobacteriales Unidentified</i>	<i>Enterobacteriaceae Unidentified</i>	<i>Delftia</i> <i>Prevotella</i> <i>Serratia</i> <i>Unidentified</i>
------------------------------	------------------------------------	---------------------------------------	---------------------------------------	--	---

6.6 Índices Ecológicos

De manera general para el cálculo de los índices ecológicos se emplearon los 600 géneros identificados y el grupo UI derivados de RDP Classifier. De acuerdo al tipo de tejido de ambos sitios, en la tabla 16 se muestra el cálculo de los índices para las muestras de mucus de La Boquita y Bahía Carrizales de acuerdo al grado de salud; por lo que **la menor diversidad se presenta en el grado de salud D2 (coral enfermo) de La Boquita** que posee el mayor índice de Simpson; sin embargo en Carrizales este índice es muy parecido entre grados de salud en cambio, **la mayor diversidad se presenta en el grado de salud D4 que es un grado intermedio en las muestras de La Boquita** y por lo tanto un menor índice de Simpson representando una mayor equitatividad (Evenness).

Tabla 16. Índices ecológicos de las muestras de mucus de La Boquita y Bahía Carrizales de acuerdo al grado de salud D2 (coral enfermo), D4 (intermedio) y D6 (coral sano) a nivel género.

Índice	Mucus					
	La Boquita			Bahía Carrizales		
	D2	D4	D6	D2	D4	D6
S	105.667	103.667	120.333	92.667	69	75
N	13099.333	11925.333	8892.667	13327.667	11419.667	10743.333
Shannon	0.398	0.540	0.494	0.403	0.422	0.440
Simpson	0.565	0.381	0.478	0.547	0.543	0.512
Riqueza	25.246	25.629	29.887	21.872	16.796	18.261
Evenness J'	0.206	0.272	0.248	0.221	0.242	0.241
Diversidad	0.435	0.619	0.522	0.453	0.457	0.488

S es definido como el número de OTUs

N es definido como el número de secuencias

De igual manera que la tabla anterior, en la tabla 17 que corresponde a las muestras de pólipos, la mayor diversidad se presenta en el grado D4 y la menor en D2 ambas derivadas de La Boquita, por lo tanto el mayor Evenness también se encuentra en la muestra D4 y la menor en D2; esto a pesar, de que las

muestras de Carrizales tienen valores promedios y se esperaba que a pesar de que Carrizales es un sitio que no se encuentra impactado.

Tabla 17. Índices ecológicos de las muestras de pólipos de La Boquita y Bahía Carrizales de acuerdo al grado de salud D2 (coral afectado), D4 (intermedio) y D6 (coral sano) a nivel género.

Índice	Pólipos					
	La Boquita			Bahía Carrizales		
	D2	D4	D6	D2	D4	D6
S	157.333	138.833	148.083	148.083	145.000	147.056
N	29894.000	21610.833	25752.417	25752.417	24371.889	25292.241
Shannon	0.510	0.525	0.517	0.517	0.520	0.518
Simpson	0.444	0.505	0.475	0.475	0.485	0.478
Riqueza	36.103	32.995	34.549	34.549	34.031	34.377
Evenness J'	0.234	0.253	0.243	0.243	0.247	0.244
Diversidad	0.556	0.588	0.572	0.572	0.577	0.573

S es definido como el número de OTUs

N es definido como el número de secuencias

Ahora analizando los índices ecológicos para cada sitio de muestreo en ambos tipos de tejido, en la tabla 18 se presentan las muestras pertenecientes al arrecife La Boquita y se observa que la **menor diversidad se presente en la muestra de mucus cuyo grado de salud es D2**, y la **mayor diversidad se presenta en la muestra de mucus con grado de salud D4**; por lo tanto el mayor valor del índice de Simpson se encuentra en la muestra D2 y el menor en la muestra de mucus del grado de salud D2. Como se puede observar tanto el mayor como el menor índice de diversidad se presenta en las muestras de mucus.

Tabla 18. Índices ecológicos de las muestras de mucus y pólipos del coral *P. capitata* derivado del arrecife La Boquita en los tres grados de salud coralina (D2, D4 y D6) a nivel género.

Índice	La Boquita					
	Mucus			Pólipos		
	D2	D4	D6	D2	D4	D6
S	105.667	103.667	120.333	157.333	138.833	148.083
N	13099.333	11925.333	8892.667	29894	21610.833	25752.417
Shannon	0.398	0.540	0.494	0.510	0.525	0.517

Simpson	0.565	0.381	0.478	0.444	0.505	0.475
Riqueza	25.246	25.629	29.887	36.103	32.995	34.549
Evenness J'	0.206	0.272	0.248	0.234	0.253	0.243
Diversidad	0.435	0.619	0.522	0.556	0.588	0.572

S es definido como el número de OTUs

N es definido como el número de secuencias

Por otro lado, en la tabla 19 se presentan los resultados de los cálculos de los índices para las muestras de **Carrizales** de ambos tipos de tejido; en ella se observa que la **menor diversidad se presente las muestras de mucus** con grado grado de salud D2, en cambio la **mayor diversidad se presentó en las muestras de pólipos** cuyo grado de salud es D4, así mismo de manera general se observa que los mejores valores de diversidad se presentan en las muestras de pólipos.

Tabla 19. Índices ecológicos de las muestras de mucus y pólipos del coral *P. capitata* derivado del arrecife Bahía Carrizales en los tres grados de salud coralina (D2, D4 y D6) a nivel género.

Índice	Bahía Carrizales					
	Mucus			Pólipos		
	D2	D4	D6	D2	D4	D6
S	92.667	69.000	75.000	148.083	145	147.056
N	13327.667	11419.667	10743.333	25752.417	24371.889	25292.241
Shannon	0.403	0.422	0.440	0.517	0.520	0.518
Simpson	0.547	0.543	0.512	0.475	0.485	0.478
Riqueza	21.872	16.796	18.261	34.549	34.031	34.377
Evenness J'	0.221	0.242	0.241	0.243	0.247	0.244
Diversidad	0.453	0.457	0.488	0.572	0.577	0.573

S es definido como el número de OTUs

N es definido como el número de secuencias

De manera más particular, también fueron calculados los índices ecológicos para cada una de las réplicas tanto de mucus como de pólipos de ambos arrecifes. Por consiguiente, en la tabla 20 correspondiente a los resultados de los índices ecológicos de las muestras de mucus se observa que la menor diversidad se encontró en la réplica 2 del grado de salud D2 perteneciente a La Boquita cuyo valor fue de 0.309, por lo tanto, hay una menor equitatividad

(0.184) y por ende el índice de Simpson (0.691) resulta ser mayor indicando la dominancia por parte de algunos de los géneros presentes. Por el contrario, la mayor diversidad (0.633) se presentó en la muestra 2 del grado de salud D4 también de La Boquita, por lo tanto hay una mayor equitatividad (0.284) y menor dominancia (0.691). A pesar de que el parche coralino Bahía Carrizales se identifica como un arrecife sano la diversidad bacteriana que presentan sus muestras no es tan significativo como las que presenta el parche de La Boquita.

De manera similar en la tabla 21 se muestran los resultados de los índices de las muestras de pólipos, en donde la mayor diversidad (0.65) y mayor equitatividad (0.279) se presenta en la muestra 2 del grado de salud D4 de Bahía Carrizales, por lo tanto la dominancia es baja (0.35); sin embargo, el mayor índice de Simpson o dominancia (0.737) se encuentra en la muestra 2 del grado de salud D6 de La Boquita, por lo tanto hay una menor diversidad (0.263) y una menor equitatividad (0.141).

Tabla 20. Índices ecológicos de todas las muestras de mucus de La Boquita y Bahía Carrizales de acuerdo al grado de salud D2 (coral afectado), D4 (intermedio) y D6 (coral sano).

Índice	Mucus																	
	La Boquita									Bahía Carrizales								
	D2			D4			D6			D2			D4			D6		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
S	195	30	92	59	157	95	69	207	85	20	156	102	26	42	139	71	29	125
N	15317	11719	12262	8802	7479	19495	5413	13797	7468	7285	17212	15486	15347	5914	12998	11080	9204	11946
Shannon	0.500	0.271	0.423	0.486	0.624	0.509	0.510	0.445	0.527	0.301	0.477	0.430	0.329	0.388	0.549	0.468	0.311	0.540
Simpson	0.475	0.691	0.529	0.399	0.367	0.376	0.401	0.64	0.394	0.641	0.508	0.491	0.585	0.584	0.459	0.477	0.603	0.455
Riqueza	46.354	7.127	22.257	14.704	40.270	21.912	18.214	49.761	21.687	4.919	36.593	24.105	5.972	10.870	33.545	17.307	7.064	30.413
Evenness J'	0.219	0.184	0.215	0.274	0.284	0.257	0.278	0.192	0.273	0.232	0.217	0.214	0.232	0.239	0.256	0.253	0.213	0.258
Diversidad	0.525	0.309	0.471	0.601	0.633	0.624	0.599	0.36	0.606	0.359	0.492	0.509	0.415	0.416	0.541	0.523	0.397	0.545

Tabla 21. Índices ecológicos de todas las muestras de pólipos de La Boquita y Bahía Carrizales de acuerdo al grado de salud D2 (coral afectado), D4 (intermedio) y D6 (coral sano).

Índice	Pólipos																	
	La Boquita									Bahía Carrizales								
	D2			D4			D6			D2			D4			D6		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
S	158	114	200	60	354	86	99	317	83	53	36	53	70	67	145	77	124	65
N	19117	5355	65210	13502	49330	15200	19202	45070	27784	16418	16814	6603	7987	33286	16284	9395	17006	33872
Shannon	0.469	0.542	0.518	0.474	0.724	0.47	0.353	0.353	0.449	0.411	0.422	0.464	0.531	0.51	0.555	0.527	0.459	0.384
Simpson	0.436	0.496	0.401	0.393	0.406	0.414	0.638	0.737	0.432	0.493	0.446	0.426	0.386	0.35	0.405	0.393	0.491	0.501
Riqueza	36.670	30.305	41.335	14.284	75.217	20.326	22.879	67.900	18.453	12.336	8.283	13.613	17.682	14.594	34.190	19.130	29.074	14.129
Evenness J'	0.213	0.264	0.225	0.266	0.284	0.243	0.177	0.141	0.234	0.238	0.271	0.269	0.288	0.279	0.257	0.279	0.219	0.212
Diversidad	0.564	0.504	0.599	0.607	0.594	0.586	0.362	0.263	0.568	0.507	0.554	0.574	0.614	0.65	0.595	0.607	0.509	0.499

Considerando las tres variables que son el sitio de muestreo (La Boquita y Bahía Carrizales), el grado de salud (D2, D4 y D6) y el tipo de tejido (mucus y pólipos), en la tabla 22 se observa el valor de menor y mayor diversidad. Por lo tanto, la

menor diversidad se encuentra en las muestras de mucus pertenecientes a La Boquita en el grado de salud D2; en cambio, la mayor diversidad se encuentra en el grado de salud D4 de las muestras de mucus de La Boquita.

Tabla 22. Índices ecológicos de las muestras de acuerdo al sitio (La Boquita y Bahía Carrizales), al grado de salud D2 (coral afectado), D4 (intermedio) y D6 (coral sano) y al tipo de tejido (mucus y pólipos).

Índice	Mucus						Pólipos					
	La Boquita			Bahía Carrizales			La Boquita			Bahía Carrizales		
	D2	D4	D6	D2	D4	D6	D2	D4	D6	D2	D4	D6
S	105.667	103.667	120.333	92.667	69	75	157.333	138.833	148.083	148.083	145	147.056
N	13099.333	11925.333	8892.667	13327.667	11419.667	10743.333	29894	21610.833	25752.417	25752.417	24371.889	25292.241
Shannon	0.398	0.54	0.494	0.403	0.422	0.44	0.51	0.525	0.517	0.517	0.52	0.518
Simpson	0.565	0.381	0.478	0.547	0.543	0.512	0.444	0.505	0.475	0.475	0.485	0.478
Riqueza	25.246	25.629	29.887	21.872	16.796	18.261	36.103	32.995	34.549	34.549	34.031	34.377
Evenness J'	0.206	0.272	0.248	0.221	0.242	0.241	0.234	0.253	0.243	0.243	0.247	0.244
Diversidad	0.435	0.619	0.522	0.453	0.457	0.488	0.556	0.588	0.572	0.572	0.577	0.573

VII. DISCUSIONES

Los arrecifes coralinos son ecosistemas muy diversos que cumplen con una variedad de funciones ecológicas así como también son de importancia económica; sin embargo, su sobrevivencia y desarrollo dependen de factores naturales, antropogénicos y bióticos (Kuta y Richardson, 2002; Douglas, 2003; Liñán et al., 2006; Liñán et al., 2008). Entre los factores bióticos se encuentran los simbioses, los procariontes y los protistas; las bacterias juegan un papel importante pues su presencia puede ser benéfica o perjudicial para el hospedero (Knowlton y Rohwer, 2003; Rosenberg et al., 2007).

La caracterización de comunidades bacterianas presentes en los ecosistemas arrecifales ha empleado diferentes técnicas, en este estudio se usaron técnicas metagenómicas que estudian las comunidades microbianas a partir de la extracción de ADN total de una muestra ambiental, es decir, el ADN total tanto del hospedero en este caso el coral, el del holobionte (el *Symbiodinium*) y el de los microorganismos que se encuentran en la muestra. Si lo que se busca es caracterizar la comunidad bacteriana, entonces se amplifica por PCR el gen 16S partiendo de la extracción de ADN total directamente de la muestra, por lo que se requiere una excelente calidad y cantidad de ADN para obtener librerías de buena calidad y una buena secuenciación. Sin embargo, debido a que el tejido coralino se encuentra compuesto principalmente por agua, fue necesario estandarizar una técnica de extracción. En la presente investigación se utilizó el kit comercial (QIAmp DNA Minikit de Qiagen) que resultó en una mejor calidad de ADN, comparado con otras técnicas de extracción.

Estudios previos sugieren que para el análisis de comunidades microbianas a partir de la secuenciación masiva se utilice principalmente las regiones variables V2, V3, V5 y V6 del gen 16S de manera que amplificando fragmentos

cortos se puede llegar a obtener la información que se busca sin necesidad de amplificar el fragmento completo de 1500 pb de cada una de las especies que se tienen en la muestra lo que incrementaría costos. Whiteley et al. (2012) emplearon la misma plataforma de secuenciación masiva de este estudio el PGM Ion Torrent utilizando primers modificados para amplificar las regiones variables V3 (primers 341F y 518R) y V6 (primers A967F y 1046R) del gen 16S cuyas longitudes son de 140-180 pb y 100-130 pb respectivamente para conocer la comunidad microbiana de estanques anaérobicos cubiertos en ambos casos se logró obtener una buena calidad y profundidad de secuenciación. De la misma forma otros investigadores reportaron también el uso de la región variable V3 con buenos resultados (Balcázar et al., 2007; Rungrassamee et al., 2013). En corales, amplificación de un fragmento de aproximadamente 470 pb de las regiones variables V1-V3 empleando los primers 63F y 533R proporcionó una mejor resolución de las variaciones potenciales en la diversidad y estructura de la comunidad bacteriana asociada al coral, adicionalmente los primers usados también se encontraban modificados al incluir el adaptador y un barcode de 8pb, el resultado de la investigación reveló secuencias de alta calidad y se logró caracterizar la comunidad microbiana antes y después del desove (Ceh et al., 2012).

Sin embargo, en el presente estudio se utilizó solamente los primers para la región V3 propuestos por Huse et al. (2008), ya que al comparar la taxonomía asignada en las secuencias derivadas de las regiones V3 y V6 concluyen que ambas son completamente diferentes e incluso comparadas con otras, además que la región V3 resulta tener una mayor resolución, es decir que hay una mayor cantidad de secuencias identificadas; por ello fue que se decidió utilizar esta región así como también los primers propuestos por ellos que amplifican fragmentos de 100-200pb. Sin embargo se recomienda amplificar dos regiones ya que con ello se podría obtener una mayor profundidad y clasificación taxonómica bacteriana. En este estudio se amplificó la región V3 de las muestras del coral *Pocillopora capitata* con una longitud del fragmento de 158pb, dentro del rango recomendado por Huse et al. (2008) logrando curvas

de rarefacción con una profundidad adecuada. Sin embargo, no sólo se amplificaron regiones del 16S ARNr sino que también del 18S, que a pesar del proceso de limpieza los resultados mostraron secuencias “Unidentified” y “Unclassified” debiéndose quizás a dos variantes, la primera a las bases de datos que poseen los clasificadores taxonómicos de QIIME y RDP Classifier, y en segundo probablemente a que son especies sin caracterizar. Amplificar dos regiones lograría obtener una mejor resolución filogenética lo que indicaría un análisis más detallado del hábitat y sus funciones biológicas dentro del hospedero. Kim et al. (2011) amplificaron las regiones V1-V3 y V1-V4 en especial con este último par de regiones, se logró obtener un mejor análisis filogenético, debido a que el clasificador RDP tiene un mayor número de secuencias parciales que corresponden a esta región por lo tanto la base de datos es más completa.

En la actualidad la innovación en las plataformas de secuenciación de nueva generación ha hecho posible el estudio y entendimiento de las comunidades microbianas sin importar la procedencia de la muestra. El promedio de lectura fue de 17,379 seqs/muestra, valor muy bajo comparado con el obtenido por Jünemann et al., (2012), que obtuvieron un total de 4,892,600 secuencias y de 599,933 a 650,416 por muestra al amplificar la región V6. Otro estudio que emplea la plataforma de Ion Torrent PGM es el de Whiteley et al. (2012) donde a partir de la amplificación de la región V3 y V6 y empleando chips 314, generaron un total de un millón de secuencias (promedio de 350,000 secuencias), valor también mayor comparado con el de este trabajo; sin embargo, de acuerdo a las curvas de rarefacción en el análisis bioinformático de este trabajo, podemos darnos cuenta que el número de secuencias es suficiente para caracterizar la comunidad microbiana y evitar gastos innecesarios, aunque quizás también se pudiera mejorar para lograr obtener una mayor cantidad, pero esto no asegura que estas secuencias vayan a proporcionar mayor información. Ahora si comparamos el número de secuencias que se obtienen de acuerdo a la plataforma de secuenciación, el trabajo de Chen et al. (2011) obtuvieron 205,082 secuencias derivadas de la

plataforma de secuenciación masiva 454 de Roche a partir de muestras del coral *Isopora palifera*, dicho valor es tres veces menor que el obtenido en este trabajo y además solamente describieron a nivel taxonómico de familia, quizá debido al incremento que presentaba el grupo de secuencias “Unclassified”, no obstante, es probable que con este número de secuencias ellos lograran su objetivo. El problema que presenta el 454 ya que durante el proceso de secuenciación al incorporar un nucleótido complementario a la cadena molde y liberarse el grupo fosfato se emite una señal de luz florescente que es grabado por una cámara, por ende si la señal es intensa existirá una saturación de luz y pudiera ocasionar un error en la lectura. Por último, empleando la misma plataforma anterior para conocer la composición de la comunidad bacteriana del rumen bovino la media de secuencias obtenidas por muestra fue $37,004.6 \pm 6,612.4$ (N=15) (Wu et al., 2012), que igualmente al anterior el valor resulta ser menor. Comparativamente con respecto al número de secuencias obtenidas en los estudios anteriormente mencionados, las obtenidas en este trabajo fueron suficientes para lograr caracterizar la comunidad bacteriana del coral *P. capitata*, además la plataforma de secuenciación Ion Torrent PGM resultó ser buena para estudios de ecología microbiana en corales, ya que a diferencia del 454 de Roche, el PGM detecta los cambios de pH al liberarse el grupo hidroxilo por la incorporación de un nucleótido los cuales son detectados por medio de sensores evitando la saturación y por ende errores en las lecturas.

Una vez que se obtuvieron las secuencias, el análisis bioinformático se hizo con los programas QIIME y RDP Classifier, en donde este último logró identificar un mayor número de secuencias, por lo tanto se obtuvo un mayor número de géneros. Esto podría deberse a la base de datos que cada uno de los clasificadores posee; en el caso de QIIME su base de datos es Greengenes y SILVA 111 cuya cobertura incluye al dominio Arquea y Bacteria con un total de 1, 262,986 secuencias de las cuales 203,452 secuencias son agrupadas en OTU's en un 99% de similitud y 99,322 secuencias en 97%; por el contrario, RDP Classifier tiene un total de 2, 809,900 secuencias derivadas de NCBI, esto es lo que podría hacer que RDP Classifier fuera una mejor opción y en este

caso la información derivada de este programa fuera utilizada para el resto de los análisis. Sin embargo, Whiteley et al., (2012) quienes emplearon la misma plataforma de secuenciación masiva recomiendan usar QIIME para el análisis de comunidades microbianas que derivaban de un estanque anaeróbico cubierto y la razón es porque este programa presenta una variedad de comandos que dan como resultado un análisis más completo e incluso la visualización de los datos por medio de gráficas lo que hace más entendible su contenido. En este sentido Nakayama et al. (2013) recomiendan que se utilicen programas en conjunto, en este caso QIIME, Mothur y RDP para obtener una mejor composición bacteriana incluso a nivel de especie, a pesar de trabajar con secuencias derivadas de la plataforma de secuenciación 454. La elección de clasificadores taxonómicos depende de las necesidades de la investigación; en este trabajo se decidió utilizar dos, QIIME y RDP para lograr tener una mejor descripción de la asignación taxonómica de las secuencias obtenidas pensando que con ello se reduciría el número de secuencias Unclassified y Unidentified; sin embargo, aun así se lograron tener una proporción de secuencias representativa en estos grupos.

Analizando los resultados obtenidos en este estudio a partir de RDP Classifier, de los los 26 phyla bacterianos que se lograron identificar los más abundantes en todas las muestras de corales *P. capitata* (sanos como enfermos y de los dos tipos de tejidos) fueron *Proteobacteria* (66%), *Chlorobi* (3%), *Bacteroidetes* (2%), *Firmicutes* (1%), *Cyanobacteria/Chloroplast* (1%); sin embargo se encontraron diferencias en la abundancia entre los grados de salud. El phylum *Proteobacteria* fue el más abundante en todas las muestras principalmente en las muestras de mucus y en corales enfermos y el phylum ***Bacteroidetes* resultó ser más abundante en corales sanos** es decir aquellos que se encuentran en grados de salud D4 y D6. En corales sanos del coral *Porites astreoides* se lograron identificar algunos phyla similares a los presentados en este trabajo con diferentes abundancias los cuales fueron el *Proteobacteria* (68%), *Firmicutes* (10%), *Cyanobacteria* (7%) y *Actinobacteria* (6%) (Wegley et al., 2007). En contraste con el trabajo de Pereira de Castro et

al. (2010) donde caracterizaron las comunidades bacterianas asociadas al mucus de corales enfermos y sanos de *Mussismilia hispida*, encontraron que en corales sanos los phyla más representativos fueron *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Lentisphaerae* y *Nitrospira*; en cambio en corales enfermos los de mayor abundancia fueron del phylum *Bacteroidetes*. Igual que en este trabajo de manera particular el phylum *Bacteroidetes* ha sido asociado a corales afectados por la enfermedad de la banda negra (Jones et al., 2004; Sekar et al., 2006), así como también en corales que se encuentran bajo un estado de estrés (Thurber et al., 2009). Contrario al phylum anterior, el *Cyanobacteria/Chloroplast* se encuentra en corales sanos ya que su presencia se asocia al dinoflagelado simbiote ayudando en la fijación del nitrógeno en el coral (Williams et al., 1987; Lesser et al., 2004; Kvennefors and Roff 2009). Rohwer et al. (2001) a partir de la amplificación de la región V3 y secuenciación del 16S ARNr del coral *Montastraea franksi* encontró que un 30% de las bacterias asociadas a ese coral sano eran especies de *Cyanobacteria* y *Proteobacteria*. Bourne y Munn (2005) coinciden en la abundancia del phylum *Proteobacteria* en especial de la clase γ -*proteobacteria* en corales sanos de *Pocillopora damicornis* de la Gran Barrera Arrecifal en Australia. Sin embargo un estudio más reciente en corales *Mussismilia braziliensis* sanos encontraron phyla similares a los reportados en este estudio como *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria* y *Actinomycetes*. Por otro lado en los corales afectados por la plaga blanca se encontró una mayor abundancia de *Vibrionales*, un complejo de *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*, *Rickettsiales* y *Neisseriales* (García et al., 2003). Por lo anterior no existe una relación evidente entre el phylum bacteriano y la condición de salud de los corales analizados a la fecha, de manera general la comunidad bacteriana puede ser utilizada como indicador biológico siempre y cuando se maneje desde el punto de vista de la abundancia de géneros bacterianos; sin embargo, cabe recalcar que esto no indica si las poblaciones coralinas se encuentran o no bajo un estado de estrés. Comparando con estudios recientes, precisamente la evaluación de la capacidad de respuesta fisiológica del coral, es posible

reconocer que las comunidades de La Boquita y Carrizales tienen capacidades diferentes que pueden modificar su desarrollo, demostrando que los corales derivados de La Boquita presentan mejores patrones de respuesta de aclimatación a factores térmicos, de luz y condiciones de pH bajo, condición que se ha visto en parches coralinos afectados por factores antropogénicos; así como también sugieren que uno de los patrones de aclimatación se debe a que existe una mayor sincronía en la actividad de la enzima antioxidante en el tejido del coral lo que se tradujo en un menor daño celular durante el experimento (Soriano-Santiago et al., 2013). En este sentido quizá es posible que la presencia de algunos géneros bacterianos en La Boquita y la ausencia de estos en Carrizales se deba quizás a un mecanismo de adaptación y sobrevivencia del coral para enfrentar los factores que lo perjudican.

Analizando las clasificaciones a nivel género, de los más representativos de acuerdo a QIIME son ***Gluconacetobacter*, *Burkholderia* y *Francisella***; sin embargo, los identificados por RDP Classifier fueron ***Serratia*, *Burkholderia*, *Francisella*, *Chlorobium***; este es un dato singular pues el género *Gluconacetobacter* identificado por QIIME con RDP Classifier resulta ser identificado como *Serratia*, cuyo nivel de similitud fue alto, por lo que no se pone en duda esta asignación, planteando una desventaja para los análisis bioinformáticos que dependen del criterio del investigador para la selección de los programas. La presencia del género *Serratia*, en estos ecosistemas coralinos es de suma importancia ya que al formar parte de las bacterias coliformes o entéricas resulta ser una bacteria indicadora de contaminación antropogénica pues son habitantes comunes del tracto gastrointestinal del hombre y animales de sangre caliente; además se considera como indicador de degradación en los cuerpos de agua. Otras bacterias que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* se encuentran los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter* que conforman el grupo de los coliformes (Fernández et al., 2001). La presencia de este grupo de bacterias para el caso de La Boquita pudiera deberse a la desembocadura de la laguna Juluapan en la cual existen vertederos de la planta de tratamiento del club Santiago, así como

también, el parche de La Boquita se encuentra cercano a una playa recreativa de gran influencia turística; sin embargo, la presencia de enterobacterias en la comunidad coralina de Carrizalres es desconcertante y complicado conocer la fuente. No obstante, es importante identificar a nivel de especie las bacterias presentes, ya que algunas especies del género *Serratia* tienden a ocasionar enfermedades a los corales haciendo necesario buscar o conocer la fuente que origina la presencia de esta enterobacteria en los ecosistemas. Patterson et al. (2002), reportan que la especie *Serratia marcescens* es el agente causal de la enfermedad de los puntos blancos en el coral *Acropora palmata*. Mientras que Ben-Haim et al. (2002 y 2003) asocian el blanqueamiento y lisis de tejido en el coral *Pocillopora damicornis* a la presencia de *Vibrio coralliilyticus*. A pesar de haber encontrado el género *Serratia* abundante en los corales de los arrecifes de Manzanillo, Colima no se puede afirmar que puedan ocasionar este tipo de enfermedades pero si hace necesario la implementación de estudios enfocados a conocer a nivel especie el tipo de bacterias presentes y correlacionarlas con alguna de las enfermedades, así como la fuente de las bacterias.

De los otros dos géneros abundantes, *Burkholderia* posee especies que pueden encontrarse en una variedad de nichos ecológicos y ha sido explotada para su uso como biocontrol, bioremedación, así como también para diversos propósitos en el crecimiento de plantas; sin embargo, también hay especies de este género que pueden afectar al humano, por ejemplo *B. malley* y *B. pseudomallei* patógenas para humanos y animales (Coenye y Vandamme, 2003). Kikuchi et al. (2011) consideran a este género como un organismo simbiote intestinal de chinches de las superfamilias *Lygaeoidea* y *Coreoidea* y el hospedero le proporciona mecanismos que favorezcan su crecimiento. Bayer et al. (2013) asocian este género a hongos presentes en el coral *Stylophora pistillata*. A pesar de la presencia de *Burkholderia* en este estudio no podemos saber si existen cepas de esta bacteria que resulten ser patógenas para el humano o si su presencia se deba a un hongo. Si consideramos como un microorganismo simbiote, entonces habría que investigar que tipo de asociación presenta con el coral. Por último, de los tres géneros presentes más

abundantes, la presencia del género *Francisella* es de suma importancia ya que se han encontrado especies patógenas para humanos y para especies acuáticas de importancia comercial entre ellos la tilapia (*Oreochromis* spp), mejillón azul (*Mytilus edulis*), cangrejo (*Cancer pagurus*), entre otros (Ellis et al., 2002; Ottem et al., 2006; Arkush et al., 2011; Weyle et al., 2013). Algunas especies de *Francisella* también son patógenas para organismos de agua dulce como la tilapia (Mauel et al. 2007) cultivada en algunas regiones de Colima. Esto nos dice que el complejo de bacterias encontradas presentan un foco de interés pues se requieren estudios más específicos para conocer la especie que se presenta de los géneros encontrados para conocer si estos son patógenos tanto al hospedero es decir al coral como para la salud humana, pues estos ecosistemas son sitios con importancia turística.

De acuerdo a la hipótesis propuesta, esta no es rechazada pues se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) tanto entre los grados de salud (umbrales de coloración) como entre los sitios de muestreo (La Boquita y Bahía Carrizales). Estas diferencias significativas entre las clasificaciones taxonómicas de acuerdo a los grados de salud (D2, D4, D6) se debieron principalmente a elevada abundancia del género *Serratia* en el grado de salud D2 y el grupo de secuencias asignadas como Unidentified. De igual manera, entre los sitios de muestreo La Boquita y Bahía Carrizales al poseer el mayor número de géneros con diferencias significativas las cuales se deben a la presencia y/o ausencia y la abundancia de géneros. *Francisella* fue más abundante en muestras de La Boquita comparado con Carrizales, lo que implica que quizás este género de bacterias posea especies patógenas tanto para el humano como para el hospedero y su presencia se relaciona con la condición de deterioro bajo la que se encuentra el arrecife La Boquita. *Lactococcus*, presente en muestras de Carrizales y ausente en La Boquita, la característica particular de este género es que son bacterias del ácido láctico y difiere de otras por su tolerancia al pH, salinidad y temperatura de crecimiento, además incluye especies que impactan negativamente en la salud de algunos organismos tal y como ocurre en *Macrobrachium rosenbergii* por *Lactococcus*

garvieae (Cheng et al., 2002). *Ulvibacter* presente en La Boquita y ausente en Carrizales, esto quizá se debe a la elevada abundancia de algas género *Ulva* en La Boquita. De manera general, entre los umbrales de coloración, tres géneros y el grupo Unidentified fueron estadísticamente diferentes. En cambio entre los sitios de muestreo, 75 géneros presentaron diferencias significativas. Por lo tanto existe diferencias entre la diversidad de la comunidad microbiana ya que se comportó diferente entre los umbrales de coloración y entre ambos arrecifes.

Se reconoce que los arrecifes coralinos son los ecosistemas que presentan una elevada biodiversidad incluidos los microorganismos y presenta cambios debido a las condiciones naturales y/o antropogénicas (Bourne et al., 2009). La diversidad microbiológica es por tanto la variabilidad entre los organismos vivientes de todas las fuentes, así como los complejos ecológicos de los que forman parte; de especies tanto procariontes como protistas y la estructura que conforma esta comunidad presente en un hospedero. En cuanto a diversidad microbiana se esperaría que un arrecife coralino cuyas condiciones fisiológicas sean buenas presentara mayor diversidad de especies que un arrecife que se encuentra afectado; sin embargo, en este trabajo la **mayor diversidad** en las muestras de mucus se encontró en un grado de salud intermedia (**D4**) de un arrecife coralino afectado (La Boquita) y en pólipos en el grado de salud intermedio (D4) de Bahía Carrizales (sitio control). El mucus al estar en contacto constante con el agua se puede colonizar por microorganismos propios del coral así como del agua, de esta forma la diversidad puede ser mayor que en las muestras de pólipos. Además la mayor diversidad pudiera atribuirse a la función del mucus como mecanismo de defensa ya sea incrementando la carga bacteriana benéficas para contrarrestar los daños en su salud ocasionados por las condiciones que lo afectan, o bien capturando bacterias patógenas y evitar que estas se desplacen a otras estructuras del coral como son la cavidad gastrodérmica o el esqueleto de carbonato de calcio (CaCO_3) que pudieran llevar a la muerte del coral.

Por otro lado, la **menor diversidad** para las muestras de mucus se encontró en corales que presentaban un grado de salud D2 (coral enfermo) y en pólipos en coral sano (D6) ambos de La Boquita, por lo que un entorno afectado podría influir en las condiciones de salud y por lo tanto en la diversidad de especies. La menor diversidad bacteriana encontrada en corales enfermos es explicable como lo reporta Kuta y Richardson (2002) quienes reportan menor diversidad (índice de Shannon-Wiever 1.6) de bacterias en corales que presentaban la enfermedad de la banda negra, es decir un sitio bajo condiciones de afectación, que en corales de arrecifes sanos (índice de Shannon-Wiever 2.0).

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, conocer la comunidad microbiana de los ecosistemas arrecifales es de suma importancia para correlacionar los resultados con el grado de salud coralina desde otro nivel, pues a pesar de tener organismos sanos y un sitio control que se suponía albergaba colonias coralinas saludables, observamos la presencia de ciertos géneros de bacterias de importancia clínica. Se recomienda realizar estudios que impliquen localizar las fuentes de estas bacterias a nivel de especie. Este trabajo al ser uno de los primeros de su tipo presentó dificultades desde la preservación del tejido hasta el análisis bioinformático, pues cada uno de los pasos depende del manejo, tipo de tejido y criterio del investigador para resolver cada uno de los inconvenientes; sin embargo, a pesar de ello se logró estandarizar la técnica de extracción de ADN total de este tipo de coral, se logró amplificar la región V3 del 16S ARNr de muestras de corales y, se obtuvo una buena profundidad en la secuenciación. El análisis bioinformático, permitió procesar los datos hasta obtener los índices ecológicos propuestos. Por último la importancia de este trabajo a nivel nacional este estudio es ser uno de los primeros en su clase, caracterizar de la comunidad microbiana del coral *P. capitata* entre un sitio impactado y uno se supone control, entre los grados de salud de acuerdo a un esquema de coloración in situ (Coral Health Chart) y que además incluya los tipos de tejido empleando la secuenciación masiva del gen 16S ARNr, es por tanto, puede ser la base de estudios futuros.

VIII. CONCLUSIONES

- Se identificaron un total de 28 phyla, 59 clases, 119 ordenes, 245 familias, 600 géneros y se lograron reconocer 24 especies bacterianas en el coral *Pocillopora capitata* de las comunidades arrecifales de las costas de Colima.
- Los géneros más abundantes fueron *Serratia*, *Burkholderia*, *Francisella* y *Chlorobium*, tanto en muestras de mucus como de pólipos de La Boquita y Bahía Carrizales en los tres grados de salud coralina.
- En las muestras de mucus de corales enfermos tanto de La Boquita como de Bahía Carrizales el género estadísticamente más abundante fue *Serratia*
- En corales sanos de ambas localidades se detectó un incremento significativo de especies no identificadas, tanto en mucus como en pólipos, sugiriendo que al menos algunas de estas especies forman parte de la microflora benéfica para el coral.
- Entre los sitios de muestreo (La Boquita y Carrizales) se encontró el mayor número de grupos taxonómicos con diferencias significativas debido a la presencia y/o ausencia de algunos géneros bacterianos.
- La mayor diversidad se encontró en el grado de salud intermedio: mucus de La Boquita (zona afectada) y pólipos de Bahía Carrizales (sitio control).
- La menor diversidad se encontró La Boquita: mucus del coral enfermo y pólipos de coral sano.
- Debido a los resultados obtenidos, la hipótesis no es rechazada ya que se lograron obtener diferencias significativas entre los grados de salud, así como también entre los sitios y el tipo de tejido, que son mayormente representadas por el género *Serratia*.

IX. RECOMENDACIONES

- Se recomienda usar ambos tipos de tejido para conocer la diversidad de bacterias que se encuentra en cada uno así como el rol que representan en los mismos.
- Se recomienda usar al menos dos clasificadores taxonómicos para lograr una mejor asignación taxonómica en el análisis bioinformático.
- Es necesario alimentar las bases de datos con el mayor número de géneros y especies posibles para reducir el número de especies no identificadas.
- Realizar estudios que incluyan el cultivo de especies en medios bacteriológicos para identificar bacterias viables que pudieran ser benéficas o potencialmente patógenas y a su vez comparar con los resultados obtenidos por medio de la metagenómica.
- Utilizar dos regiones variables del gen 16S ARNr preferentemente V3 y V6 o amplificar otros genes para obtener una mejor caracterización de la comunidad microbiana a nivel especie e identificar bacterias que pudieran afectar las condiciones fisiológicas del coral e incluso al humano, pues estos arrecifes son de importancia turística para la zona.

X. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Alcolado, P., Claro-Madruga, R., and Estrada, R. (2000). Status and prospective of coral reef management in Cuba. Submitted to the 9th ICRS, Bali 2000.
- Apprill, A., Marlow, H. Q., Martindale, M. Q., and Rappé, M. S. (2009). The onset of microbial associations in the coral *Pocillopora meandrina*. The ISME Journal 3, 685-699; doi:10.1038/ismej.2009.3
- Arkus, K. D., Bartholomew, J. L., Woo, P. T. K., Bruno, D. W. (2011). Piscirickettsia, Francisella and Epitheliocystis. Fish diseases and disorders. Volumen 3: viral, bacterial and fungal infections,(Ed. 2), 302-307.
- Balcázar, J. L., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Vendrell, D., Gironés, O., and Muzquiz, J.L. (2007). Sequencing of variable regions of the 16S rRNA gene for identification of lactic acid bacteria isolated from the intestinal microbiota of healthy salmonids. ELSEVIER. Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases 30 111–118
- Bayer, T., Neave, M. J., Alsheikh-Hussain, A., Aranda, M, Yum, L. K., Mincer, T., Hughen, K., Apprill, A., Voolstra, C. R., (2013). Appl. Environ. Microbiol. doi:10.1128/AEM.00695-13.
- Ben-Haim, Y. (2003). *Vibrio coralliilyticus* sp. nov., a temperature-dependent pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53(1), 309-315. doi:10.1099/ijs.0.02402-0
- Ben-Haim, Y., Zicherman-keren, M., and Rosenberg, E. (2003). Temperature-Regulated Bleaching and Lysis of the Coral *Pocillopora damicornis* by the Novel Pathogen *Vibrio coralliilyticus*. Society, 69(7), 4236-4242. doi:10.1128/AEM.69.7.4236
- Bolivar-Zapata, F., (2004). Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna 1ª edición. ISBN: 970-640-235-7.
- Bou-Abdullah F., Chasteen N. D., and Lesser, M.P. (2006). Quenching of superoxide radicals by green fluorescent protein. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006, vol. 1760, no11, pp. 1690-1695

- Bourne, D. G., Garren, M., Work, T. M., Rosenberg, E., Smith, G. W., Harvell, C. D., (2009). Microbial disease and the coral holobiont. *Trend in Microbiology*, vol. 17 No. 12. Review doi;10.1016/j.tim.2004.09.004,
- Bourne, D. G., and Munn, C. B. (2005). Diversity of bacteria associated with the coral *Pocillopora damicornis* from the Great Barrier Reef. *Environmental Microbiology* 7(8), 1162-1174.
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Gonzalez, A., 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., Knight, R., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335–336.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S.M., Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., Gormley, N., Gilbert, J.A., Smith, G., Knight, R., 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J.* <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2012.8> (e-pub ahead of print 8th March). Cook, K.L., Rothrock, M.J., Lovanh,
- Ceh, J., Raina, J. B., Soo, R. M., Van Keulen, M., Bourne, D. G. (2012) Coral-Bacterial Communities before and after a Coral Mass Spawning Event on Ningaloo. Reef. *PLoS ONE* 7(5): e36920. doi:10.1371/journal.pone.0036920.
- Cervino, J. M., Hayes, R. L., Polson, S. W., Polson, S. C., Goreau, T. J., Martinez, R. J., and Smith, G. W. (2004). Relationship of *Vibrio* Species Infection and Elevated Temperatures to Yellow Blotch / Band Disease in Caribbean Corals. *Society*, 70(11), 6855-6864. doi:10.1128/AEM.70.11.6855
- Chen, C. P., Tseng, C. H., A Chen, C., and Tang, S. L. (2011). The dynamics of microbial partnerships in the coral *Isopora palifera*. *The ISME Journal* (2011) 5, 728–740.
- Cheng, W., Liu, C. H., Chen, J. C. (2002). Effect of nitrite on interaction between the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its pathogen *Lactococcus garvieae*. *Dis Aquat Org* Vol. 50:189-197

- Coenye, T. and Vandamme, P., (2003). Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environmental Microbiology* 5(9), 719-729.
- Douglas A.E. (2003). Coral bleaching- how and why? *Mar. Pollut. Bull.* 46 (2003). 385-392.
- Ducklow, W., and Mitchell, R., 1979. Composition of Mucus Released by Coral Reef Coelenterates. *Limnol. Oceanogr.*, 24(4), 706-714.
- Ellis, J., Oyston, P. C. F., Green, M., Titball, R. W. (2002). Tularemia. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002, 15(4):631. DOI:10.1128/CMR.15.4.631-646.2002.
- Fabricius E. K., 2006. Effects of irradiance, flow, and colony pigmentation on the temperature microenvironment around corals: Implications for coral bleaching? *Limnol. Oceanogr.* 51(1), 30-37
- Fernández A, Molina M, Alvarez A, Alcántara M, Espigares A. (2001). Transmisión fecohídrica y virus de la hepatitis A. *Higiene y Sanidad Ambiental* 2001; 1: 8-24.
- Garcia, G. D., Gregoracci, G. B., Santos, E. O., Meirelles, P. M., Silva, G. G. Z., Edwards, R., Sawabe, T., Gotoh, K., Nakamura, S., Iida, T., de Moura, R., Thompson, F. L. (2013). Metagenomic Analysis of Healthy and White Plague-Affected *Mussismilia braziliensis* Corals. *Microb Ecol* (2013) 65:1076–1086.
- Goreau, T.J., McClanahan, T., Hayes, R. and Strong, A.E. 2000. Conservation of coral reefs after the 1998 global bleaching event. *Conserv. Biol.* 14(1): 5–15.
- Handelsman, J., (2007). *Metagenomics and Microbial Communities*. eLS doi: 10.1002/9780470015902.a0020367.
- Hubbard, J. A. and Pocock, Y. P., 1972. Sediment rejection by recent scleractinian corals: A key to paleoenvironmental reconstruction. *Geol. Rundsch.* 61:598-626.
- Huse S. M., Dethlefsen L., Huber J. A., Welch D. M., Relman D. A. and Sogin M. L., (2008). Exploring Microbial Diversity and Taxonomy Using SSU rRNA Hypervariable Tag Sequencing. *PLoS Genet* 4(11): e1000255. doi:10.1371/journal.pgen.1000255.
- Johannes, R.E., and Wiebe, W.J. (1970) Method for determination of coral tissue biomass and composition. *Limnol. Oceanogr.* 15, 822-824.

- Jones, R. J., Bowyer, J., Hoegh-Guldberg, O., and Blackall, L. L. (2004). Dynamics of a temperature-related coral disease outbreak. *Mar Ecol Prog Ser* 281:63–77.
- Jünemann, S., Prior, K., Szczepanowski, R., Harks, I., Ehmke, B., Goesmann, A., Stoye, J., and Harmsen, D. (2012) Bacterial Community Shift in Treated Periodontitis Patients Revealed by Ion Torrent 16S rRNA Gene Amplicon Sequencing. *PLoS ONE* 7(8): e41606. doi:10.1371/journal.pone.0041606
- Jr, N. A., Neto, O. S. M., Silva, B. S. O., Moura, R. L. D., Francini-filho, R. B., Barreira, C., and Paranhos, R. (2010). Diversity and pathogenic potential of vibrios isolated from Abrolhos Bank corals. *Environmental Microbiology*, 2, 90-95. doi:10.1111/j.1758-2229.2009.00101.x
- Kellogg, C. A., (2004). Tropical Archaea: diversity associated with the surface microlayer of corals. *Mar Ecol Prog Ser* 273:81-88.
- Kikuchi, Y., Hosokawa, T., Fukatsu, T., (2011). An ancient but promiscuous host-symbiont association between Burkholderia gut symbionts and their heteropteran hosts. *The ISME Journal* 5, 446-460.
- Kim, M., Morrison, M., and Yu, Z. (2011). Evaluation of different partial 16S rRNA gene sequence regions for phylogenetic analysis of microbiomes. *Journal of Microbiological Methods* 84 (2011) 81–87.
- Klaus, J. S., Janse, I., Heikoop, J., Sanford, R. and Fouke, B. W., (2007). Coral Microbial communities, zooxanthellae and mucus along gradients of seawater depth and coastal pollution. *Environmental Microbiology*, 9:1291-1305. Doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01249.x
- Knowlton, N., and Rohwer, F. (2003) Multispecies microbial mutualisms on coral reefs: the host as a habitat. *Am Nat* 162: S51–S62.
- Kooperman, N., Ben-Dov, E., Kramarsky-Winter, E., Barak, Z., and Kushmaro A. (2007). Coral mucus-associated bacterial communities from natural and aquarium environments. *FEMS Microbiol Lett* 276: 106-113.
- Kuezyński, J., Stombaugh, J., Walters, W. A., González, A., Caporaso, J.G., and Knight, R. (2011). Using QIIME to Analyze 16S rRNA Gene Sequences from Microbial Communities. *Current Protocols in Bioinformatics*. DOI: 10.1002/0471250953.bi00736

- Kuta, K., and Richardson, L. (2002). Ecological aspects of black band disease of corals: relationships between disease incidence and environmental factors. *Coral Reefs* 21: 393-398.
- Kvennefors, E. and Roff, G. (2009) Evidence of cyanobacteria-like endosymbionts in Acroporid corals from the Great Barrier Reef. *Coral Reefs* 28, 547
- Laurel-Sandoval, MAM. (2010). Agregación zooxantelar en corales *Pocillopora* sp asociado a un esquema de intercambio bidireccional en las comunidades arrecifales de Manzanillo, Colima. Tesis de licenciatura. Universidad de Colima.
- Lesser, M. P., Mazel, C. H., Gorbunov, M. Y., and Falkowski, P. G. (2004). Discovery of symbiotic nitrogen-fixing cyanobacteria in corals. *Science* (New York, N.Y.), 305(5686), 997-1000. doi:10.1126/science.1099128
- Leutenegger, A., D'Angelo, C., Matz, M. V., Denzel, A., Oswald, F., Salih, A., Nienhaus, G. U., and Wiedenmann, J. (2007). It's cheap to be colorful: Anthozoans show a slow turnover of GFP-like proteins. *FEBS*, 274: 2496-2505.
- Lewis, J.B. and Price, W. S., 1975. Patterns of ciliary currents in Atlantic reef corals and their functional significance. *J. Zool. Lond.* 178:77-89.
- Liñán-Cabello, M. A. , Flores-Ramírez, L. A. , Laurel-Sandoval, M. A. , Garcia-Mendoza, E., Soriano-Santiago, O. and Delgadillo-Nuño, M. A. (2010) 'Acclimation in *Pocillopora* spp. during a coral restoration program in Carrizales Bay, Colima, Mexico', *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, First published on: 21 December 2010 (iFirst)
- Liñán-Cabello, M.A., Flores-Ramírez, L., Zacarías-Salinas, J.S., Hernández-Rovelo, O. and Lezama-Cervantes, C. (2006). Correlation of chlorophyll a and total carotenoid concentrations with coral bleaching from locations on the Pacific coast of Mexico. *Mar. Freshw. Behav. Physiol.* 39(4):279–291.
- Liñán-Cabello, M.A., Flores-Ramírez, L.A., Zenteno-Savin, T., Olguín-Monroy, N.O., Sosa-Avalos, R. Patiño-Barragan, M., and Olivos-Ortiz, A., (2010). Seasonal changes of antioxidant and oxidative parameters in the coral *Pocillopora capitata* on the Pacific coast of Mexico. *Mar. Ecol. Evol.Persp.* 31,407-417
- Liñán-Cabello, M.A., Hernández-Medina, D., Florián-Álvarez, P. y Mena-Herrera, A. (2008). Estado Actual del arrecife coralino “La Boquita”, Colima. *IRIDIA* 5:10-23.

- Liñán-Cabello MA. 2012. Estado Actual de la comunidad coralina La Boquita: caso de estudio. In: Liñán-Cabello MA, Flores L, editors. Relaciones moleculares asociadas al estrés antropogénico y ambiental [Relationships associated molecular anthropogenic and environmental stress]. Saarbrücken: Académica Española; p. 5–25.
- Luna, G. M., Biavasco, F., and Danovaro, R. (2007). Bacteria associated with the rapid tissue necrosis of stony corals. *Environmental microbiology*, 9(7), 1851-7. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01287.x
- Marinés, M., Alvarez-Filip, L., y Reyes-Bonilla, H. (2005). Blanqueamiento de coral en arrecifes de la Isla de Cozumel, México. Resumen del IV Congreso Mexicano de Arrecifes de Coral en La Paz, BCS, México 2007 62pp.
- Mauel, M. J.; Soto, E.; Moralis, J. A.; Hawke, J. (2007). A Piscirickettsiosis-like Syndrome in Cultured Nile Tilapia in Latin America with *Francisella* spp. as the Pathogenic Agent. *Journal of Aquatic Animal Health* 19:27–34.
- Muñiz-Anguiano, M. D. (2013). Algunos indicadores ecológicos y fisiológicos asociados a un proceso de restauración de Pocillopora sp. (Antozoa: Scleractinia) en dos comunidades arrecifales de Manzanillo, Colima. Tesis de Maestría en Ciencias del Mar. Universidad de Colima.
- Muyzer, G., De Waal, E.C., and Uitterlinden, A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59:695-700
- Nakayama, J., Jiang, j., Watanabe, K., Chen, K., Ninxin, H., Matsuda, K., Kurakawa, T., Tsuji, H., Sonomoto, K., Lee, Y. K. (2013). Up to Species-level Community Analysis of Human Gut Microbiota by 16S rRNA Amplicon Pyrosequencing. *Bioscience of Microbiota, Food and Health* Vol. 32 (2), 69-76, 2013.
- Papina, M., Meziane, T., and Van Woesik, R. (2003). Symbiotic zooxanthellae provide the host-coral *Montipora digitata* with polyunsaturated fatty acids. *Comp. Biochem. Physiol. PT B*, **135**, 533-537.
- Patterson, K. L., Porter, J. W., Ritchie, K. B., Polson, S. W., Muelle, E., Peters, E. C., Santavy, D. L., and Smith, G. W. (2002). The etiology of white pox, a lethal disease of the Caribbean elkhorn coral, *Acropora palmata*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 8725– 8730.
- Reyes-Bonilla, H., Calderón-Aguilera L.A., Cruz-Piñón, G., Medina-Rosas, P., López-Pérez, R.A, Herrero-Perezrul, M.D, Leyte-Morales, G.E., Cupul-

- Magaña, A.L., y Carriquiry-Beltrán JD. 2005. Atlas de Corales Pétreos (Anthozoa: Scleractinia) del Pacífico Mexicano. México: CICESE/CONABIO/ CONACYT/UABCS / Universidad de Guadalajara/Universidad del Mar.
- Reyes-Bonilla, H., López-Pérez, R. A., y Medina-Rosas, P. (2002). El estado actual de los arrecifes coralinos en el mundo. *Ciencia y Desarrollo* **166**, 12-21.
- Ritchie, K.B., (2006). Regulation of microbial populations by coral surface mucus and mucus-associated bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 322:1-14.
- Rodicio, M. R., y Mendoza, M., (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del 16s ARNr: fundamento, metodología y aplicaciones en la microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 22(4):238-45.
- Rohwer, F., Breitbart, M., Jara, J., Azam, F., and Knowlton N. (2001). Diversity of bacteria associated with the Caribbean coral *Montastrea franksi*. *Coral Reefs* 20:85-91.
- Rosenberg, E., and Falkovitz, L. (2004). The *Vibrio shiloi/Oculina patagonica* model system of coral bleaching. *Annual Review of Microbiology* Vol. 58: 143-159. First published online as a Review in Advance on March 26, 2004. DOI: 10.1146/annurev.micro.58.030603.123610
- Rosenberg, E., Koren, O., Reshef, L., Efrony, R., and Zilber-Rosenberg, I. (2007). The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nature reviews. Microbiology*, 5(5), 355-62. doi:10.1038/nrmicro1635
- Rosenberg, E., Kushmaro, A., Kramarsky-Winter, E., Banin, E., and Yossi, L. (2009). The role of microorganisms in coral bleaching. *The ISME journal*, 3(2), 139-46. doi:10.1038/ismej.2008.104
- Rothberg, J. M., Hinz, W., Rearick, T. M., Schultz, J., Mileski, W., Davey, M., Leamon, J. H., Johnson, K., Milgrew, M. J., Edwards, M., Hoon, J., Simons, J. F., Marran, D., Myers, J. W., Davidson, J. F., Branting, A., Nobile, J. R., Puc, B. P., Light, D., Clark, T. A., Huber, M., Branciforte, J. T., Stoner, I. B., Cawley, S. E., Lyons, M., Fu, Y., Homer, N., Sedova, M., Miao, X., Reed, B., Sabina, J., Feierstein, E., Schorn, M., Alanjary, M., Dimalanta, E., Dressman, D., Kasinskas, R., Sokolsky, T., Fidanza, J. A., Namsaraev, E., McKernan, K. J., Williams, A., Roth, G. T., Bustillo, J. (2011). An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* 475, 378-352.
- Rungrasamee, W., Klanchui, A., Chaiyapechara, S., Maibunkaew, S., Tangphatsornruang, S., Jiravanichpaisal, P., Karoonuthaisiri, N. (2013) Bacterial Population in Intestines of the Black Tiger Shrimp (*Penaeus*

monodon) under Different Growth Stages. PLoS ONE 8(4): e60802. doi:10.1371/journal.pone.0060802

- Sánchez, M. J. A., Cadena, J., Grajales, A., y Porto, I., (2005). ¿Por qué están muriendo los corales? Blanqueamiento coralino: causas, consecuencias e hipótesis. Apuntes Científicos Uniandinos no. 5.
- Sekar, R., Mills, D. K., Remily, E. R., Voss, J. D., and Richardson, L. L. (2006) Microbial communities in the surface mucopolysaccharide layer and the black band microbial mat of black band-diseased *Siderastrea siderea*. Appl Environ Microbiol 72:5963–5973
- Shnit-Orland, M., and Kushmaro, A. (2008). Coral mucus bacteria as a source for antibacterial activity. Proceeding of the 11th International Coral Reef Symposium. Session number 8.
- Siebeck, U. E., Marshall, N. J., and Klüter, A., (2006) Monitoring coral bleaching using a colour reference card. Coral reefs (2006) DOI 10.1007/s00338-006-0123-8
- Simon, C., and Daniel, R., (2011). Metagenomics Analyses: Past and Future Trends. *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (4): 1153. DOI:10.1128/AEM. 02345-10, 1153-1161.
- Soriano-Santiago, O. S., Liñán-Cabello, M. A., Delgadillo-Nuño, M. A., Ortega-Ortiz, C., Cuevas-Venagas, S. (2013) Physiological responses to oxidative stress associated with Ph variations in host tissue and zooxanthellae of hermatypic coral *Pocillopora capitata*. Marine and Freshwater and Behaviour Physiology. DOI: 10.1080/10236244.2013.827877.
- Thomas, T., Gilbert, J., and Meyer, F., (2012). Metagenomics- a guide from sampling to data analysis. *Microbial Informatics and Experimentation* 2:3.
- Thurber, R. V., Willner-Hall, D., Rodriguez-Mueller, B., Desnues, C., Edwards, R. A., Angly, F., Dinsdale, E., Kelly, L., and Rohwer, F. (2009) Metagenomic analysis of stressed coral holobionts. Environ Microbiol 11:2148–2163
- Turnbaugh, P. J., and Gordon, J. I., (2008). An invitation to the marriage of Metagenomics and Metabolomics. Cell 134. DOI 10.1016/j.cell.2008.08.025.
- Wang, Q, G. M. Garrity, J. M. Tiedje, and J. R. Cole. 2007. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. Appl Environ Microbiol. 73(16):5261-7.

- Wegley, L., Edwards, R., Rodriguez-Brito, B., Liu, H., Rohwer, F., (2007). Metagenomics analysis of the microbial community associated with the coral *Porites astreoides*. *Environmental Microbiology* 9 (11), 2707-2719
- Weile, J., Seibold, E., Knabbe, C., Kaufmann, M., Spletstoesser, W. (2013). Treatment of Tularemia in Patient with Chronic Graft-versus-Host Disease. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 19, No. 5. DOI:<http://dx.doi.org/10.3201/eid1905.120377>.
- Whiteley, A. S., Jenkins, S., Waite, I., Kresoje, N., Payne, H., Mullan, B., Allcock, R., O'Donnell, A. (2012). Microbial 16S rRNA Ion Tag and community metagenome sequencing using the Ion Torrent (PGM) Platform. *Journal of Microbiological Methods* 91 (2012) 80–88.
- Williams, W.M., Viner, A. B., and Broughton, W. J. (1987) Nitrogen fixation (acetylene reduction) associated with the living coral *Acropora variabilis*. *Mar. Biol.* 94, 531–535.
- Wu S., Baldwin 6th R. L., Li W., Li C., Connor E. E., and Li R. E., (2012). The Bacterial Community Composition of the Bovine Rumen Detected Using Pyrosequencing of 16S rRNA Genes. *Ashdin Publishing Metagenomics* Vol. 1 doi: 10.4303/mg/235571.
- Zacarías-Salinas J.B. (2007) Caracterización del Fenómeno de blanqueamiento del coral pétreo en las comunidades coralinas de La Boquita y Bahía Carrizales en el verano 2004. Tesis de licenciatura. Universidad de Colima. 43pp.

XI. ANEXOS

Anexo 1. Preparación de reactivos

Solución Buffer de Fosfatos (PBS)

Reactivos:

- Cloruro de sodio 7.650 g
- Na_2HPO_4 (Fosfato disódico) 0.724g
- KH_2PO_4 (Difosfato de potasio) 0.210 g
- Agua destilada 1000 mL

Preparación:

1. Disolver los ingredientes.
2. Esterilizar en autoclave 15 min a 121°C y 15lb de presión

ANEXOS

Anexo 2. Secuenciación masiva

5.4.1 Cuantificación de la Librería y Dilución por Qubit® 2.0 Fluorometer

Primeramente se requiere preparar un templado que contenga todas las librerías previamente amplificadas a una concentración equimolar, para ello se requiere cuantificar 10µl de cada librería utilizando el Fluorómetro Qubit® y el kit Qubit® dsDNA High Sensitivity Assay de Life Technologies. La concentración recomendada de la librería debe ser entre 300-1500 ng/ml que se ajustó siguiendo el protocolo que se describe a continuación:

1. Se determinó la concentración de la librería amplificada:
 - a) Se hizo una dilución 1:200 del reactivo Qubit® dsDNA HS usando el buffer Qubit® dsDNA HS.
 - b) Se combinó los 10µl de la librería AmpliSeq™ con 190µl de colorante, se mezcló bien e incubó durante al menos dos minutos.
 - c) Se preparó cada estándar Qubit®.
 - d) Se midió la concentración en el Fluorómetro 2.0 Qubit®.
 - e) Se calculó la concentración de cada librería no diluida y multiplicó por 20.
2. Se determinó la dilución de la librería que diera aproximadamente una concentración de 3ng/ml.
3. Antes de preparar el templado se diluyó una alícuota de cada librería a una concentración de ~3ng/ml. Una vez diluidas las librerías se almacenaron a 4-8°C hasta su uso. Para el pool de las librerías se requiere a una concentración de 20 pM (3ng/ml), por lo tanto de cada una de las librerías (muestras) se tomaron 3µl obteniendo un volumen final de 54µl.

5.4.2 Preparación del Templado

Se requiere inmovilizar los fragmentos a secuenciar sobre un sustrato específico (ISP's) el cual nos permite la amplificación clonal (ePCR) y su posterior enriquecimiento.

1. Se comenzó con la preparación del templado (One Touch) utilizando el kit Ion Touch 200 Supplies/Solutions.
2. Se amplificaron las ISP del One Touch y se recuperaron las ISP vivas con el kit One Touch 200 reagents.
3. Se cuantificaron las ISP totales (10-30%) con el Qubit y utilizando el kit Ion Sphere Quality Control.
4. Se enriquecieron las ISP utilizando el kit One Touch 200 reagents y se separaron las esferas positivas de las totales a través del sistema automatizado Ion One Touch ES.
5. Se cuantificaron de nuevo las ISP vivas (>50%) nuevamente con el Qubit y el kit Ion Sphere Quality Control.

5.6.3 Lavado del Secuenciador

Para la secuenciación se utilizó el secuenciador masivo de Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) y el chip 314 que tiene un rendimiento de 30-100 Mb de datos de secuencias en una corrida de 4hrs y puede leer de 400-550000 secuencias por corrida, además la química con la que trabaja es de 200 pb y en este trabajo el tamaño del amplicón es de 100-200 pb por lo que resulta ser más viable económicamente.

1. Para el proceso de secuenciación se requirió previamente lavar el PGM:
 - a) Se comenzó con el lavado con cloro.
 - b) Luego se lavó con agua destilada que no haya sido almacenada y recién filtrada.
 - c) Se ajustó el pH de W2 y W1 tomando de referencia W3 hasta que llega a 7.7.
2. Se realizó la primera inicialización utilizando el kit Ion GM 200 Sequencing/Supplies Solution.

3. Se prepararon las ISP.
4. Se lavó el chip.

5.4.4 Cargado del Chip

Para el cargado se siguió el protocolo establecido para el chip 314 proporcionado por Life Technologies.

1. Se vortexearon las ISPs control y spin por 2seg y se agregaron 5µl a 50µl de ISPs con templado. Agregamos 100µl de buffer de alineamiento y mezclamos por pipeteo en hielo.
2. Centrifugamos a 15500g x 4min y retiramos todo el volumen, dejando solamente 3µl de sequencing primer, homogenizamos y llevamos al termociclador.
3. Se hizo el chipcheck como lo indica el equipo y se comenzó con el lavado del chip.
 - a. Se lavó con 100µl de isopropanol inclinando el chip 45° con el puerto de entrada hacia abajo y se aspiró todo lo que saliera del puerto de salida.
 - b. Una vez concluido el primero se lavó con 100µl de buffer de alineamiento, nuevamente se hizo lo anterior mencionado. Este paso se repite una vez más.
 - c. Se adicionó 1µl de polimerasa de secuenciación a las ISPs vivas, se mezcló por pipeteo y se incubó 5min a temperatura ambiente.
 - d. Nuevamente se inclinó el chip 45° y se aspiró todo lo que saliera por el puerto de entrada directamente del orificio con dial up y se centrifugó boca abajo tab in por 10seg.
5. Se cargó el chip 314 la cual es la parte crítica para la eficiencia de la secuenciación ya que se requiere que cada pozo del chip contenga 1

ISP, por lo que Se cargaron 7 μ l en el chip usando dial down, se sacó todo lo que haya salido por el otro puerto de salida no del orificio y se centrifugó con el tab in por 40seg.

6. Se realizó la secuenciación.

Los datos se transfieren automáticamente al servidor Torrent de Life Techonologies quien realiza el proceso inicial. Las señales iónicas de los cambios de pH se asocian a la incorporación de nucleótidos durante el proceso de secuenciación y se almacenan en archivos estándar SFF o FASTQ.

ANEXOS

Anexo 3. Comandos usados para el análisis con QIIME

Comando	Función
check_id_map.py -m map.txt -o mapping_output	Checar que el formato del mapa sea correcto.
pick_otus_through_otu_table.py -i corales.fna -o otus per_library_stats.py -i otus/otu_table.biom	Seleccionar las OTUs de acuerdo a la similitud de secuencias con las lecturas, selecciona la representativa y hace estadístico.
make_otu_heatmap_html.py -i otus/otu_table.biom -o otus/OTU_Heatmap/	Hacer de manera visual la tabla de OTUs
make_otu_network.py -m map.txt -i otus/otu_table.biom -o otus/OTU_Network	Proporciona las gráficas de abundancia de OTUs presentes en cada una de las muestras en cada clasificación taxonómica.
summarize_taxa_through_plots.py -i otus/ otu_table.biom -o wf_taxa_summary -m map.txt	Calcular los índices de diversidad alfa, y proporcionar las curvas de rarefacción.
alpha_diversity.py -h echo "alpha_diversity:metrics shannon,PD_whole_tree,chao1,observed_species" > alpha_params.txt alpha_rarefaction.py -i otus/otu_table.txt -m map.txt -o wf_arare/ -p alpha_params.txt -t otus/rep_set.tre beta_diversity_through_plots.py -i otus/otu_table.txt - m map.txt -o wf_bdiv_even146/ -t otus/rep_set.tre -e 146 jackknifed_beta_diversity.py -i otus/otu_table.biom stat -t otus/rep_set.tre -m map.txt -o wf_jack -e 110 make_3d_plots.py -i wf_bdiv_even146/unweighted_unifrac_pc.txt -m map.txt -t wf_taxa_summary/otu_table_L3.txt -- n_taxa_keep 5 -o 3d_biplot	Calcular los índices de diversidad beta y proporcionar las figuras.
	Realizar plots en format 3D

ANEXOS

Anexo 4. Taxas identificados a nivel clase por QIIME

A nivel clase las identificadas por QIIME fueron *Fimbriimonadetes*, *Lentisphaeria*, *028H05-P-BN-P5*, *4C0d-2*, *Acidimicrobiia*, *Acidobacteria-6*, *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Anaerolineae*, *AT-s2-57*, *Bacilli*, *Bacteroidia*, *BD1-5*, *Betaproteobacteria*, *C6*, *Chlamydiia*, *Chloracidobacteria*, *Chlorobia*, *Chloroplast*, *Clostridia*, *Deinococci*, *Deltaproteobacteria*, *EC214*, *Ellin6529*, *Epsilonproteobacteria*, *Flavobacteriia*, *Fusobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Gemm-2*, *Gemm-4*, *GKS2-174*, *IIB17*, *Mollicutes*, *Nitrospira*, *OM190*, *OPB56*, *Opitutae*, *Oscillatoriohycideae*, *OS-K*, *Phycisphaerae*, *Planctomycetia*, *PRR-12*, *RB25*, *SAR202*, *Sphingobacteriia*, *Sva0725*, *Synechococcophycideae*, *TK17*, *Verruco-5*, *Verrucomicrobiae*, *VHS-B5-50*, *ZB2*, y los dos grupo Unclassified y Unidentified.

ANEXOS

Anexo 5. Taxas identificados a nivel orden por QIIME

A nivel orden los 82 identificados fueron *Entotheonellales*, *Fimbriimonadales*, *Pelagicoccales*, *Acholeplasmatales*, *Acidimicrobiales*, *Actinomycetales*, *Aeromonadales*, *agg27*, *Alteromonadales*, *Anaerolineales*, *Bacillales*, *Bacteroidales*, *BD7-3*, *Bdellovibrionales*, *BPC015*, *Burkholderiales*, , *26*, *CAB-I*, *Caldilineales*, *Campylobacterales*, *Caulobacterales*, *CCU21*, *Chlamydiales*, *Chlorobiales*, *Chromatiales*, *Chroococcales*, *Clostridiales*, *d113*, *Deinococcales*, *Desulfobacterales*, *Desulfuromonadales*, *Enterobacteriales*, *Exiguobacteriales*, *Flavobacteriales*, *Fusobacteriales*, *Gemellales*, *Gemmatales*, *GMD14H09*, *GN03*, *HOC36*, *HTCC2188*, *Kiloniellales*, *Kordiimonadales*, *Lactobacillales*, *Legionellales*, *Lentisphaerales*, *Methylococcales*, *Methylophilales*, *MLE1-12*, *mle1-48*, *MVS-107*, *Myxococcales*, *NB1-j*, *Neisseriales*, *Nitrospirales*, *Oceanospirillales*, *Phycisphaerales*, *Pseudanabaenales*, *Pseudomonadales*, *Puniceicoccales*, *R76-B128*, *Rhizobiales*, *Rhodobacterales*, *Rhodocyclales*, *Rhodophyta*, *Rhodospirillales*, *Rickettsiales*, *SBR1031*, *SHA-20*, *Sphingobacteriales*, *Sphingomonadales*, *Stramenopiles*, *Sva0725*, *Synechococcales*, *Syntrophobacteriales*, *Thiotrichales*, *TK18*, *UA01*, *Verrucomicrobiales*, *Vibrionales*, *Xanthomonadales*, y los grupos *Unclassified* y *Unidentified*.

ANEXOS

Anexo 6. Taxas identificados a nivel familia por QIIME

Las 107 familias identificadas fueron *Chromatiaceae*, *Entotheonellaceae*, *Fimbriimonadaceae*, *Pelagicococcaceae*, *A4b*, *Acholeplasmataceae*, *Aeromonadaceae*, *Alcaligenaceae*, *Alteromonadaceae*, *Amoebophilaceae*, *Anaerolinaceae*, *Arctic95B-10*, *Bacillaceae*, *Balneolaceae*, *Bdellovibrionaceae*, *Bradyrhizobiaceae*, *Brevibacteriaceae*, *Burkholderiaceae*, *C111*, *Caldilineaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Caulobacteraceae*, *Chitinophagaceae*, *Chlorobiaceae*, *Clostridiaceae*, *Cohaesibacteraceae*, *Comamonadaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Cryomorphaceae*, *Cyanobacteriaceae*, *Deinococcaceae*, *Desulfobacteraceae*, *Desulfobulbaceae*, *Desulfuromonadaceae*, *Ekhidnaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Exiguobacteraceae*, *Ferrimonadaceae*, *Flammeovirgaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Flexibacteraceae*, *Francisellaceae*, *Fusobacteriaceae*, *Gemellaceae*, *Gemmataceae*, *Haliangiaceae*, *Halomonadaceae*, *HTCC2089*, *HTCC2188*, *Hyphomicrobiaceae*, *Hyphomonadaceae*, *JdFBGBact*, *JTB38*, *koll13*, *Leuconostocaceae*, *Marinilabiaceae*, *Methylobacteriaceae*, *Methylocystaceae*, *Methylophilaceae*, *Micrococcaceae*, *Moraxellaceae*, *Nannocystaceae*, *Neisseriaceae*, *Nitrospinaceae*, *Nitrospiraceae*, *ntu14*, *Oceanospirillaceae*, *OCS155*, *OM182*, *OM27*, *OM60*, *Oxalobacteraceae*, *Pelagibacteraceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Phormidiaceae*, *Phycisphaeraceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Planococcaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Prevotellaceae*, *Propionibacteriaceae*, *Pseudanabaenaceae*, *Pseudoalteromonadaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Puniceicoccaceae*, *Rhizobiaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Rhodocyclaceae*, *Rhodospirillaceae*, *Rhodothermaceae*, *Saprospiraceae*, *SC3-41*, *Shewanellaceae*, *Sinobacteraceae*, *SJA-101*, *Sphingomonadaceae*, *Staphylococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Synechococcaceae*, *Thiotrichaceae*, *TK06*, *Veillonellaceae*, *Verrucomicrobiaceae*, *Vibrionaceae*, *wb1_P06*, *Xanthomonadaceae* y *Xanthomonadales*, los grupos *Unclassified* y *Unidentified*

ANEXOS

Anexo 7. Taxas identificados a nivel género por QIIME

A nivel género los identificados fueron *A4*, *Acholeplasma*, *Achromobacter*, *Acidovorax*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alteromonas*, *Amaricoccus*, *Amphritea*, *Bacillus*, *Bdellovibrio*, *Brevibacterium*, *Burkholderia*, *C1_B004*, *Candidatus Entotheonella*, *Candidatus Portiera*, *Cetobacterium*, *Chitinophaga*, *Chryseobacterium*, *Clostridium*, *Cohaesibacter*, *Coraliomargarita*, *Corynebacterium*, *Cyanobacterium*, *Deinococcus*, *Delftia*, *Desulfococcus*, *Dinoroseobacter*, *Ekhidna*, *Enhydrobacter*, *Exiguobacterium*, *Flammeovirga*, *Flavobacterium*, *Fluviicola*, *Francisella*, *Gluconacetobacter*, *Haliscomenobacter*, *Halomonas*, *HTCC*, *Hydrocarboniphaga*, *Hydrogenophilus*, *Hyphomonas*, *Inquilinus*, *Janthinobacterium*, *JTB248*, *Kocuria*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Limnobacter*, *Luteolibacter*, *Lutimonas*, *Methylosinus*, *Methyloversatilis*, *MSBL3*, *Nautella*, *Neisseria*, *Nitrospina*, *Oleibacter*, *Oscillatoria*, *Paracoccus*, *Pedomicrobium*, *Pelagicoccus*, *Photobacterium*, *Plesiocystis*, *Polaribacter*, *Pontibacter*, *Prevotella*, *Prochlorococcus*, *Propionibacterium*, *Prosthecochloris*, *Proteus*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Pseudoruegeria*, *Psychrobacter*, *Psychroserpens*, *Rheinheimera*, *Robiginitalea*, *Rothia*, *Rubritalea*, *Ruegeria*, *SC3-56*, *SGUS912*, *Shewanella*, *Sphingomonas*, *Sporosarcina*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas*, *Streptococcus*, *Tenacibaculum*, *Thalassobius*, *Thiothrix*, *Ucs1325*, *Veillonella*, *Verrucomicrobium*, *Vibrio*, *Wautersiella*, *Winogradskyella* y *Xanthomonadales*, y los grupos *Unclassified* y *Unidentified*

ANEXOS

Anexo 8. Taxas identificados a nivel clase por RDP Classifier

De las 60 clases que en total fueron identificadas, solamente una se encontró dentro del dominio Arquea la cual fue *Thermoprotei*, las 58 restantes fueron del dominio Bacteria, las cuales son: *Acidobacteria_Gp1*, *Acidobacteria_Gp10*, *Acidobacteria_Gp16*, *Acidobacteria_Gp17*, *Acidobacteria_Gp21*, *Acidobacteria_Gp22*, *Acidobacteria_Gp23*, *Acidobacteria_Gp26*, *Acidobacteria_Gp3*, *Acidobacteria_Gp4*, *Acidobacteria_Gp5*, *Acidobacteria_Gp6*, *Acidobacteria_Gp9*, *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Anaerolineae*, *Aquificae*, *Armatimonadetes_gp5*, *Bacilli*, *Bacteroidetes_incertae_sedis*, *Bacteroidia*, *Betaproteobacteria*, *BRC1_genera_incertae_sedis*, *Chlamydiae*, *Chlorobia*, *Chloroflexi*, *Chloroplast*, *Clostridia*, *Cyanobacteria*, *Deferribacteres*, *Dehalococcoidetes*, *Deinococci*, *Deltaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria*, *Erysipelotrichia*, *Fibrobacteria*, *Flavobacteria*, *Fusobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Holophagae*, *Ignavibacteria*, *Ktedonobacteria*, *Lentisphaeria*, *Mollicutes*, *Negativicutes*, *Nitrospira*, *OD1_genera_incertae_sedis*, *Opitutae*, *Phycisphaerae*, *Planctomycetacia*, *Sphingobacteria*, *Spirochaetes*, *SR1_genera_incertae_sedis*, *Subdivision3*, *Subdivision5*, *TM7_genera_incertae_sedis*, *Verrucomicrobiae* y *WS3_genera_incertae_sedis*, y el grupo Unidentified.

ANEXOS

Anexo 9. Taxas identificados a nivel orden por RDP Classifier

Los 119 orden identificados se encuentran presentes en el dominio Bacteria y estos fueron: *Acanthopleuribacterales*, *Acholeplasmatales*, *Acidimicrobiales*, *Actinomycetales*, *Aeromonadales*, *Alphaproteobacteria_incertae_sedis*, *Alteromonadales*, *Anaerolineales*, *Aquificales*, *Armatimonadetes_gp5*, *Bacillales*, *Bacteroidales*, *Bdellovibrionales*, *Bifidobacteriales*, *BRC1_genera_incertae_sedis*, *Burkholderiales*, *Campylobacterales*, *Cardiobacteriales*, *Caulobacterales*, *Chlamydiales*, *Chlorobiales*, *Chloroplast*, *Chromatiales*, *Clostridiales*, *Coriobacteriales*, *Deferribacterales*, *Dehalogenimonas*, *Deinococcales*, *Desulfobacterales*, *Desulfovibrionales*, *Desulfuromonadales*, *Edaphobacter*, *Enterobacteriales*, *Entomoplasmatales*, *Erysipelotrichales*, *Euzebyales*, *Family I*, *Family II*, *Family IV*, *Family IX*, *Family V*, *Family VI*, *Family VIII*, *Family X*, *Family XI*, *Family XII*, *Family XIII*, *Fibrobacterales*, *Flavobacteriales*, *Fusobacteriales*, *Gammaproteobacteria_incertae_sedis*, *Gp1*, *Gp10*, *Gp16*, *Gp17*, *Gp21*, *Gp22*, *Gp23*, *Gp26*, *Gp3*, *Gp4*, *Gp5*, *Gp6*, *Gp9*, *Halanaerobiales*, *Haloplasmatales*, *Hydrogenophilales*, *Ignavibacteriales*, *Kiloniellales*, *Kordiimonadales*, *Ktedonobacterales*, *Lactobacillales*, *Legionellales*, *Lentisphaerales*, *Marinifilum*, *Methylococcales*, *Methylophilales*, *Myxococcales*, *Nautiliales*, *Neisseriales*, *Nitriliruptorales*, *Nitrosomonadales*, *Nitrospirales*, *Oceanospirillales*, *OD1_genera_incertae_sedis*, *Ohtaekwangia*, *Opituales*, *Parvularculales*, *Pasteurellales*, *Phycisphaerales*, *Planctomycetales*, *Prolixibacter*, *Pseudomonadales*, *Puniceicoccales*, *Rhizobiales*, *Rhodobacterales*, *Rhodocyclales*, *Rhodospirillales*, *Rickettsiales*, *Rubrobacterales*, *Salinisphaerales*, *Selenomonadales*, *Sneathiellales*, *Sphingobacteriales*, *Sphingomonadales*, *Spirochaetales*, *SR1_genera_incertae_sedis*, *Subdivision3_genera_incertae_sedis*, *Subdivision5_genera_incertae_sedis*, *Syntrophobacterales*, *Thermales*, *Thermoanaerobacterales*, *Thermoleophilales*,

Thiotrichales, *TM7_genera_incertae_sedis*, *Verrucomicrobiales*, *Vibrionales*,
WS3_genera_incertae_sedis, *Xanthomonadales* y un grupo Unidentified.

ANEXOS

Anexo 10. Taxas identificados a nivel familia por RDP Classifier

Un total de 245 familias fueron identificadas y estas fueron: *Acanthopleuribacteraceae*, *Acetobacteraceae*, *Acholeplasmataceae*, *Acidimicrobiaceae*, *Actinomycetaceae*, *Aerococcaceae*, *Aeromonadaceae*, *Alcaligenaceae*, *Alcanivoracaceae*, *Alkalimonas*, *Alteromonadaceae*, *Alteromonadales_incertae_sedis*, *Anaerolineaceae*, *Anaplasmataceae*, *Arenicella*, *Armatimonadetes_gp5*, *Aurantimonadaceae*, *Bacillaceae 1*, *Bacillaceae 2*, *Bacillales_Incertae Sedis XI*, *Bacillales_Incertae Sedis XII*, *Bacteriovoracaceae*, *Bdellovibrionaceae*, *Beijerinckiaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Bradyrhizobiaceae*, *BRC1_genera_incertae_sedis*, *Breoghania*, *Brevibacteriaceae*, *Brucellaceae*, *Burkholderiaceae*, *Burkholderiales_incertae_sedis*, *Campylobacteraceae*, *Cardiobacteriaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Caulobacteraceae*, *Cellulomonadaceae*, *Chitinophagaceae*, *Chlamydiaceae*, *Chlorobiaceae*, *Chloroplast*, *Chromatiaceae*, *Clostridiaceae 1*, *Clostridiaceae 2*, *Clostridiales_Incertae Sedis XI*, *Cocleimonas*, *Cohaesibacteraceae*, *Colwelliaceae*, *Comamonadaceae*, *Congregibacter*, *Coriobacteriaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Coxiellaceae*, *Cryomorphaceae*, *Cyclobacteriaceae*, *Cystobacteraceae*, *Cytophagaceae*, *Deferribacteraceae*, *Deferribacterales_incertae_sedis*, *Dehalogenimonas*, *Deinococcaceae*, *Demequinaceae*, *Desulfobacteraceae*, *Desulfobulbaceae*, *Desulfohalobiaceae*, *Desulfomicrobiaceae*, *Desulfonatraceae*, *Desulfovibrionaceae*, *Desulfuromonadaceae*, *Dietziaceae*, *Ectothiorhodospiraceae*, *Edaphobacter*, *Eionea*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Entomoplasmataceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Erythrobacteraceae*, *Eubacteriaceae*, *Euzebyaceae*, *Family I*, *Family II*, *Family IV*, *Family IX*, *Family V*, *Family VI*, *Family VIII*, *Family X*, *Family XI*, *Family XII*, *Family XIII*, *Ferrimonadaceae*, *Fibrobacteraceae*, *Flammeovirgaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Francisellaceae*, *Fusobacteriaceae*, *Geminicoccus*, *Geobacteraceae*, *Geodermatophilaceae*, *Gilvimarinus*, *Gp1*, *Gp10*, *Gp16*, *Gp17*, *Gp21*, *Gp22*, *Gp23*, *Gp26*, *Gp3*, *Gp4*, *Gp5*, *Gp6*, *Gp9*,

Granulosicoccaceae, Hahellaceae, Halanaerobiaceae, Haliangiaceae, Halomonadaceae, Haloplasmataceae, Helicobacteraceae, Hydrogenophilaceae, Hydrogenothermaceae, Hyphomicrobiaceae, Hyphomonadaceae, Iamiaceae, Idiomarinaceae, Ignavibacteriaceae, Incertae Sedis XI, Intrasporangiaceae, Kiloniellaceae, Kineosporiaceae, Kofleriaceae, Kordiimonadaceae, Ktedonobacteraceae, Lachnospiraceae, Lactobacillaceae, Legionellaceae, Lentisphaeraceae, Leptospiraceae, Leptotrichiaceae, Leuconostocaceae, Listeriaceae, Marinicella, Marinifilum, Marinilabiaceae, Methylobacteriaceae, Methylococcaceae, Methylocystaceae, Methylnatrum, Methylophilaceae, Microbacteriaceae, Micrococcaceae, Micromonosporaceae, Moraxellaceae, Moritellaceae, Mycobacteriaceae, Nannocystaceae, Nautiliaceae, Neisseriaceae, Nitriliruptoraceae, Nitrosomonadaceae, Nitrospiraceae, Nocardiaceae, Nocardioideaceae, Oceanospirillaceae, OD1_genera_incertae_sedis, Ohtaekwangia, Opitutaceae, Oxalobacteraceae, Paenibacillaceae 1, Parachlamydiaceae, Parvularculaceae, Pasteurellaceae, Peptostreptococcaceae, Phaselicytidaceae, Phycisphaeraceae, Phyllobacteriaceae, Piscirickettsiaceae, Planctomycetaceae, Planococcaceae, Polyangiaceae, Porphyromonadaceae, Prevotellaceae, Prolixibacter, Propionibacteriaceae, Pseudoalteromonadaceae, Pseudomonadaceae, Pseudonocardiaceae, Psychromonadaceae, Puniceicoccaceae, Rhizobiaceae, Rhizobiales_incertae_sedis, Rhodobacteraceae, Rhodobiaceae, Rhodocyclaceae, Rhodospirillaceae, Rhodothermaceae, Rickettsiaceae, Rikenellaceae, Rubritaleaceae, Rubrobacteraceae, Ruminococcaceae, Saccharospirillaceae, Salinisphaeraceae, Saprospiraceae, Sedimenticola, Shewanellaceae, Simkaniaceae, Sinobacteraceae, Sneathiellaceae, Sphingobacteriaceae, Sphingomonadaceae, Spirochaetaceae, Spongiibacter, Sporichthyaceae, SR1_genera_incertae_sedis, Staphylococcaceae, Streptococcaceae, Subdivision3_genera_incertae_sedis, Subdivision5_genera_incertae_sedis, Syntrophaceae, Syntrophobacteraceae, Thermaceae, Thermoactinomycetaceae 1, Thermoanaerobacteraceae, Thermoleophilaceae, Thermosporotrichaceae, Thiohalobacter, Thiohalomonas,

Thiohalophilus, *Thioprofundum*, *Thiotrichaceae*, *Thiotrichales_incertae_sedis*,
TM7_genera_incertae_sedis, *Trueperaceae*, *Tsukamurellaceae*, *Umboniibacter*,
Veillonellaceae, *Verrucomicrobiaceae*, *Vibrionaceae*, *Waddliaceae*,
WS3_genera_incertae_sedis, *Xanthobacteraceae* y *Xanthomonadaceae*,
además el grupo de secuencias Unidentified.

ANEXOS

Anexo 11. Taxas identificados a nivel género por RDP Classifier

Un total de 600 géneros y un grupo reconocido como Unidentified, los géneros fueron: *Acanthopleuribacter*, *Acetivibrio*, *Acholeplasma*, *Achromobacter*, *Acidovorax*, *Acinetobacter*, *Actibacter*, *Actinomyces*, *Adhaeribacter*, *Aerococcus*, *Aeromicrobium*, *Aeromonas*, *Aestuariibacter*, *Aestuariicola*, *Afifella*, *Aggregatibacter*, *Agromyces*, *Ahrensia*, *Akkermansia*, *Albidovulum*, *Albimonas*, *Alcanivorax*, *Algibacter*, *Algoriphagus*, *Aliivibrio*, *Alishewanella*, *Alistipes*, *Alkalibacter*, *Alkalilimnicola*, *Alkalimonas*, *Alkaliphilus*, *Alkalispirillum*, *Alkanindiges*, *Allobacillus*, *Allomonas*, *Altererythrobacter*, *Alterococcus*, *Alteromonas*, *Amaricoccus*, *Amorphus*, *Amphritea*, *Anaerobacter*, *Anaplasma*, *Anderseniella*, *Anoxybacillus*, *Aquabacterium*, *Aquamicrobium*, *Aquicella*, *Aquimarina*, *Arcicella*, *Arcobacter*, *Arenibacter*, *Arenicella*, *Arenimonas*, *Armatimonadetes_gp5*, *Arthrobacter*, *Atopostipes*, *Aurantimonas*, *Aureispira*, *Azomonas*, *Azospirillum*, *Bacillariophyta*, *Bacillus*, *Bacteriovorax*, *Balneola*, *Bangiophyceae*, *Bauldia*, *Bdellovibrio*, *Beggiatoa*, *Bellilinea*, *Bifidobacterium*, *Bizionia*, *Blastochloris*, *Blastomonas*, *Blautia*, *Bosea*, *BRC1_genera_incertae_sedis*, *Breoghania*, *Brevibacillus*, *Brevibacterium*, *Brevundimonas*, *Brochothrix*, *Brumimicrobium*, *Burkholderia*, *Byssovorax*, *Caedibacter*, *Caldithrix*, *Capnocytophaga*, *Carnobacterium*, *Castellaniella*, *Catellibacterium*, *Caulobacter*, *Cerasicoccus*, *Cetobacterium*, *Chitinophaga*, *Chlamydophila*, *Chlorarachniophyceae*, *Chlorobium*, *Chloroherpeton*, *Chlorophyta*, *Chondromyces*, *Chryseobacterium*, *Citrobacter*, *Cloacibacterium*, *Clostridium III*, *Clostridium IV*, *Clostridium sensu stricto*, *Clostridium XI*, *Clostridium XIX*, *Clostridium XVIII*, *Cocleimonas*, *Coenonia*, *Cohaesibacter*, *Collimonas*, *Comamonas*, *Congregibacter*, *Coraliomargarita*, *Corynebacterium*, *Costertonia*, *Coxiella*, *Craurococcus*, *Croceibacter*, *Croceicoccus*, *Crocinitomix*, *Cryptomonadaceae*, *Cupriavidus*, *Curvibacter*, *Cyclobacterium*, *Cycloclasticus*, *Dehalogenimonas*, *Deinobacterium*, *Deinococcus*, *Delftia*, *Demequina*, *Denitrovibrio*, *Desulfatibacillum*, *Desulfobacter*, *Desulfobacterium*,

Desulfobacula, Desulfobulbus, Desulfocapsa, Desulfocella, Desulfocurvus, Desulfofaba, Desulfofrigus, Desulfofustis, Desulfohalobium, Desulfoluna, Desulfomicrobium, Desulfomonile, Desulfonatronum, Desulfonauticus, Desulfopila, Desulforhopalus, Desulfosarcina, Desulfospira, Desulfotalea, Desulfovermiculus, Desulfovibrio, Desulfurivibrio, Desulfuromonas, Devosia, Diaphorobacter, Dietzia, Dinoroseobacter, Dokdonella, Dokdonia, Donghicola, Dongia, Dysgonomonas, Edaphobacter, Edwardsiella, Eionea, Ekhidna, Elizabethkingia, Empedobacter, Endozoicomonas, Enhydrobacter, Enhygromyxa, Enterococcus, Enterovibrio, Erysipelothrix, Erysipelotrichaceae_incertae_sedis, Erythrobacter, Eubacterium, Eudoraea, Euzebya, Exiguobacterium, Fabibacter, Falsibacillus, Fangia, Ferrimonas, Fibrobacter, Filibacter, Filomicrobium, Flagellimonas, Flammeovirga, Flaviramulus, Flavisolibacter, Flavitalea, Flavobacterium, Flectobacillus, Fluviicola, Fodinicurvata, Fontibacillus, Formosa, Francisella, Fulvibacter, Fulvivirga, Fusobacterium, Gaetbulimicrobium, Galbibacter, Gardnerella, Gemella, Geminicoccus, Gemmata, Gemmobacter, Geoalkalibacter, Geobacillus, Geobacter, Gillisia, Gilvibacter, Gilvimarinus, Gluconobacter, Gordonia, Gp1, Gp10, Gp16, Gp17, Gp21, Gp22, Gp23, Gp26, Gp3, Gp4, Gp5, Gp6, Gp9, GpI, GpIIa, GpIV, GpIX, GpV, GpVI, GpVIII, GpX, GpXI, GpXII, GpXIII, Gracilimonas, Granulicatella, Granulosicoccus, Grimontia, Haematobacter, Haemophilus, Haliangium, Haliea, Haliscomenobacter, Halochromatium, Haloferula, Halomonas, Haloplasma, Hellea, Henriciella, Herbaspirillum, Hoeflea, Hydrocarboniphaga, Hydrogenophaga, Hydrogenophilus, Hydrogenovibrio, Hyphomicrobium, Hyphomonas, Hyunsoonleella, Iamia, Idiomarina, Ignavibacterium, Illumatobacter, Isochromatium, Jannaschia, Joostella, Kangiella, Kiloniella, Klebsiella, Kocuria, Kofleria, Kordia, Kordiimonas, Kribbella, Krokinobacter, Ktedonobacter, Kushneria, Labrenzia, Lacinutrix, Lactobacillus, Lactococcus, Lawsonia, Leadbetterella, Leclercia, Leeuwenhoekiiella, Legionella, Lentisphaera, Leptotrichia, Leuconostoc, Levilinea, Lewinella, Limnobacter, Limnohabitans, Lishizhenia, Listonella, Litorimonas, Loktanella, Lucibacterium, Lutaonella,

Luteolibacter, Lutibacter, Lutimaribacter, Lutimonas, Lysinibacillus, Macrococcus, Maribacter, Maribius, Maricaulis, Marinicella, Marinifilum, Mariniflexile, Marinilabilia, Marinimicrobium, Marinobacter, Marinobacterium, Marinomonas, Marinoscillum. Maritimimonas. Marivita. Marixanthomonas, Massilia, Melitea, Meridianimaribacter, Mesonia, Mesorhizobium, Methylibium, Methylobacter, Methylobacterium, Methylocystis, Methylomicrobium, Methylonatrum, Methylophaga, Methylophilus, Methylosoma, Methyloversatilis, Microbacterium, Microbulbifer, Micrococcus, Micromonospora, Microscilla, Microvirga, Modestobacter, Moorella, Mucilaginibacter, Muricauda, Muriicola, Mycobacterium, Nannocystis, Nautella, Naxibacter, Neisseria, Neochlamydia, Neorickettsia, Neptuniibacter, Nereida, Nesterenkonia, Nevskia, Niabella, Nisaea, Nitriliruptor, Nitrobacter, Nitrosococcus, Nitrosospira, Nitrospira, Nocardioides, Novispirillum, Novosphingobium, Oceanibaculum, Oceanicaulis, Oceanicola, Oceanimonas, Oceanobacillus, Oceanospirillum, Octadecabacter, OD1_genera_incertae_sedis, Odoribacter, Oerskovia, Ohtaekwangia, Oleibacter, Oleispira, Olleya, Olsenella, Opitutus, Ornithinibacillus, Ornithobacterium, Owenweeksia, Oxalicibacterium, Paenalcaligenes, Paenibacillus, Pandoraea, Parabacteroides, Parachlamydia, Paracoccus, Paramoritella, Parapedobacter, Parvibaculum, Parvimonas, Parvularcula, Pedobacter, Pedomicrobium, Pelagibius, Pelagicoccus, Pelobacter, Pelomonas, Peptostreptococcus, Peredibacter, Perlucidibaca, Persicirhabdus, Persicobacter, Petrimonas, Petrobacter, Phaeobacter, Phaeospirillum, Phaeovibrio, Phaselicystis, Phenylobacterium, Photobacterium, Phycisphaera, Phyllobacterium, Planctomyces, Planococcus, Plesiocystis, Polaribacter, Pontibacillus, Pontibacter, Porphyromonas, Prauserella, Prevotella, Prolixibacter, Propionibacterium, Propionigenium, Prosthecobacter, Prosthecochloris, Proteus, Pseudoalteromonas, Pseudofulvimonas, Pseudomonas, Pseudonocardia, Pseudoruegeria, Pseudovibrio, Pseudoxanthomonas, Psychrobacter, Psychromonas, Psychroserpens, Puniceicoccus, Raoultella, Rapidithrix, Reichenbachiella, Reinekea, Renibacterium, Rheinheimera, Rhodobaca, Rhodobacter, Rhodobium,

Rhodopirellula, *Rhodoplanes*, *Rhodovulum*, *Rikenella*, *Robiginitalea*,
Robiginitomaculum, *Roseibacillus*, *Roseibium*, *Roseivirga*, *Roseivivax*,
Roseobacter, *Roseococcus*, *Roseovarius*, *Rothia*, *Rubribacterium*, *Rubrimonas*,
Rubritalea, *Rubrobacter*, *Ruegeria*, *Saccharospirillum*, *Salegentibacter*,
Salinicoccus, *Salinimicrobium*, *Salinisphaera*, *Salipiger*, *Salmonella*,
Sandaracinobacter, *Sandarakinotalea*, *Sarcina*, *Schlegelella*, *Schlesneria*,
Schwartzia, *Sedimenticola*, *Sediminibacterium*, *Sediminimonas*, *Sediminitomix*,
Segetibacter, *Selenomonas*, *Serratia*, *Shewanella*, *Shimia*, *Shimwellia*,
Silanimonas, *Silicibacter*, *Simkania*, *Simonsiella*, *Singulisphaera*, *Sneathiella*,
Solobacterium, *Sphingobacterium*, *Sphingobium*, *Sphingomonas*, *Sphingopyxis*,
Spirochaeta, *Spongiibacter*, *Sporichthya*, *Sporosarcina*,
SR1_genera_incertae_sedis, *Stakelama*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas*,
Streptobacillus, *Streptococcus*, *Streptophyta*,
Subdivision3_genera_incertae_sedis, *Subdivision5_genera_incertae_sedis*,
Sulfitobacter, *Sulfurimonas*, *Sulfurospirillum*, *Sulfurovum*, *Tamlana*, *Tateyama*,
Tenacibaculum, *Tepidamorphus*, *Tepidicella*, *Terasakiella*, *Teredinibacter*,
Terribacillus, *Thalassobacter*, *Thalassomonas*, *Thalassospira*, *Thermoleophilum*,
Thermomonas, *Thermosporothrix*, *Thermus*, *Thioalkalivibrio*, *Thiocapsa*,
Thioflavicoccus, *Thiohalobacter*, *Thiohalocapsa*, *Thiohalomonas*,
Thiohalophilus, *Thiohalospira*, *Thiomicrospira*, *Thiopfundum*, *Thioreductor*,
Thiorhodococcus, *Thiothrix*, *Tindallia*, *TM7_genera_incertae_sedis*, *Trabulsiella*,
Treponema, *Trichococcus*, *Truepera*, *Tsukamurella*, *Turicella*, *Turicibacter*,
Turneriella, *Ulvibacter*, *Umboniibacter*, *Vampirovibrio*, *Variovorax*, *Veillonella*,
Venenivibrio, *Verrucomicrobium*, *Vibrio*, *Vitellibacter*, *Waddlia*, *Wandonia*,
Wautersia, *Weissella*, *Wenxinia*, *Winogradskyella*, *Wolbachia*,
WS3_genera_incertae_sedis, *Xanthobacter*, *Xanthomonas*, *Yersinia*,
Yonghaparkia, *Zeaxanthinibacter*, *Zobellia* y *Zoogloea*.