



Universidad Veracruzana

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
Región Poza Rica-Tuxpan

Maestría en Manejo de Ecosistemas Marinos y Costeros

**Bacterias y hongos cultivables en *Siderastrea siderea* con y
sin el síndrome de los lunares oscuros.**

Tesis para obtener el grado de Maestro en
MANEJO DE ECOSISTEMAS MARINOS Y COSTEROS

Presenta:

Biol. Mar. Iván Fernando Guzmán López

Director:

Dr. Adán Guillermo Jordán Garza

Codirector:

Dr. Jorge Luis Chagoya Fuentes

Abril de 2023

“Lis de Veracruz: Arte, Ciencia, Luz”



Universidad Veracruzana

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
Región Poza Rica-Tuxpan

Maestría en Manejo de Ecosistemas Marinos y Costeros
Bacterias y hongos cultivables en Siderastrea siderea con y sin el síndrome de lunares oscuros.

Tesis para obtener el grado de Maestro en
MANEJO DE ECOSISTEMAS MARINOS Y COSTEROS

Presenta:
Biol. Mar. Iván Fernando Guzmán López

Director:
Dr. Adán Guillermo Jordán Garza

Codirector
Dr. Jorge Luis Chagoya Fuentes

Carta de autorización de los directores de tesis

Tuxpan de Rodríguez Cano, Veracruz 7 de marzo de 2023

Mtro. Agustín de Jesús Basáñez Muñoz
Coordinador de la Maestría
Manejo de Ecosistemas Marinos y Costeros
Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
Universidad Veracruzana

PRESENTE

Por medio de la presente, doy la autorización para que sea revisado el escrito final del alumno Iván Fernando Guzmán López que lleva por título “Bacterias y hongos cultivables en *Siderastrea siderea* con y sin el síndrome de lunares oscuros”.

Sin más por el momento nos despedimos de usted agradeciendo la atención prestada.



Dr. Adán Guillermo Jordán Garza
Director



INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
UNIDAD ACADÉMICA DE SISTEMAS ARRECIFALES, PUERTO MORELOS

DIRECCIÓN
AV. NIÑOS HÉROES S/N
77580 PUERTO MORELOS, Q. ROO
MÉXICO

APARTADO POSTAL 13
77500 CANCÚN, Q. ROO
MÉXICO

Puerto Morelos, Quintana Roo, a 22 de Marzo de 2023

Asunto: Aprobación de tesis de Iván F. Guzmán López

A quien corresponda:

Por este conducto comunico mi voto aprobatorio para la tesis de Maestría en Manejo de Ecosistemas Marinos y Costeros titulada "Bacterias y hongos cultivables en *Siderastrea siderea* con y sin el síndrome de lunares oscuros", presentada por el Biól. Iván F. Guzmán López.

Atentamente,

Dra. Patricia E. Thomé Ortiz,
Investigadora Titular A

Unidad Académica de Sistemas Arrecifales, Puerto Morelos



Universidad Veracruzana

Tuxpan de Rodríguez Cano a 10 de abril de 2023

Asunto: Liberación de trabajo de tesis

A quien corresponda:

Por la presente, informo que el trabajo de tesis "Bacterias y hongos cultivables en Siderastrea siderea con y sin el síndrome de lunares oscuros" del estudiante: Biol. Mar. Iván Fernando Guzmán López, cumple los requisitos para poder hacer la defensa de este ante un tribunal académico del posgrado de Manejo de Ecosistemas Marinos y Costeros, de la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias del Campus Poza Rica-Tuxpan.

Atentamente,

Dr. José de Jesús Salas Pérez

No. Personal: 29726



Punta Cana, República dominicana 12 de abril de 2023

Asunto: Liberación de trabajo de tesis A quien corresponda:

Por la presente, informo que el trabajo de tesis "Bacterias y hongos cultivables en Siderastrea siderea con y sin el síndrome de lunares oscuros" del estudiante: Biol. Mar. Iván Fernando Guzmán López, cumple los requisitos para poder hacer la defensa de este ante un tribunal académico del posgrado de Manejo de Ecosistemas Marinos y Costeros, de la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias del Campus Poza Rica-Tuxpan.

Atentamente

Dr. Aldo Croquer,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Croquer".

Gerente del Programa de Conservación Marina para Caribe Central, TNC

Agradecimientos

A la universidad veracruzana, institución que una vez más me ha brindado las herramientas y la formación académica para desarrollarme de manera profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo financiero proporcionado para la realización de este proyecto.

Al Dr. Jorge Luis Chagoya Fuentes por toda la amabilidad, la atención y la ayuda brindada en todo momento para culminación de los objetivos establecidos.

Al Coordinador de Maestría, el Dr. Agustín de Jesús Basáñez Muñoz por la atención durante todo el desarrollo de la maestría.

Al los miembros del comité revisor a la Dra. Patricia Thomé Ortíz, al Dr. Aldo Croquer y al Dr. José de Jesús Salas Pérez por su amabilidad y confianza en la realización de este documento y proyecto.

Al Dr. Daniel Sokani Sánchez Montes, la Biol. Estefanía Grostieta Rojas y al equipo *Salmonella* con quienes pude trabajar en el Centro de Medicina Tropical en la ciudad de México, por la calidez brindada y el apoyo en la obtención de los resultados de este proyecto.

Al Dr. Adán Guillermo Jordán Garza por la amistad, confianza, asesoría en el tema, dedicación, ayuda brindada y sobre todo paciencia en la realización de este proyecto tan interesante.

A los profesores Dr. Juan Manuel Pech Canché, Dra. Liliana Cuervo López, Mtro. Francisco Javier Martos Fernández, Dra. Karla Garcés García, Dr. Jorge Luis Chagoya, Dr. Agustín de Jesús Basáñez Muñoz, Dra. Priscilla Casandra Gutiérrez Gálvez, Dr. Adán Guillermo Jordán Garza, Dr. Eduardo Alfredo Zarza Meza, Dr. Aldo Croquer, por compartir siempre de la mejor manera todo su conocimiento en los diversos temas abordados en el transcurso de la maestría.

Dedicatoria

Este trabajo de investigación está dedicado a mi madre Nidia Janet López Mauricio y a mi abuelita Gregoria López Mauricio quienes estuvieron en todo momento a mi lado brindándome su apoyo y amor incondicional.

A todas las personas que me han acompañado en este proyecto y que sin ellos no podría haber sido tan ameno este arduo recorrido, para mi pareja, mis amigos y mi familia.

En los momentos de crisis solo la imaginación es más importante que el conocimiento.

Albert Einstein.

Índice

Agradecimientos	i
Dedicatoria.....	ii
Índice	iii
Índice de Figuras	v
Índice de Tablas.....	v
Resumen	vi
I. Introducción	1
II. Antecedentes	3
2.1 Enfermedades en corales.....	3
2.2 Síndrome de lunares oscuros	4
2.2.1 Distribución y especies afectadas.....	5
2.2.2 Prevalencia y tasa de pérdida de tejido	6
2.2.3 Etiología	7
2.3 Identificación de microorganismos en corales sanos y afectados por el síndrome de lunares oscuros.....	8
2.3.1 Métodos basados en cultivos.....	8
2.3.2 Métodos independientes de cultivos	9
III. Objetivos.....	11
3.1 Objetivo general:.....	11
3.2 Objetivos particulares	11
IV. Área de estudio.....	12
V. Material y métodos	14
5.1 Toma de muestras	14
5.2 Análisis de laboratorio	14
5.2.1 Cultivo y caracterización de las colonias microbianas	14

5.2.2 Extracción, amplificación y secuenciación del ADN genómico ARNr 16S y 18S	15
5.2.3 Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE).....	16
5.3 Análisis estadístico	16
VI. Resultados	17
6.1 Descripción de los ensamblajes bacterianos	17
6.1.1. Bacterias identificadas por PCR.....	20
6.2 Descripción de los ensamblajes fúngicos	21
6.2.1. Hongos identificados por PCR.....	23
VII. Discusión.....	24
7.1. Bacterias asociadas a <i>Siderastrea siderea</i> con y sin el síndrome de los lunares oscuros (SLO).	24
7.2. Hongos asociados a <i>Siderastrea siderea</i> con y sin el síndrome de los lunares oscuros (SLO).	27
VIII. Conclusiones.....	28
IX. Aplicación Práctica.....	29
X. Referencias	30
Anexo.	35

Índice de Figuras

Figura 1. Localización del arrecife Tuxpan, dentro del Área de Protección de Flora y Fauna, Sistema Arrecifal Lobos-Tuxpan (APFF-SALT), Veracruz, México. Guzmán-López (2023).	12
Figura 2. Análisis de conglomerados. Muestra el índice de similitud (Bray-Curtis) entre las distintas colonias bacterianas presentes en cultivos de muestras de corales sanos (verde), afectados por el SLO (rojo) y de agua de mar (azul).....	17
Figura 3. PCA de las características morfológicas de las colonias bacterianas. Muestra la ordenación en corales sanos (círculos verdes), corales afectados por el SLO (triángulos rojos) y agua de mar (cuadrados azules).	18
Figura 4. PCA de la morfología bacteriana. Muestra la ordenación en corales sanos (círculos verdes), corales afectados por el SLO (triángulos rojos) y agua de mar (cuadrados azules).....	19
Figura 5. Análisis de conglomerados. Muestra el índice de similitud (Bray-Curtis) entre las distintas colonias fúngicas presentes en cultivos de muestras de corales sanos (verde), afectados por el SLO (rojo) y de agua de mar (azul).....	21
Figura 6. PCA de las características morfológicas de las colonias fúngicas. Muestra la ordenación en corales sanos (círculos verdes), corales afectados por el SLO (triángulos rojos) y agua de mar (cuadrados azules).	22

Índice de Tablas

Tabla 1. Lista de especies afectadas por el síndrome de lunares oscuros.	5
Tabla 2. Análisis de similitud SIMPER de la presencia/ausencia de la morfología bacteriana en agar marino.	19
Tabla 3. Especies bacterianas identificadas de los cultivos de muestras de corales sanos, afectados con el SLO, y agua de mar	20
Tabla 4. Especies fúngicas identificadas de los cultivos de muestras de corales sanos, afectados por el SLO, y agua de mar.....	23

Resumen

Aunque se desconoce el agente causal del síndrome de lunares oscuros (SLO), estudios previos han identificado patógenos bacterianos y fúngicos en corales afectados. En ese sentido, el objetivo de este estudio fue identificar las bacterias y hongos presentes en cultivos de muestras de la capa de moco de corales *Siderastrea siderea* con y sin el SLO, tomando adicionalmente muestras de agua de mar en el arrecife Tuxpan, en Veracruz, México, para su comparación. La siembra de las muestras se realizó en medios de agar marino y agar Sabouraud. Las colonias de microorganismos se describieron de acuerdo a sus características morfológicas realizando adicionalmente tinciones de Gram y azul de lactofenol. Los microorganismos presentes en los cultivos se identificaron mediante la secuenciación del ADN genómico ARNr 16S y 18S. Se observaron diferencias significativas en la morfología bacteriana en muestras de corales sin el SLO comparada con corales afectados y agua de mar (ANOSIM, $p = 0.001$, $r = 0.1$). Bacilos y estreptobacilos Gram negativos fueron comunes en muestras de corales sin el SLO, mientras que en corales afectados y agua de mar hubo una mayor presencia de bacterias con formas de cocos y estafilococos. Bacterias del género *Vibrio* dominaron las muestras de corales sin el SLO (47%, $n = 10$), e incluyeron patógenos potenciales como *Vibrio rotiferanus* y *Vibrio harveyi*. En cambio, bacterias del género *Providencia* fueron frecuentes en corales afectados (23.8%, $n = 5$). Hongos de los géneros *Nigrospora* sp (25%, $n = 2$) y *Candida* sp. (50%, $n = 4$) se presentaron en corales con y sin el SLO, mientras que un hongo de la clase Sordariomycetes (12.5%, $n = 1$) y *Colletotrichum gloeosporioides* (12.5%, $n = 1$) se presentaron únicamente en corales afectados. No se identificaron bacterias u hongos en cultivos de muestras de agua de mar. Los resultados de este estudio muestran cambios significativos en las bacterias cultivables en *S. Siderea* con y sin el SLO. La presencia de hongos terrestres como *Rhytisma acerinum* implicado previamente como agente causal del SLO y *Colletotrichum gloeosporioides* podría ser el resultado de infecciones oportunistas más que la causa del SLO.

Palabras clave: Síndrome de lunares oscuros, microbiota del coral, *Siderastrea siderea*, Cultivos microbianos, análisis moleculares

I. Introducción

Los arrecifes tropicales que existen en la actualidad son estructuras cimentadas a lo largo de cientos o miles de años por diversos organismos hermatípicos. Estas estructuras debido a sus dimensiones y densidad tienen la capacidad de modificar la topografía para formar ecosistemas altamente productivos y estables (Díaz *et al.*, 1996). Hoy en día, los corales escleractinios son los principales organismos formadores de arrecifes debido a su capacidad de extraer cantidades masivas de carbonato de calcio (CaCO_3) del agua de mar y secretarlas en forma de esqueleto (Stanley, 2003). La simbiosis que mantienen con algas de la familia *Symbiodiniaceae* facilita la deposición de carbonato y le proporciona la mayoría de los requerimientos energéticos al coral mediante la transferencia de carbono fijado fotosintéticamente. Al mismo tiempo las algas generan grandes cantidades de oxígeno molecular y radicales de oxígeno que le permite al huésped una respiración eficiente además de brindarle protección en contra de patógenos (Rosenberg *et al.*, 2007). No obstante, ahora se sabe que en los corales coexisten poblaciones diversas y específicas de microorganismos involucrados en procesos vitales, que en conjunto con el huésped forman un complejo holobionte que habita en un ambiente escaso de nutrientes (Reshef *et al.*, 2006).

Los corales están formados principalmente por tres estructuras ricas en materia orgánica aprovechable para los microorganismos. Estas son; la capa de moco superficial, los tejidos que incluyen la epidermis, la gastrodermis y la cavidad gástrica y el esqueleto de carbonato de calcio (Bourne *et al.*, 2016). En ellas existen complejas interacciones biológicas entre un amplio repertorio microbiano que incluye algas endosimbióticas, bacterias, arqueas, virus, hongos y algas endolíticas (Bourne *et al.*, 2009; Rosenberg *et al.*, 2007). Principalmente, la capa de moco superficial es la primera barrera fisiológica entre el coral y el ambiente circundante. Esta provee de nutrientos, ayuda a remover partículas de sedimento y otorga protección contra la radiación UV, la desecación y las variaciones de salinidad y temperatura (Brown y Bythell, 2005; Ritchie, 2006). La capa de moco superficial es un subproducto de las algas *Symbiodinium spp.* (Reed *et al.*, 2010) y está compuesta principalmente por glicoproteínas poliméricas llamadas mucinas y otros exsudados como lípidos que son secretados por estructuras llamadas mucocitos presentes en el epitelio del coral (Bythell y Wild, 2011).

La capa de moco superficial juega un papel fundamental en los mecanismos de defensa en contra de patógenos oportunistas, tanto por el desprendimiento y la eliminación de moco, como por las bacterias presentes en él, que ayudan al coral a través de la ocupación del nicho y la exclusión activa de microorganismos perjudiciales (Garren y Azam, 2012). Estudios realizados en corales *Siderastrea siderea* y *Madracis decactis* han demostrado que hasta un tercio de las bacterias cultivables provenientes del moco y contienen actividad antimicrobiana (Castillo *et al.* 2001; Gochfeld *et al.*, 2006). De manera similar, se ha demostrado que las bacterias presentes en el moco de *Acropora palmata* sano pueden inhibir el crecimiento de patógenos potenciales como *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* y *Serratia marcescens*, contrario a las presentes en corales blanqueados por altas temperaturas que no muestran efecto de inhibición (Ritchie, 2006). Actualmente los impactos ambientales a escala local como la contaminación y la eutrofización de las aguas interactúan con el cambio climático. Esto resulta en un ambiente fisiológicamente estresante para los corales en donde proliferan microorganismos que pueden desestabilizar la homeostasis y provocar la enfermedad (Work *et al.*, 2008a).

El síndrome de lunares oscuros como otras enfermedades en los corales se han asociado a infecciones bacterianas y fúngicas (Gil-Agudelo *et al.*, 2007; Sweet *et al.*, 2013), sin embargo, la etiología de la enfermedad aun es desconocida. Esto resalta la importancia de la continuación en el análisis del microbioma coralino en especies afectadas. Es por ello que en este estudio se identificaron las especies bacterianas y fúngicas presentes en muestras de moco del constructor arrecifal *S. siderea* sano y afectado por el síndrome de lunares oscuros en el Sistema Arrecifal Lobos-Tuxpan, México, tomando adicionalmente muestras de agua de mar dentro del polígono arrecifal para su comparación. Para ello, se realizó el cultivo de las muestras en dos distintos medios, uno generalista para bacterias marinas (agar marino) y uno generalista para hongos (agar Sabouraud). Se caracterizaron las colonias cultivadas mediante su morfología y se realizaron tinciones de Gram y de azul de algodón para observar los microorganismos presentes bajo microscopio. Finalmente se identificaron las diferentes cepas provenientes de las colonias mediante la amplificación y secuenciación del ADN genómico ARNr 16S y 18S.

II. Antecedentes

2.1 Enfermedades en corales

De forma general, la enfermedad es el resultado de la interacción dinámica entre el huésped, los patógenos y el medio ambiente (Reshef *et al.*, 2006; Work y Meteyer, 2014). En los corales, las enfermedades se manifiestan con bandas de pérdida de tejido y con signos de blanqueamiento o pigmentación con una subsecuente necrosis de los tejidos (Harvell *et al.* 2007; Raymundo *et al.*, 2008). Para comprender la etiología en las enfermedades coralinas se ha empleado un enfoque biomédico estandarizado que incluye la caracterización de los signos y lesiones *in situ* (Solano *et al.* 1993), la descripción de las lesiones bajo un enfoque histopatológico (Galloway *et al.* 2007), estudios basados en cultivos e independientes de cultivos (Gil-Agudelo *et al.*, 2007; Sweet *et al.*, 2013) y ensayos de infección para cumplir los postulados de Koch (Work *et al.*, 2008a). Estos últimos han sido fundamentales para determinar a los agentes causales en algunas enfermedades coralinas (Ben-Haim y Rosenberg, 2002; Kushmaro *et al.*, 1997; Geiser *et al.*, 1998). En ellos se establece que el patógeno debe ser cultivado y aislado de un organismo enfermo con el objetivo de inocularlo y reproducir la enfermedad en un organismo sano, así, finalmente para cumplir los postulados de Koch se deberá aislar nuevamente al patógeno del organismo inoculado (Koch, 1891). Sin embargo, de más de veinte enfermedades que afectan a los corales, solo se han identificado alrededor de siete patógenos implicados como los agentes causales (Harvell *et al.* 2007; Rosenberg *et al.*, 2007; Raymundo *et al.*, 2008). El primer microorganismo en ser identificado bajo los postulados de Koch como el responsable del blanqueamiento en *Oculina patagonica* fue *Vibrio shiloi* (Kushmaro *et al.*, 1997). A partir de esto, se han identificado otros patógenos como *Vibrio coralliilyticus* causante de la lisis de los tejidos en *Pocillopora damicornis* (Ben-Haim y Rosenberg, 2002), *Serratia marcescens* causante de la viruela blanca en *Acropora palmata* (Patterson *et al.*, 2002), *Aurantimonas coralicida* causante de la enfermedad de la plaga blanca que afecta a *Dichocoenia stokesi* en los Cayos de Florida (Denner *et al.* 2003) y *Thalassomonas loyana* causante de la enfermedad similar a la peste blanca en corales del Golfo de Aqaba, en el Mar Rojo (Thompson *et al.*, 2006). No obstante, algunas enfermedades no son causadas solo por un agente patógeno, sino por una diversidad de microrganismos como en el caso de la enfermedad de la banda negra, originada por

consorcios que incluyen a *Phormidium corallyticum*, *Desulfovibrio spp* y *Beggiatoa spp.* (Sekar *et al.*, 2006).

Además, otros signos y lesiones presentes en los corales son causados por eucariotas fúngicos. Estos miembros que normalmente conforman al holobionte coralino son funcionalmente importantes debido a su participación en el ciclo del nitrógeno (Bourne *et al.*, 2016; Wegley *et al.*, 2007). No obstante, estas interacciones usualmente comensales pueden volverse parásitarias bajo diversas condiciones de estrés ambiental. Un ejemplo de esto es la interacción entre *Aspergillus sydowii* y *Gorgonia spp.* en el mar Caribe (Geiser y Taylor, 1998; Kim *et al.*, 2000). A pesar de que *A. sydowi* se ha aislado de octocorales sanos, cuando la temperatura del mar incrementa, las respuestas inmunitarias del coral que incluyen la melanización y la actividad de amebocitos en contra de patógenos se ven disminuidas, por lo que es más susceptible a desarrollar aspergilosis (Raymundo *et al.*, 2008). Otro ejemplo de estas interacciones es la que se da en corales escleractinios *Porites lobata* y *P. lutea*, en donde el incremento en la abundancia del alga endolítica *Ostreobium quecketti*, culmina con el ataque de estas por hongos similares al género *Aspergillus*, lo que da como resultado bandas de coloración oscura en el esqueleto del coral debido a pigmentos producidos por los hongos (Priess *et al.*, 2000).

2.2 Síndrome de lunares oscuros

El síndrome de lunares oscuros (SLO) fue documentado por primera vez por Solano *et al.* (1993) en colonias de *Orbicella annularis* en las Islas del Rosario, Colombia, durante monitoreos posteriores a un evento de blanqueamiento en 1990. No obstante, existe evidencia de colonias de *Stephanocoenia michelinii* afectadas en Bonaire desde 1974, sugiriendo que el síndrome podría haber estado presente de manera similar en otros arrecifes del mar Caribe (Nugues y Bak, 2007). El síndrome de lunares oscuros (SLO), también llamado dark spots syndrome o dark spot disease (DSS o DSD, por sus siglas en inglés) se caracteriza por la aparición de signos descritos como porciones de tejido pigmentado café o púrpura entre el tejido del coral aparentemente sano (Gil-Agudelo y Garzón-Ferreira, 2001; Borger, 2005). Estos signos se asocian a lesiones que incluyen la depresión de la superficie del esqueleto y a una lenta necrosis del tejido coralino (Cervino *et al.*, 2001). Además, las lesiones prevalentes por largos períodos de tiempo pueden proporcionar un sustrato en el área central

que es colonizado paulatinamente por algas filamentosas, formando un anillo pigmentado que rodea la lesión inicial y que continúa degradando el tejido coralino (Renegar *et al.*, 2008).

2.2.1 Distribución y especies afectadas

El síndrome de lunares oscuros (SLO) se encuentra ampliamente distribuido a través del Atlántico occidental. Los signos y lesiones que caracterizan al síndrome han sido reportados prácticamente en todo el Mar Caribe (Borger, 2005; Cervino *et al.*, 2001; Gochfeld *et al.*, 2006; Muller y van Woesik, 2012; Renegar *et al.*, 2008) desde el norte en los Cayos de Florida y Bahamas (Porter *et al.*, 2011; Randall *et al.*, 2016), hasta el suroeste del Océano Atlántico en Abrolhos Bank, al este de Brasil (Francini-Filho *et al.*, 2008). Fuera del Atlántico, Work *et al.* (2008b) han descrito signos y lesiones similares en arrecifes de Samoa Americana y Hawái en el Indo-Pacífico. Estudios en el Caribe mexicano también han observado signos y lesiones típicos del SLO en arrecifes en Akumal, Quintana Roo (Mata-Lara, 2012). Sin embargo, reportes realizados por Carricart-Ganivet *et al.*, (2011) y recientemente por Jordán-Garza *et al.* (2019) han registrado al SLO en corales del Sistema Arrecifal Veracruzano y del Sistema Arrecifal Lobos-Tuxpan, ampliando los reportes de este padecimiento a los arrecifes del Corredor Arrecifal del Suroeste del golfo de México. Un total de 23 corales escleractinios se han reportado afectados con el SLO (Tabla 1), sin embargo, las especies más susceptibles y con tendencia a la pérdida de tejido son los complejos de *Orbicella (annularis, franksi y faveolata)*, *Stephanocoenia intercepta*, *S. michelinii* y *Siderastrea siderea*.

Tabla I. Lista de especies afectadas por el síndrome de lunares oscuros.

Especie	Referencia
<i>Agaricia agaricites</i>	Garzón-Ferreira <i>et al.</i> , 2001; Weil, 2004; Renegar <i>et al.</i> , 2008
<i>Colpophyllia natans</i>	Garzón-Ferreira <i>et al.</i> , 2001; Weil, 2004
<i>Colpophyllia amaranthus</i>	Weil, 2004
<i>Dichocoenia stellaris</i>	Weil, 2004
<i>Dicochoenia stockesii</i>	Weil, 2004; Porter <i>et al.</i> , 2011
<i>Diploria labyrinthiformis</i>	Garzón-Ferreira <i>et al.</i> , 2001; Weil, 2004
<i>Isophyllastrea rígida</i>	Garzón-Ferreira <i>et al.</i> , 2001
<i>Meandrina meandrites</i>	Garzón-Ferreira <i>et al.</i> , 2001

<i>Meandrina memorialis</i>	Weil, 2004
<i>Montastraea annularis</i>	Solano <i>et al.</i> , 1993; Garzón-Ferreira <i>et al.</i> , 2001; Gil-Agudelo <i>et al.</i> , 2007; Porter <i>et al.</i> , 2011
<i>Montastraea cavernosa</i>	Garzón-Ferreira <i>et al.</i> , 2001; Weil, 2004; Porter <i>et al.</i> , 2011
<i>Montastraea franksi</i>	Weil, 2004; Porter <i>et al.</i> , 2011
<i>Montastraea faveolata</i>	Garzón-Ferreira <i>et al.</i> , 2001; Gil-Agudelo <i>et al.</i> , 2007; Porter <i>et al.</i> , 2011
<i>Montipora sp</i>	Work <i>et al.</i> , 2008
<i>Pavona maldivensis</i>	Work <i>et al.</i> , 2008
<i>Pavona varians</i>	Work <i>et al.</i> , 2008
<i>Psammocora nierstraszi</i>	Work <i>et al.</i> , 2008
<i>Siderastrea radians</i>	Weil, 2004;
<i>Siderastrea siderea</i>	Cervino <i>et al.</i> , 2001; Garzón-Ferreira <i>et al.</i> , 2001; Weil, 2004; Gochfeld <i>et al.</i> , 2006; Gil-Agudelo <i>et al.</i> , 2007; Porter <i>et al.</i> , 2011; Renegar <i>et al.</i> , 2008
<i>Solenastrea bournoni</i>	Weil, 2004
<i>Stephanocoenia michelinii</i>	Cervino <i>et al.</i> , 2001; Nugues y Bak, 2007; Porter <i>et al.</i> , 2011
<i>Stephanocoenia intersepta</i>	Garzón-Ferreira <i>et al.</i> , 2001; Weil, 2004; Sweet <i>et al.</i> , 2013

2.2.2 Prevalencia y tasa de pérdida de tejido

El primer estudio cuantitativo de colonias afectadas por el síndrome de lunares oscuros (SLO) fue realizado por Gil-Agudelo y Garzón-Ferreira, (2001) en el Parque Nacional Tayrona, en Colombia, registrando el 16% de colonias de *Orbicella annularis* y *Siderastrea siderea* con signos característicos ($n = 9398$). Particularmente en *S. siderea* se han registrado prevalencias de 56%, 53% y 43% en las Islas Turcas y Caicos ($n = 897$), Bonaire ($n = 1297$) y Granada ($n = 882$) respectivamente (Cervino *et al.* 2001). Estudios en Dominica mostraron que de 121 colonias el 100% contenía signos característicos del síndrome (Borger, 2003), resultados similares a los obtenidos por Gochfeld *et al.* (2006) en las Bahamas, en donde la prevalencia oscilo de 0% a 100% durante un periodo de tres años (2002 al 2004). Reportes recientes en arrecifes de Florida y St. Kitts han registrado altas prevalencias del 71.2% ($n=514$) y 46.9% ($n = 912$) en corales *Stephanocoenia michelinii*, *O. annularis*, y *S. siderea* (Dorrestein *et al.*, 2020; Porter *et al.*, 2011). En el Sistema Arrecifal Lobos-Tuxpan, el SLO es el signo con mayor prevalencia afectando al menos ocho especies de coral (Jordán-Garza *et al.*, 2019), sin embargo, es más frecuente en colonias de *O.*

annularis y *S. siderea* (38%, n = 6862), dos especies de gran importancia en la región (García-Ayala, 2017, datos no publicados).

Normalmente, la pérdida de tejido en el SLO es baja. Estudios realizados por Borger, (2005) y Gochfeld *et al.* (2006) han reportado signos sobre el tejido del coral por años sin ningún cambio aparente. Además, en contraste con otras enfermedades coralinas se ha registrado en reiteradas ocasiones la recuperación de los tejidos afectados, así como la reubicación de los signos y lesiones a través del tejido coralino, variando en el tiempo, regiones y especies (Dorrestein *et al.*, 2020; Meyer *et al.*, 2016; Porter *et al.*, 2011). En diversos trabajos se ha registrado una pérdida de tejido relativamente baja con tasas entre $0.51 \text{ cm}^2/\text{mes}$ (Garcés-Baquero, citado de Gil-Agudelo *et al.*, 2004), $0.12 \text{ mm}^2/\text{día}$ (Borger, 2005) y $1\%/\text{año}$ ($N=3593 \text{ cm}^2 \pm 670$) (Porter *et al.*, 2011). No obstante, los estudios realizados por Cervino *et al.*, (2001) y Dorrestein *et al.* (2020) han registrado la degradación de los tejidos a tasas más aceleradas de $4 \text{ cm}^2/\text{mes}$ y $0.21 \pm 0.45 \text{ cm}^2/\text{día}$ respectivamente.

2.2.3 Etiología

Actualmente se desconoce la causa o agente etiológico que produce los signos y lesiones que caracterizan al síndrome de lunares oscuros (SLO). Estudios en la distribución de colonias afectadas en arrecifes de Dominica, mostraron patrones de agrupamiento sugiriendo que el SLO podría tratarse de una enfermedad infecciosa (Borger, 2003). Sin embargo, los experimentos de transmisión en laboratorio realizados por Randall *et al.*, (2016) utilizando fragmentos de *Siderastrea siderea* afectados por el SLO no lograron replicar los signos en fragmentos sanos, por contacto directo entre tejidos o de forma indirecta por el flujo del agua. De manera similar, el trabajo realizado por Muller y van Woesik, (2012) contrasta con la hipótesis de que el SLO pueda ser una enfermedad infecciosa, ya que, aunque se mostró el agrupamiento de colonias afectadas este no fue significativo a escalas locales (metros), en cambio, se observó una correlación entre el aumento de la temperatura superficial del mar y la aparición de las lesiones a una escala de varios kilómetros. Esto se ha observado en diversos estudios en donde la aparición de los signos característicos del SLO ocurre en los meses más cálidos del año (Borger, 2005; Porter *et al.*, 2011), sin embargo, esta correlación no siempre es significativa (Gochfeld *et al.* 2006).

Existen estudios que han observado diferencias tanto en la estructura de las zooxantelas como en la de los tejidos afectados en diferentes especies de corales que sugiere que el SLO podría

tratarse de distintos padecimientos que desarrollan un mismo patrón de lesión (Cervino *et al.*, 2001; Renegar *et al.*, 2008). En ese sentido, Cervino *et al.* (2001) mostraron que en colonias afectadas de *Stephanocoenia michelinii* existía la presencia de filamentos oscuros dentro de la matriz celular de las zooxantelas además de una pigmentación oscura del esqueleto. Estas características no estaban presentes en colonias de *S. siderea* afectadas, que generalmente contenían zooxantelas hinchadas y rotas internamente con un ligero incremento en la pigmentación. Por otra parte, los análisis histológicos realizados por Renegar *et al.* (2008) mostraron que en los tejidos de *S. siderea* afectados, existía la presencia de hifas fúngicas morfológicamente similares al género *Aspergillus*, mientras que en tejidos afectados de *Agaricia agaricites* había un gran número de células endolíticas adyacentes al calicodermis del coral sin la aparente presencia de hifas. Otros estudios histológicos también han observado hifas fúngicas en tejidos y calicodermis de corales afectados con el SLO (Galloway *et al.*, 2007; Work *et al.*, 2008b), sin embargo, no se identificaron los géneros o especies.

2.3 Identificación de microorganismos en corales sanos y afectados por el síndrome de lunares oscuros.

2.3.1 Métodos basados en cultivos

Solo existe un caso de la aplicación de los postulados de Koch para el síndrome de lunares oscuros (SLO) realizado por Gil-Agudelo *et al.*, (2007). En este estudio se cultivaron e identificaron mediante la secuenciación parcial del gen rDNA 16S, las bacterias presentes en la capa de moco superficial de *Orbicella faveolata*, *O. annularis* y *Siderastrea siderea* sanos y afectados por el SLO, tomando adicionalmente muestras de agua de mar para su comparación. Se caracterizaron un total de 243 cepas bacterianas que finalmente se agruparon en 17 grupos metabólicos. Los resultados mostraron que el género *Aeromonas* fue más abundante en muestras de agua de mar. Por otra parte, géneros como *Pseudomonas*, *bathycetes*, *Burkholderia* y *Flavimonas* se asociaron particularmente a *O. faveolata* y *O. annularis* sanos, mientras que en *S. siderea* sanos fueron frecuentes grupos de *Alteromonas*, *Yersinia*, *Kingella* y *Vibrio*. *Enterobacter*, *Serratia*, *Klebsiella* y *Vibrio* fueron mayormente abundantes en todas las muestras de corales afectados. Únicamente se cultivaron colonias de *Vibrio carchariae* en muestras de *S. siderea* y principalmente en *O. annularis* afectados por el SLO. Estas cepas posteriormente fueron aisladas y utilizadas en experimentos de

trasmisión mediante partículas de arena inoculadas, sin embargo, los resultados no mostraron la aparición de lesiones en el tejido de corales sanos.

2.3.2 Métodos independientes de cultivos

Sweet *et al.*, (2013) fueron los primeros en utilizar bibliotecas de clones de genes rRNA 16S y regiones ITS fúngicas para identificar los hongos y bacterias presentes en *Stephanocoenia intersepta* sanos y afectados por el síndrome de lunares oscuros (SLO). Sus resultados mostraron diferencias significativas entre las bacterias y los hongos presentes en corales sanos, aparentemente sanos y en distintos tamaños de lesión (pequeña, mediana, y grande). Bacterias como *Burkholderia*, *Pseudomonas* y *Parvibaculum* se encontraron presentes en muestras de corales sanos. Patógenos relacionados con otras enfermedades coralinas como *Vibrio harvey* estuvieron presentes tanto en muestras sanas como en muestras de corales afectados por el SLO. Cuatro géneros bacterianos (*Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Parvularculaceae* y *Oscillatoria*) estuvieron ausentes de muestras de corales sanos, incrementando su abundancia en muestras aparentemente sanas y siendo dominantes en muestras de corales afectados. En cuanto a hongos, se identificaron especies como *Tritirachium sp*, *Cryptococcus sp*, *Malasseziales sp* y *A. sydowii* en corales sanos y afectados. Únicamente el hongo terrestre *Rhytisma acerium* relacionado con la aparición de manchas oscuras en las hojas de los árboles se encontró en corales con el SLO.

En contraste, diversos estudios no han hallado diferencias significativas en la composición bacteriana en corales sanos y afectados por el SLO (Kellogg *et al.*, 2014; Meyer *et al.*, 2016; Randall *et al.*, 2016). Estudios realizados por Kellogg *et al.* (2014) mediante el uso de micromatrices PhyloChip G3, mostraron que bacterias de las familias Aquabacteriaceae, Bacillaceae, Comamonadaceae, Corynebacteriaceae, Enterobacteriaceae, Flavobacteriaceae y Lachnospiraceae tuvieron mayor abundancia tanto en estados de salud como de enfermedad en el coral *Siderastrea siderea*. Por otro lado, la familia Vibronaceae varió su abundancia, apareciendo ligeramente con mayor frecuencia en algunas muestras de corales afectados. Por su parte, Randall *et al.*, (2016) secuenciaron el gen rRNA 16S en la región hipervariable V1-V3 en *S. siderea*. Sus resultados mostraron cinco clases de bacterias (Alphaproteobacteria, Clostridia, Flavobacteriia, Gammaproteobacteria y Planctomycetia) con la misma abundancia en colonias sanas y afectadas por el SLO. Sin embargo, nueve taxones fueron significativamente más abundantes en corales afectados (Alteromonas,

Aquabacterium, Arthrobacter, Bermanella, Haliscomenobacter, Litoreibacter, Oscillatoriiales, Pseudomonas y Sorangiineae). Finalmente, el trabajo realizado por Meyer *et al.* (2016) mostró que en colonias de *O. annularis* y *O. faveolata* sanas y afectadas por el SLO, la abundancia relativa bacteriana estuvo representada por Gammaproteobacterias, principalmente por géneros como *Holomonas*, *Moritella* y *Pseudomonas*, identificando de igual manera patógenos potenciales como *Roseofilum reptotaenium* (relacionado con la enfermedad de la banda negra, BBD por sus siglas en inglés) en ambos tipos de muestra.

III. Objetivos

3.1 Objetivo general:

Identificar las bacterias y hongos presentes en cultivos de muestras de moco del constructor arrecifal *Siderastrea siderea* con y sin el síndrome de lunares oscuros.

3.2 Objetivos particulares:

Realizar el cultivo de las muestras recolectadas en medios de agar marino y agar Sabouraud.

Caracterizar las colonias bacterianas y fúngicas obtenidas de los cultivos de acuerdo con su morfología y tinción.

Identificar los microorganismos presentes en los cultivos.

Comprobar mediante análisis estadísticos, diferencias significativas en las características de las colonias, morfología microbiana y especies entre las distintas muestras.

IV. Área de estudio

La región costera en el suroeste del golfo de México se caracteriza por tener una plataforma continental paralela a la costa que recorre desde el norte del estado de Tamaulipas, hasta los límites con Yucatán, México (Ortiz-Lozano *et al.* 2013). Al norte de esta plataforma frente a las localidades de Tuxpan y Tamiahua en Veracruz, se encuentra el Sistema Arrecifal Lobos-Tuxpan (SALT) decretado como Área de Protección de Flora y Fauna en el 2009 (DOF, 2009). El SALT se encuentra conformado por dos subsistemas con tres arrecifes cada uno (Figura 1). Al norte frente al municipio de Tamiahua se encuentran los arrecifes de Lobos, Medio y Blanquilla, mientras que, al sur frente al municipio de Tuxpan, se localizan los arrecifes Tuxpan, En medio y Tanhuijo (CONANP, 2014). Estos arrecifes se han desarrollado en un clima cálido subhúmedo, caracterizado por una temporada de secas en invierno y abundantes lluvias en verano y otoño. La temperatura superficial del mar en la región varía con temperaturas máximas en verano de 29°C, y un marcado descenso de la temperatura en invierno (23°C) provocado por vientos fríos del norte que impiden el flujo de agua cálida procedente del sureste (Salas-Pérez *et al.*, 2015).

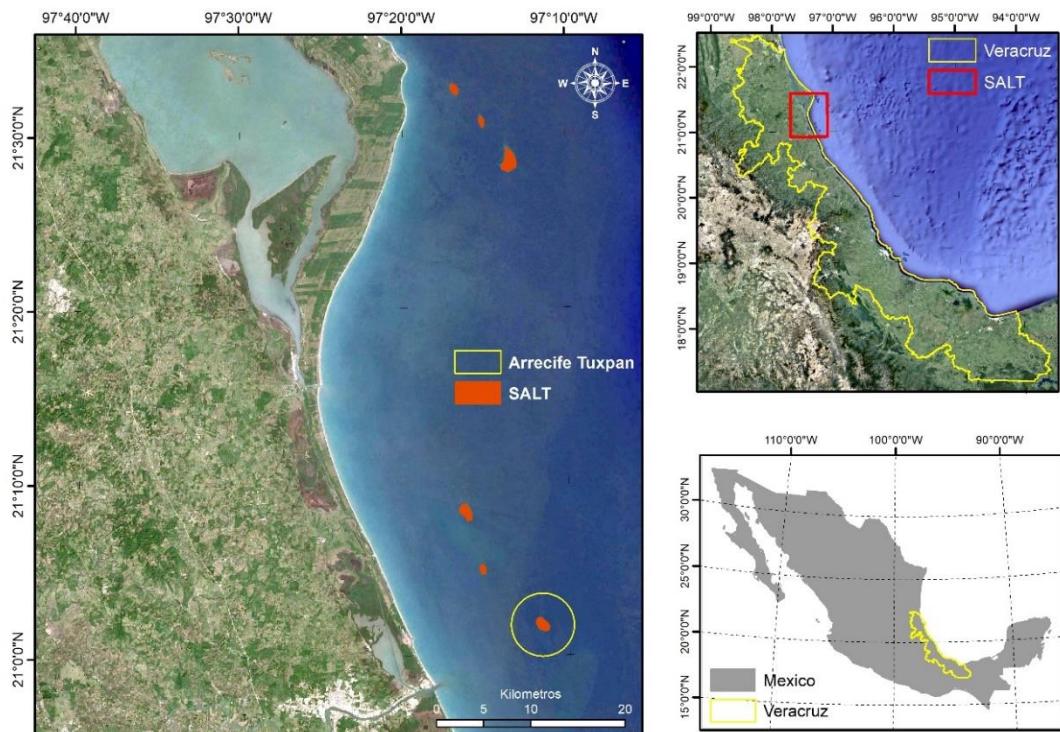


Figura 1. Localización del arrecife Tuxpan, dentro del Área de Protección de Flora y Fauna, Sistema Arrecifal Lobos-Tuxpan (APFF-SALT), Veracruz, México. Guzmán-López (2023).

El área de estudio (arrecife Tuxpan) se ubica al sur del SALT. Es una estructura de origen coralino de tipo plataforma que oscila entre los 0.5 y 27 m de profundidad. Al ser una estructura de tipo plataforma, presenta cuatro zonas arrecifales; la pendiente de sotavento que contiene cobertura coralina mayor al 20%, la pendiente de barlovento que se encuentra expuesta al oleaje, la laguna arrecifal en donde se desarrollan parches de pasto marino y la cresta arrecifal que delimita las pendientes (González-Gándara y Salas-Pérez, 2009). El arrecife se localiza a 12 km con dirección 60° NE partiendo de la desembocadura del río Tuxpan, en las coordenadas 21° 02' de latitud Norte, y 97° 12' de longitud Oeste (Calle-Triviño y Martos-Fernández, 2014) (Figura 1). Particularmente el arrecife Tuxpan se encuentra en un ambiente de alto contenido terrígeno trasportado por el río Tuxpan, característica que se incrementa durante la temporada de lluvias y nortes y que ha moldeado a las especies de coral que se desarrollan ahí (Jordán-Garza *et al.*, 2017; Salas-Pérez *et al.*, 2023). Se han reportado un total de 36 especies de corales escleractinios para este arrecife (González-Gándara y Salas-Pérez, 2009), con géneros como *Acropora*, *Orbicella*, *Agaricia*, *Porites*, *Oculina*, *Montastraea* y *Siderastrea* por mencionar algunos.

V. Material y métodos

5.1 Toma de muestras

Empleando equipo SCUBA, en abril de 2022 se extrajeron muestras triplicadas de mucosa de tres colonias de *Siderastrea siderea* sanas y de tres colonias con signos característicos del síndrome de lunares oscuros (SLO) en el arrecife Tuxpan, al sur del APFF-SALT en Veracruz, México. La toma de muestras se llevó a cabo mediante jeringas estériles sin aguja de 5 ml que se frotaron ligeramente contra el coral para posteriormente succionar el moco expulsado siguiendo métodos similares a los empleados por Meyer *et al.* (2019). Adicionalmente, se tomaron dos muestras de agua de mar en puntos cercanos a las colonias muestreadas para su estudio y comparación como se describe en Gil-Agudelo *et al.* (2007). Todas las muestras recolectadas se colocaron en recipientes con hielo y se trasladaron al laboratorio para realizar los cultivos.

5.2 Análisis de laboratorio

5.2.1 Cultivo y caracterización de las colonias microbianas

Una vez en el laboratorio, cada muestra dentro de las jeringas se homogeneizó a través de agitación manual y posteriormente se vació la mitad del contenido (2.5 ml aproximadamente) en tubos BD vacutainer esterilizados previamente con luz ultravioleta. Los cultivos se hicieron tomando las muestras directamente de los tubos con un asa esterilizada al fuego mediante un mechero, realizando estriados en cajas Petri previamente preparadas con agar marino (55.1g/1000ml) y agar Sabouraud (65g/1000ml), siguiendo protocolos establecidos por Reynoso *et al.* (2015) y Rojas-Triviño. (2011). Las cajas Petri inoculadas se incubaron a una temperatura de 30°C durante un periodo de 5 días para bacterias (modificado de Kushmaro *et al.*, 1997) y 30 días para hongos (modificado de Keral *et al.*, 2019).

Las colonias bacterianas se caracterizaron de acuerdo a su forma, borde, superficie, pigmentación, consistencia y comportamiento a la luz siguiendo guías descritas por Vargas-Flores, (2014) y Reynoso *et al.* (2015). Las tinciones de Gram se realizaron tomando una pequeña muestra de las colonias cultivadas en el agar marino, extendiéndola sobre un portaobjetos y fijándola con calor. Los frotis se cubrieron con violeta de genciana por un minuto y se escurrieron sin enjuagar, posteriormente se cubrieron con solución yodo gran por un minuto, se lavaron con solución acetona para decolorar por 15 segundos y enseguida se

enjuagaron para remover los restos de colorante, finalmente los frotis se cubrieron con colorante de safranina durante un minuto y se enjuagaron reiteradas veces con agua destilada para su observación (López-Jácome *et al.*, 2014; Lynch *et al.*, 1987). Todas las tinciones se observaron mediante un microscopio óptico bajo un aumento de 100x. Las colonias fúngicas se describieron de acuerdo a los trabajos realizados por Queiroz-Brito *et al.* (2022) y Treviño-Rangel (2011) y se tiñeron con azul de lactofenol, sin embargo, mientras que para los hongos filamentosos se realizaron improntas, mediante la adhesión de las estructuras celulares a una cinta adhesiva, para las colonias levaduriformes una pequeña muestra de la colonia se extendió en un portaobjetos, se secó al calor y se cubrió con azul de algodón por un tiempo mínimo de 15 minutos (modificado de López-Jácome *et al.*, 2014).

5.2.2 Extracción, amplificación y secuenciación del ADN genómico ARNr 16S y 18S

Para la extracción del ADN se tomaron muestras de las diferentes colonias microbianas cultivadas y se depositaron en tubos eppendorf con alcohol al 70% para su análisis en el Centro de Medicina Tropical en la ciudad de México. Cada muestra se colocó en 500 μ l de una solución de resina quelante Chelex-100 (BioRad®) al 10% (muestras < 2 mm) y al 30% (muestras > 2 mm) agregando adicionalmente 20 μ l de proteinasa siguiendo los métodos establecidos por Aguilar-Domínguez *et al.* (2019). Todas las muestras se incubaron durante 12 horas en un thermoblock a 56°C para eliminar los posibles inhibidores de la PCR y aumentar la degradación de las proteínas.

La amplificación del ADN genómico ARNr 16S, se realizó mediante una mezcla de reacción de 25 μ l, que contenía 5 μ l de cada muestra de ADN, 5.5 μ l de agua libre de nucleasas, 12.5 μ l de GoTaq Green Master Mix y 1 μ l de cada cebador. La diversidad de genes rRNA 16S bacterianos se amplificó utilizando los cebadores EHR16SD (5'-GTAATCGTGGATCATCATGC-3') y EHR16SR (5'-TAGCACTCATCGTTACAGC-3'). Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador realizando 29 ciclos a 72°C durante 20 segundos, seguido de 30 ciclos a 94°C durante 15 segundos, 30 ciclos a 57°C durante 15 segundos, 30 ciclos a 72°C durante 20 segundos, con una extensión final a 72°C durante 7 minutos (Martínez-Hernández *et al.*, 2019).

Por otra parte, el gen genómico ARNr 18S se amplificó utilizando los oligonucleótidos 18S965 (5'-GGCGATCAGATAACGCCCTAGTT-3') y 18S 1573R (5'-

TACAAAGGGCAGGG ACGTAAT-3') (Mullin *et al.*, 2005) desnaturalizando inicialmente a 98°C durante 85 segundos, seguido de 35 ciclos a 98°C durante 15 segundos, 61°C durante 15 segundos y 72°C durante 15 segundos, con una extensión final a 72°C durante 5 minutos. Los productos de la PCR se volvieron a amplificar en una nueva mezcla de reacción de 25 µl que contenía 2 µl de cada amplificación, 8.5 µl. de agua libre de nucleasas, 12.5 µl. de GoTaq Green Master Mix y 1 µl de cada cebador. La pureza del ADN obtenido se midió por el método de la absorbancia, para la relación entre el material genético y la proteína presente con un Nanodrop Thermo Fisher 300.

5.2.3 Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE)

La electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante se llevó a cabo en geles de agarosa al 2% con un voltaje constante de 116 V durante 40 min utilizando el marcador de ADN Gene Ruler™ Ladder de 100 pb (Thermo Fisher Scientific). Los geles se tiñeron con flourocromo Syto 60 y se visualizaron usando un transiluminador UV (UVI Tec©; Cambridge, Reino Unido). La coincidencia de las secuencias encontradas se determinó mediante la herramienta BLAST en la página de National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Todas las secuencias y los códigos de acceso obtenidos se informan más adelante en el documento.

5.3 Análisis estadístico

Las características morfológicas de las colonias bacterianas y fúngicas se agruparon mediante un análisis clúster con distancia de Bray-Curtis. Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para observar la ordenación de las características de las colonias cultivadas y la morfología microbiana a través de los distintos estados de salud coralino y el agua de mar. Para determinar diferencias significativas en las características morfológicas de las colonias cultivadas, la morfología microbiana y las especies identificadas entre los distintos estados de salud de los corales y el agua de mar se realizó un análisis de similitud (ANOSIM) de una vía con una corrección de Bonferroni. Finalmente, para identificar las características que contribuyeron de mayor manera a las diferencias/similitudes entre los distintos estados de salud del coral y el agua de mar se llevó a cabo un análisis de porcentaje de similitud (SIMPER) con distancia de Bray-Curtis. Todos los análisis se realizaron mediante el programa Past versión 4.05.

VI. Resultados

6.1 Descripción de los ensamblajes bacterianos

Se contabilizaron un total de 78 colonias bacterianas sobre el agar marino (CS = 44, CE = 27 y AM = 7) (Ver anexo). De acuerdo a las características morfológicas de las colonias bacterianas, el análisis de conglomerados con índice de Bray-Curtis, formó 37 grupos o colonias distintas tomando como valor de referencia el 100% de similitud (Figura 2). Se observó un mayor número de colonias bacterianas en los cultivos de muestras de moco de corales sanos ($n = 23$), comparado con los cultivos de muestras de moco de corales afectados con el síndrome de lunares oscuros (SLO) ($n = 16$) y de agua de mar ($n = 6$). El análisis de conglomerados no formó agrupamientos entre las diferentes colonias bacterianas y los distintos tipos muestras (coral sanos, coral con SLO y agua de mar).

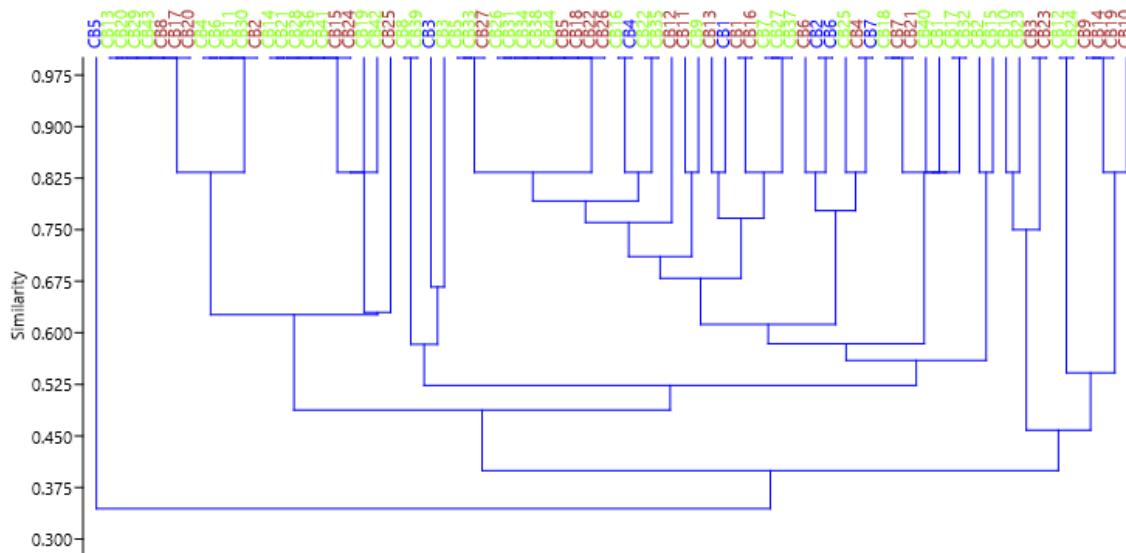


Figura 2. Análisis de conglomerados. Muestra el índice de similitud (Bray-Curtis) entre las distintas colonias bacterianas presentes en cultivos de muestras de corales sanos (verde), afectados por el SLO (rojo) y de agua de mar (azul).

Un análisis de componentes principales (PCA) explicó en el primer factor el 21.3% de la varianza y mostró una disimilitud en la ordenación entre las colonias caracterizadas por una consistencia lisa, superficie elevada y bordes enteros de aquellas con una pigmentación blanca, consistencia mucoide, superficie deprimida o convexa y bordes difusos (Figura 3). El segundo factor explicó el 16.5% de la varianza y mostró una disimilitud entre colonias con una pigmentación blanca, consistencia mucoide, superficie convexa y bordes enteros de aquellas con formas lisas, elevadas o deprimidas con bordes difusos (Figura 3). Un análisis

de similitud (ANOSIM) con un ajuste de Bonferroni no encontró significativas las diferencias entre las características morfológicas de las colonias bacterianas y las distintas muestras (coral sano, afectado con el SLO y agua de mar) ($R = 0.01$, $p = 0.3$).

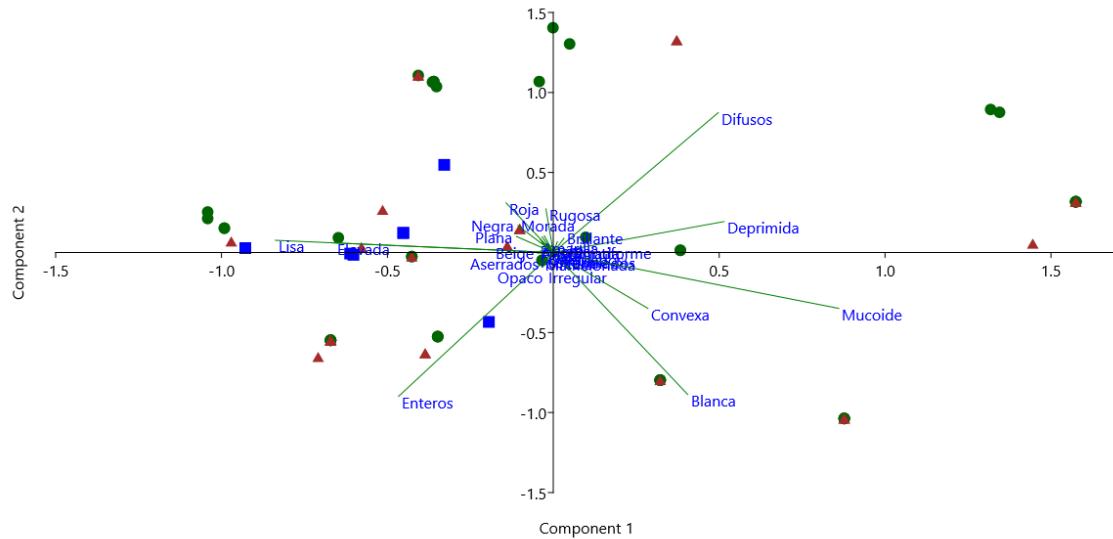


Figura 3. PCA de las características morfológicas de las colonias bacterianas. Muestra la ordenación en corales sanos (círculos verdes), corales afectados por el SLO (triángulos rojos) y agua de mar (cuadrados azules).

La morfología bacteriana estuvo constituida por ocho tipos de bacterias que incluyeron principalmente cocos Gram positivos con formas que variaron en diplococos, estafilococos y estreptococos y bacilos Gram positivos y Gram negativos, estos últimos a su vez variaron en formas de diplobacilos y estreptobacilos Gram negativos (Ver anexo). El análisis de componentes principales (PCA) mostró una ligera ordenación entre la morfología bacteriana y los distintos tipos de muestras. El primer factor que explicó el 32% de la varianza de los datos, mostró que bacterias con formas de cocos, estafilococos y estreptococos Gram positivos se presentaron con mayor frecuencia en cultivos de muestras de corales enfermos, en cambio, bacterias con formas de bacilos y estreptobacilos Gram negativos fueron más abundantes en cultivos de muestras de corales sanos. Un análisis de similitud (ANOSIM), refutó estas diferencias como significativas ($R = 0.1$, $p = 0.001$), aunque el valor de R fue bajo, indicando una alta superposición de las formas bacterianas entre los distintos tipos de muestras. Un análisis (SIMPER) mostró que las bacterias con formas de cocos y estreptococos Gram positivos fueron abundantes en muestras de agua de mar (24.16%) y

corales afectados con el SLO, mientras que, la abundancia de bacilos Gram negativos fue mayor en muestras de corales sanos (19.63%).

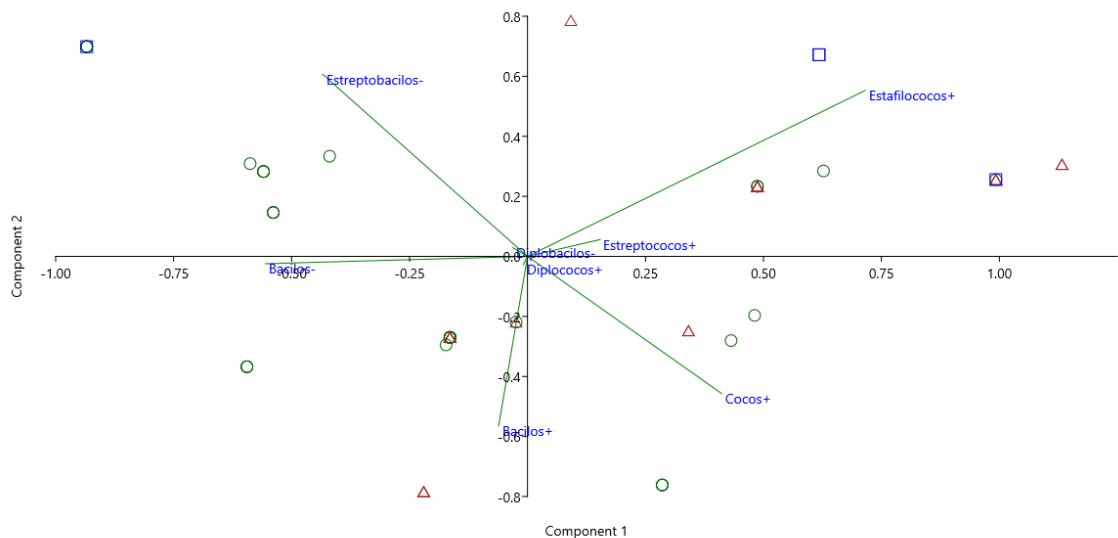


Figura 4. PCA de la morfología bacteriana. Muestra la ordenación en corales sanos (círculos verdes), corales afectados por el SLO (triángulos rojos) y agua de mar (cuadrados azules).

Tabla 2. Análisis de similitud SIMPER de la presencia/ausencia de la morfología bacteriana en agar marino.

Características de las colonias	Promedio de disimilitud	% de contribución	% Acumulativo	Abundancia CS	Abundancia CE
Estafilococos+	9.897	24.16	24.16	0.132	0.48
Bacilos-	8.04	19.63	43.79	0.868	0.72
Cocos+	7.207	17.59	61.38	0.711	1
Estreptobacilos-	5.63	13.74	75.13	0.263	0.04
Bacilos+	5.486	13.39	88.52	0.184	0.12
Estreptococos+	3.804	9.286	97.8	0.105	0.12
Diplococos+	0.4887	1.193	99	0.0263	0
Diplobacilos-	0.4112	1.004	100	0.0263	0

6.1.1. Bacterias identificadas por PCR

Un total de 21 bacterias se identificaron a nivel de género y especie en los cultivos de muestras de moco de corales sanos ($n = 13$) y afectados por el SLO ($n = 8$), sin embargo, no se lograron identificar a las bacterias presentes en los cultivos de agua de mar. De forma general, en cultivos de muestras de corales sanos se identificaron especies como *Bacillus subtilis* (KF135455.1), *Enterobacter sp.* (HM075077.1) y *Leclercia sp.* (CP031104.1), no obstante, bacterias del género *Vibrio* fueron mayormente abundantes (47% $n = 10$). Dentro del grupo central *Vibrio*, dos especies (No. de acceso de GenBank, MW281457.1 y KC534399.1) coincidieron arriba del 98% con los patógenos de coral *Vibrio harveyi* y *Vibrio rotiferianus*. Por otra parte, en muestras de corales afectados se identificaron especies como *Citrobacter werkmanii* (CP044101.1), *Escherichia coli* (MG098987.1), y *Proteus mirabilis* (CP053614.1), aunque el género *Providencia* fue el más abundante (23.8% $n = 5$) e incluyó especies como *Providencia stuartii* y *Providencia vermicola*. Un análisis de similitud (ANOSIM) mostró diferencias significativas entre las especies presentes en los distintos estados de salud del coral ($R = 1$, $p = 0.0004$).

Tabla 3. Especies bacterianas identificadas de los cultivos de muestras de corales sanos, afectados con el SLO, y agua de mar

Género o especie	% de similitud	No. De Acceso	Coral sano	Coral Enfermo
<i>Bacillus subtilis</i>	99.59%	KF135455.1	X	
<i>Citrobacter werkmanii</i>	98.58%	CP044101.1		X
<i>Enterobacter sp.</i>	99.38%	HM075077.1	X	
<i>Escherichia coli</i>	100.00%	MG098987.1		X
<i>Leclercia sp.</i>	99.16%	CP031104.1	X	
<i>Proteus mirabilis</i>	100.00%	CP053614.1		X
<i>Providencia sp.</i>	100.00%	JQ912597.1		X
<i>Providencia stuartii</i>	97.94%	MN733989.1		X
<i>Providencia stuartii</i>	98.59%	CP048621.1		X
<i>Providencia stuartii</i>	98.77%	MK993518.1		X
<i>Providencia vermicola</i>	100.00%	CP048796.1		X
<i>Vibrio sp.</i>	97.90%	EF584059.1	X	
<i>Vibrio sp.</i>	98.20%	MK533457.1	X	

<i>Vibrio sp.</i>	97.80%	GU373054.I	X	
<i>Vibrio sp.</i>	98.34%	HM032337.I	X	
<i>Vibrio sp.</i>	97.77%	KM216248.I	X	
<i>Vibrio sp.</i>	97.35%	GQ406754.I	X	
<i>Vibrio harveyi</i>	98.38%	MW281457.I	X	
<i>Vibrio hyugaensis</i>	98.55%	MT269638.I	X	
<i>Vibrio rotiferianus</i>	100.00%	KC534399.I	X	
<i>Vibrio thalassae</i>	96.33%	HF541971.I	X	

6.2 Descripción de los ensamblajes fúngicos

Se contabilizaron un total de 13 colonias fúngicas que se desarrollaron en agar marino y agar Sabouraud (Ver anexo). De acuerdo las características morfológicas de las colonias fúngicas el análisis de conglomerados formó 11 colonias distintas (100% de similitud) (Figura 5). Cinco colonias se desarrollaron en cultivos de muestras de corales sanos, siete en cultivos de muestras de corales afectados por el SLO y solo una en cultivos de agua de mar. Dos colonias fúngicas se desarrollaron en medios de agar marino, la colonia uno (CF1) proveniente de una muestra de agua de mar y la colonia tres (CF3) proveniente de una muestra de coral afectado por el SLO.

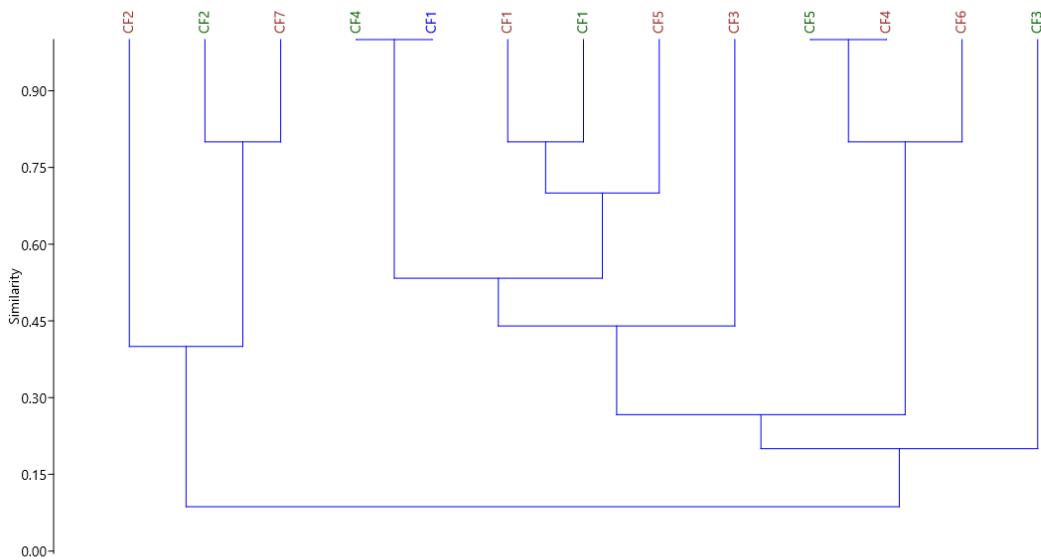


Figura 5. Análisis de conglomerados. Muestra el índice de similitud (Bray-Curtis) entre las distintas colonias fúngicas presentes en cultivos de muestras de corales sanos (verde), afectados por el SLO (rojo) y de agua de mar (azul).

El análisis de conglomerados no formó agrupaciones entre las características morfológicas de las colonias fúngicas y los distintos estados de salud del coral y el agua de mar. Un par de colonias coincidieron en un 100% con sus características morfológicas, estas fueron las colonias cuatro y uno presentes en cultivos de coral sano y agua de mar y las colonias cinco y cuatro cultivadas de muestras de coral sano y afectado respectivamente. Las demás colonias no compartieron características por lo que fueron únicas entre los distintos tipos de muestra (coral sano, afectado con el SLO y agua de mar). Un análisis de componentes principales (PCA) mostró en los primeros dos componentes (54.5% de la varianza), diferencias en la ordenación entre colonias caracterizadas por texturas filamentosas y superficies (micelio) aéreas, de aquellas colonias cremosas, con superficies elevadas de formas irregulares y bordes ondulados y con formas circulares, texturas lisas, superficie convexa y bordes enteros bien definidos.

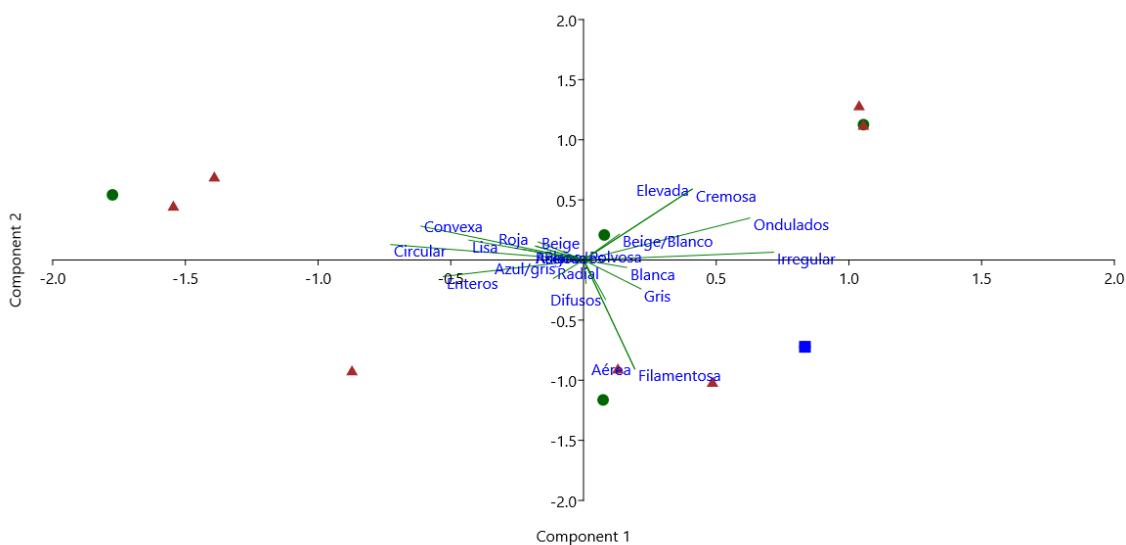


Figura 6. PCA de las características morfológicas de las colonias fúngicas. Muestra la ordenación en corales sanos (círculos verdes), corales afectados por el SLO (triángulos rojos) y agua de mar (cuadrados azules).

6.2.1. Hongos identificados por PCR

Se identificaron un total de ocho colonias fúngicas a nivel de especie y una a nivel de clase en cultivos de muestras de moco de corales sanos y afectados por el SLO. Una colonia fúngica presente en agar marino se identificó (No. de acceso de GenBank, JF497107.1), pero no pudo ser clasificada. En los cultivos de muestras de corales sanos se identificó únicamente la levadura *Candida orthopsis* (KY118181.1), mientras que especies como *Nigrospora* sp. (MN180886.1), y *C. parapsilosis* (MZ572966.1) se encontraron en ambos estados de salud coralino. Finalmente, en cultivos de muestras de corales afectados con el SLO se identificaron especies como *Sordariomycetes* sp. (OM510427.1) y *Colletotrichum gloeosporioides* (MH051036.1), este último, causante de la Antracnosis en diversas plantaciones comerciales a nivel mundial. Debido a los pocos datos obtenidos no se pudo realizar un análisis estadístico para refutar diferencias en las especies identificadas.

Tabla 4. Especies fúngicas identificadas de los cultivos de muestras de corales sanos, afectados por el SLO, y agua de mar.

Género o especie	Muestra	% de similitud	No. De Acceso	Coral sano	Coral Enfermo	Agua de Mar
<i>Candida orthopsis</i>	CS.I.2.CF2	99.80%	KY118181.1	X		
<i>Candida parapsilosis</i>	CS.3.3.CF5	99.60%	MZ572966.1	X		
<i>Candida parapsilosis</i>	CE.2.2.CF4	99.80%	MZ572966.1		X	
<i>Candida parapsilosis</i>	CE.3.2.CF7	99.80%	MZ572966.1		X	
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .	CE.I.3.CF3	85.12%	MH051036.1		X	
Hongo sin identificar	AM.I.I.CFI	89.93%	JF497107.1			X
<i>Nigrospora</i> sp.	CS.I.I.CFI	99.80%	MN180886.1	X		
<i>Nigrospora</i> sp.	CE.I.I.CFI	Identificado por características morfológicas.			X	
<i>Sordariomycetes</i>	CE.I.3.CF2	98.61%	OM510427.1		X	

VII. Discusión

A pesar de que el síndrome de lunares oscuros (SLO) no está asociado a una rápida degradación del tejido coralino como sucede en otras enfermedades (por ejemplo, la enfermedad de pérdida de tejido de coral duro o SCTLD por sus siglas en inglés) (Alvarez-Filip *et al.*, 2022), tiene altas prevalencias en diversos arrecifes del Atlántico occidental, incluyendo el Sistema Arrecifal Lobos-Tuxpan (Jordán-Garza *et al.*, 2019). Se han identificado cambios en la microbiota de corales afectados con el SLO que incluyen diversos patógenos bacterianos y fúngicos (Gil-Agudelo *et al.* 2007; Sweet *et al.*, 2013), sin embargo, esto no siempre es consistente (Kellogg *et al.*, 2014; Meyer *et al.*, 2016), por lo que es importante seguir investigando sobre su etiología. Los resultados del presente estudio coinciden con los reportados por Gil-Agudelo *et al.* (2007), al encontrar diferencias en las bacterias cultivables a partir de muestras de la capa de moco de *S. siderea* con y sin el SLO, no obstante, las especies identificadas fueron distintas y la diversidad y abundancia fue mucho menor. Esto último podría deberse a la incubación de las muestras, la cual se realiza generalmente entre los 24°C y 28°C por períodos de 48h a 96h (Patterson *et al.*, 2002; Ritchie, 2006), sin embargo, en este trabajo no pudieron modificarse estas condiciones incubando las muestras por 120h a 30°C, por lo que la viabilidad de las bacterias pudo ser inferior. De igual manera, la poca diversidad y abundancia podría ser el resultado de una baja resolución taxonómica de los cebadores empleados para diferenciar el gen ribosomal en las bacterias presentes.

7.1. Bacterias asociadas a *Siderastrea siderea* con y sin el síndrome de los lunares oscuros (SLO).

En este estudio, la mayoría de las bacterias identificadas en los cultivos realizados a partir de muestras de moco de corales sin el síndrome de lunares oscuros (SLO) pertenecieron al género *Vibrio* e incluyeron especies potencialmente patógenas como *V. harveyi* y *V. rotiferianus* implicadas en las enfermedades de la plaga blanca y la banda amarilla en diversas especies de coral (Cervino *et al.*, 2008; Croquer *et al.*, 2012; Luna *et al.*, 2010). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Chimetto *et al.* (2008) al aislar mayormente bacterias del grupo central *Vibrio* de corales *Mussismilia hispida*, *Zoanthus solanderi*, *Palythoa caribaeorum* y *P. variabilis*, sin embargo, con excepción de *V. harveyi* las especies aquí mencionadas difieren de las reportadas en otros estudios. Recientemente,

Dunphy *et al.* (2019) analizaron la estructura y estabilidad del microbioma de seis especies de coral pertenecientes a tres géneros en el mar Caribe. Sus resultados mostraron que las comunidades bacterianas asociadas a los corales dependen en gran medida del huésped (especie) a nivel local y varían en mayor grado, de acuerdo con la capacidad de dispersión, la distancia y la heterogeneidad ambiental. Esto podría explicar la diferencia en las especies identificadas en este y otros estudios (Gil Agudelo *et al.*, 2007; Sweet *et al.*, 2013). Aun así, patógenos como *V. harveyi* parecen ser constantes dentro del microbioma asociado al moco de coral.

En varios estudios se han cultivado y aislado Vibiones a partir de muestras de corales en estados de aparente salud mostrando que estos forman parte de la microbiota coralina en interacciones consideradas mutualistas (Munn, 2015). Un ejemplo es el trabajo realizado por Ritchie, (2006) en corales *Acropora palmata* en el que se mostró que dos cepas identificadas como *V. shilonii* y *V. harveyi* producían compuestos antibióticos de amplio espectro que inhibían el crecimiento de patógenos como *Bacillus subtilis* y *Salmonella typhimurium* en medios de control. Por su parte, Chimetto *et al.* (2008) mostraron que dos cepas genéticamente similares a *V. alginolyticus* y *V. harveyi* presentes en diversas especies de coral poseían una fuerte actividad nitrogenasa, sugiriendo que algunas especies de *Vibrio* incluyendo las patógenas, pueden desempeñar un roll positivo en la salud del coral al fijar nitrógeno en la capa superficial de moco. Sin embargo, estos *Vibrio* actúan como patógenos bajo condiciones ambientales en donde predomina una elevada temperatura del agua de mar y altas cargas de nutrientes, al superar y reemplazar a otras especies en el moco del coral mientras producen toxinas que dañan las zooxantelas, inhiben la fotosíntesis y causan daño tisular (Cervino *et al.*, 2008; Renegar *et al.*, 2008).

Estudios previos en arrecifes de Colombia y Puerto Rico han identificado a *V. carchariae* como posible patógeno causante del SLO aislándolo únicamente de corales *S. siderea*, *Orbicella annularis* y *O. faveolata* afectados (Gil-Agudelo *et al.*, 2007). No obstante, los experimentos para reproducir el SLO mediante la inoculación en campo de *V. carchariae* no fueron exitosos. Esto podría deberse a que las bacterias asociadas al moco del coral no solo son dinámicas en el espacio sino también en el tiempo, por lo tanto, para que la enfermedad ocurra debe de haber condiciones ambientales que favorezcan a los patógenos y a la infección (Rosenberg *et al.*, 2007; Rubio-Portillo *et al.*, 2014).

Por otra parte, bacterias del orden Enterobacterales, principalmente de la tribu Proteeae se asociaron a los cultivos realizados a partir de muestras de moco de corales afectados por el SLO con especies como *Proteus mirabilis*, *Providencia stuartii* y *P. vermicola*. Estos microorganismos forman parte del tracto intestinal de diversos animales incluyendo el humano, aunque también se encuentran de forma ubicua en el medio ambiente (Manos y Belas, 2006). Para el hombre, estas bacterias son consideradas patógenos oportunistas en personas con un sistema inmunitario deteriorado provocando infecciones como cistitis, bacteriemia y osteomielitis (O'Hara *et al.*, 2000; Drziewiecka, 2016). A menudo se consideran indicadores de contaminación fecal (Drziewiecka, 2016) y se han identificado en muestras de agua de mar en arrecifes y sustratos cercanos a la costa (Patterson *et al.*, 2002; Rubio-Portillo *et al.*, 2014), por lo que las especies aquí mencionadas podrían estar relacionadas con fuentes de contaminación como descargas de aguas residuales.

Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Patterson *et al.*, (2002) al identificar bacterias entéricas (*Serratia marcescens*) como las causantes de la viruela blanca en el coral *Acropora palmata*. Además, estudios recientes en acuarios han aislado e identificado mediante el ADN genómico ARNr 16S un consorcio bacteriano que incluye a *P. vermicola* en corales *Porites lutea* con la enfermedad de la banda blanca (Ahmed *et al.*, 2022). Descripciones previas de la comunidad bacteriana asociada al coral *S. siderea* con y sin signos del SLO en los parques de Dry Tortugas y Virgin Islands, han identificado a los géneros *Citrobacter sp.*, *Escherichia sp.*, y *Providencia sp.* junto con *Proteus mirabilis* en ambos estados de salud. No obstante, estos consorcios fueron mínimos comparados con otros como *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Aquabacterium* o *Vibrio* (Kellogg *et al.*, 2014). Estos resultados sugerirían que este consorcio bacteriano también podría estar implicado en el proceso de la enfermedad en corales de la región, sin embargo, es necesario corroborar la patogenicidad de las cepas identificadas en este estudio mediante los postulados de Koch.

7.2. Hongos asociados a *Siderastrea siderea* con y sin el síndrome de los lunares oscuros (SLO).

En reiteradas ocasiones se han observado estructuras fúngicas a través del tejido y calicodermis de corales afectados con el síndrome de lunares oscuros (SLO) (Galloway *et al.*, 2007; Work *et al.*, 2008b). Estudios histológicos en corales *Siderastrea siderea* afectados con el SLO han identificado estructuras fúngicas similares al género *Aspergillus* en zonas con degradación celular y necrosis de los tejidos (Renegar *et al.*, 2008). Sin embargo, también se ha identificado a *Aspergillus* como parte de la microbiota en corales sanos (Sweet *et al.*, 2013). Esto puede deberse a que los hongos tienen un papel fundamental en el microbioma coralino participando activamente en el ciclo del nitrógeno en relaciones comensales con sus huéspedes (Bourne *et al.*, 2016), cambiando ocasionalmente a conductas parasitarias debido a condiciones ambientales estresantes o por cambios en el microbioma coralino (Golubic *et al.*, 2005; Priess *et al.*, 2000). Los resultados de este estudio coinciden con trabajos anteriores (Sweet *et al.*, 2013) y muestran que las mismas especies fúngicas (*Nigrospora sp.* y *Candida parapsilosis*) se pueden encontrar en corales sanos y afectados por el SLO.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el estudio realizado por Espinoza *et al.* (2021) quienes identificaron a *Nigrospora sp.* de forma regular en corales *Acropora palmata* en el Sistema Arrecifal Veracruzano (SAV), en Veracruz, México. Esto sugeriría que las comunidades fúngicas marinas se distribuyen a escalas regionales posiblemente por factores ambientales como las corrientes marinas (Dunphy *et al.*, 2019). *Nigrospora sp.* también ha sido identificado en corales *Acropora tenuis* y *Stylophora pistillata* en el Mar Rojo, al norte de Egipto (El-Morsy *et al.*, 2017) y en *Sargassum portierianum* en África (Wong-Chin *et al.*, 2021) lo que demuestra una gran adaptabilidad de este hongo a medios marinos. En este estudio se identificó un hongo de la clase Sordariomycetes y a *Colletotrichum gloeosporioides* en cultivos de muestras de corales afectados por el SLO, este último, es un hongo fitopatógeno que ocasiona antracnosis, una enfermedad caracterizada por la aparición de manchas oscuras que necrosan el tallo, hojas y frutos de diversas plantas en la industria de la agricultura en regiones tropicales y subtropicales alrededor del planeta (Huerta-Palacios *et al.*, 2009). Esto resulta interesante debido a que Sweet *et al.* (2013) han propuesto a *Rhytisma acerinum*, otro hongo fitopatógeno causante de las manchas de alquitrán en hojas de arces, como un posible causante de las manchas oscuras en *Stephanocoenia intersepta*.

VIII. Conclusiones

En resumen, este estudio destaca el cambio en las bacterias cultivables asociadas al moco de corales *Siderastrea siderea* con y sin el síndrome de lunares oscuros (SLO). Los resultados obtenidos aquí muestran que el grupo central *Vibrio* forma parte de la microbiota en el moco de corales en aparente estado de salud en el arrecife Tuxpan, en Veracruz, México. Sin embargo, algunas de las especies identificadas en este estudio como *V. harveyi* y *V. rotiferianus* son agentes causales de otras enfermedades coralinas y es conocido que pueden deshacer las interacciones mutualistas con sus huéspedes en ambientes donde predominan altas temperaturas y cargas de nutrientes. Además, este estudio añade a bacterias de la tribu *Proteaceae* (*Proteus mirabilis*, *Providencia vermicola* y *providencia stuartii*) como patógenos posiblemente implicados en el desarrollo de la enfermedad. Esto sugeriría que la presencia de hongos fitopatógenos de origen terrestre asociados a corales con el SLO como *Rhytisma acerinum*, identificado en corales en Venezuela y *Colletotrichum gloeosporioides* identificado en este estudio, podría ser el resultado de un cambio en la microbiota bacteriana asociada, lo que comprometería las capacidades antimicrobianas del huésped coralino volviéndolo susceptible ante patógenos oportunistas.

Debido a la variación que existe en los microrganismos asociados a los corales es necesario continuar monitoreando el microbioma asociado a *S. siderea* con y sin signos del SLO en los arrecifes del Sistema Arrecifal Lobos-Tuxpan. Finalmente, cabe recalcar la importancia de continuar con las investigaciones identificando a los agentes causales mediante los postulados de Koch para patógenos potenciales como *Vibrio* o para aquellos que se asocien a los signos característicos del SLO, esto podría ayudar a las instituciones en el desarrollo de planes de manejo y restauración.

IX. Aplicación Práctica

Actualmente las poblaciones de corales formadores de arrecifes se encuentran en declive, siendo las enfermedades emergentes la causa de la disminución de un tercio de las poblaciones a nivel mundial (Raymundo *et al.*, 2008). De un aproximado de veinte enfermedades que afectan a los corales solo se ha encontrado el agente causal de siete (Rosenberg *et al.*, 2007). El conocimiento de los agentes causales en las enfermedades coralinas ha servido en gran medida para la implementación de acciones de manejo y mitigación (Atad *et al.*, 2012; Neely *et al.* 2020). Sin embargo, al desconocer los microorganismos implicados en la enfermedad a nivel local, las estrategias podrían estar mal enfocadas. Este estudio es el primero en aportar información acerca de la microbiota bacteriana y fúngica cultivable asociada al moco del coral *Siderastrea siderea* con y sin el SLO en el Área de Protección de Flora y Fauna, Sistema Arrecifal Lobos-Tuxpan (APFF-SALT). Esto enriquece aún más el conocimiento acerca de la dinámica de los microorganismos presentes en estados de aparente salud y enfermedad, formando parte de la línea base en la investigación en las enfermedades coralinas en la región. En conjunto con dependencias gubernamentales como la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP) esta información puede servir para futuros planes de manejo para esta y más enfermedades presentes en el APFF-SALT.

Para esto, es fundamental el monitoreo a largo plazo de las poblaciones de *Siderastrea siderea* y otras especies de coral para identificar a los microorganismos que forman parte del microbioma central y las especies que pudiesen estar implicadas en la aparición de las lesiones características del SLO y otras enfermedades dentro del APFF-SALT.

X. Referencias

- Aeby, G. S., Work, T. M., Runyon, C. M., Shore-Maggio, A., Ushijima, B., Videau, P., Beurmann, S. y Callahan, S. M. (2015). First record of black band disease in the Hawaiian Archipelago: response, outbreak status, virulence, and a method of treatment. *PLoS One*, 10 (3).
- Aguilar-Domínguez, M., Sánchez-Montes, S., Esteve-Gassent, M. D., Barrientos-Salcedo, C., de León, A. P., y Romero-Salas, D. (2019). Genetic structure analysis of *Amblyomma mixtum* populations in Veracruz State, Mexico. *Ticks and tick-borne diseases*, 10(1), 86-92.
- Ahmed, N., Mohamed, H. F., Xu, C., Sun, X., y Huang, L. (2022). Novel antibacterial activity of *Sargassum fusiforme* extract against coral white band disease. *Electronic Journal of Biotechnology*, 57, 12-23.
- Alvarez-Filip, L., González-Barrios, F. J., Pérez-Cervantes, E., Molina-Hernández, A., y Estrada-Saldívar, N. (2022). Stony coral tissue loss disease decimated Caribbean coral populations and reshaped reef functionality. *Communications Biology*, 5(1), 440.
- Anze, R., Franken, M., Zaballa, M., Pinto, M. R., Zeballos, G., Cuadros, M. D. L. Á., Canseco, A., Rocha, A., Estellano, V. H., y Del Granado, S. (2007). Bioindicadores en la detección de la contaminación atmosférica en Bolivia. *Revista virtual REDESMA*, 1, 53.
- Atad, I., Zvuloni, A., Loya, Y., & Rosenberg, E. (2012). Phage therapy of the white plague-like disease of *Favia* favus in the Red Sea. *Coral reefs*, 31, 665-670.
- Bellwood, D. R., Hughes, T. P., Folke, C., & Nyström, M. (2004). Confronting the coral reef crisis. *Nature*, 429(6994), 827-833.
- Ben-Haim, Y. y Rosenberg, E. (2002). A novel *Vibrio* sp. pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. *Marine Biology*, 141: 47-55.
- Borger, J. L. (2003). Three scleractinian coral diseases in Dominica, West Indies: distribution, infection patterns and contribution to coral tissue mortality. *Revista de Biología Tropical*, 51(4), 25-38.
- Borger, J. L. (2005). Dark spot syndrome: a scleractinian coral disease or a general stress response?. *Coral Reefs*, 24(1), 139-144.
- Bourne, D. G., Garren, M., Work, T. M., Rosenberg, E., Smith, G. W., y Harvell, C. D. (2009). Microbial disease and the coral holobiont. *Trends in microbiology*, 17(12), 554-562.
- Bourne, D. G., Morrow, K. M., y Webster, N. S. (2016). Insights into the coral microbiome: underpinning the health and resilience of reef ecosystems. *Annual review of microbiology*, 70, 317-340.
- Brown, B. E., y Bythell, J. C. (2005). Perspectives on mucus secretion in reef corals. *Marine Ecology Progress Series*, 296, 291-309.
- Burke, L. y Maidens, J. (2005). Arrecifes en peligro en el Caribe. World Resources Institute. Estados Unidos de América. 80 p.
- Bythell, J. C., y Wild, C. (2011). Biology and ecology of coral mucus release. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 408(1-2), 88-93.
- Calle-Triviño, J. y Martos-Fernández, F. J. (2014). Manual de métodos de monitoreo en sitios permanentes en arrecifes coralinos del Sistema Arrecifal Lobos-Tuxpan, Veracruz, México. 40 pp.
- Carricart-Ganivet, J. P., Beltrán-Torres, A. U., y Horta-Puga, G. (2011). Distribution and prevalence of coral diseases in the Veracruz Reef System, Southern Gulf of Mexico. *Diseases of aquatic organisms*, 95(3), 181-187.
- Castillo, I., Lodeiros, C., Nunez, M., y Campos, I. (2001). *In vitro* evaluation of antibacterial substances produced by bacteria isolated from different marine organisms. *Revista de biología tropical*, 49(3-4), 1213-1222.
- Cervino, J., Goreau, T. J., Nagelkerken, I., Smith, G. W., y Hayes, R. (2001). Yellow band and dark spot syndromes in Caribbean corals: distribution, rate of spread, cytology, and effects on abundance and division rate of zooxanthellae. In *The Ecology and Etiology of Newly Emerging Marine Diseases*. pp. 53-63.
- Cervino, J. M., Thompson, F. L., Gomez-Gil, B., Lorence, E. A., Goreau, T. J., Hayes, R. L., Winiarski-Cervino, K.B., Smith, G.W., Hughen, K. y Bartels, E. (2008). The *Vibrio* core group induces yellow band disease in Caribbean and Indo-Pacific reef-building corals. *Journal of applied microbiology*, 105(5), 1658-1671.
- Chimetto, L. A., Brocchi, M., Thompson, C. C., Martins, R. C., Ramos, H. R., y Thompson, F. L. (2008). Vibrios dominate as culturable nitrogen-fixing bacteria of the Brazilian coral *Mussismilia hispida*. *Systematic and applied microbiology*, 31(4), 312-319.
- CONANP. (2014). Programa de Manejo Área de Protección de Flora y Fauna, Sistema Arrecifal Lobos-Tuxpan. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 175pp.

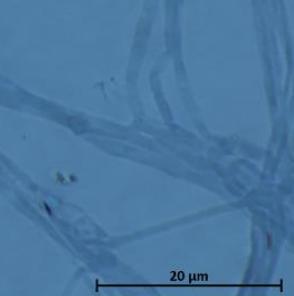
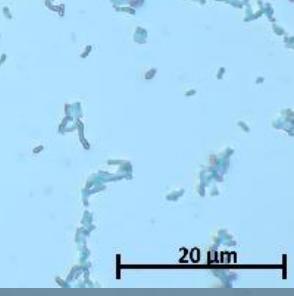
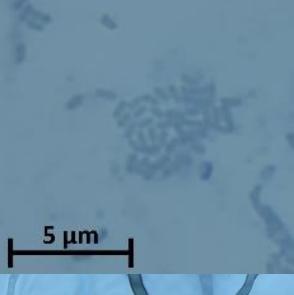
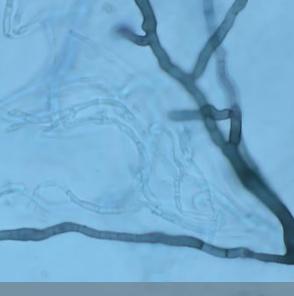
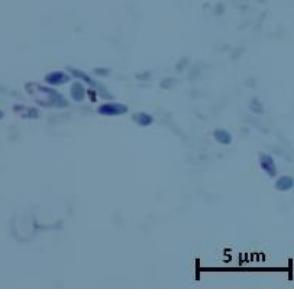
- Cróquer, A., Bastidas, C., Elliott, A., y Sweet, M. (2013). Bacterial assemblages shift from healthy to yellow band disease states in the dominant reef coral *Montastraea faveolata*. *Environmental Microbiology Reports*, 5(1), 90-96.
- de Queiroz-Brito, A. C., de Mello, J. F., de Almeida-Souza, A. E., dos Santos-Nascimento, S., de Souza-Motta, C. M., y Machado, A. R. (2022). Richness of Nigrospora spp. (Ariosporaceae) in *Manihot esculenta* Crantz in Brazil and the description of three new species.
- Denner, E. B., Smith, G. W., Busse, H. J., Schumann, P., Narzt, T., Polson, S. W., Lubitz, W., y Richardson, L. L. (2003). *Aurantimonas coralicida* gen. nov., sp. nov., the causative agent of white plague type II on Caribbean scleractinian corals. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(4), 1115-1122.
- Drzewiecka, D. (2016). Significance and roles of *Proteus* spp. bacteria in natural environments. *Microbial ecology*, 72, 741-758.
- Díaz, J. M., Díaz-Pulido, G., Garzón-Ferreira, J., Geister, J., Sánchez, J. A. y Zea, S. (1996). *Atlas de los arrecifes coralinos del Caribe colombiano: I. Complejos Arrecifales Oceánicos*.
- DOF. (2009). En *Diario Oficial de la Federación*, México, 5 de junio de 2009.
- Dorrestein, E. H., Conan, A., Pentzke-Lemus, L. L., Hartman, G., Sample, S. H., y Dennis, M. M. (2020). Prevalence and progression of macroscopic lesions in *Orcicella annularis* and *O. faveolata* on shallow fringing reefs of St. Kitts. *Diseases of Aquatic Organisms*, 140, 79-95.
- Dunphy, C. M., Gouhier, T. C., Chu, N. D., y Vollmer, S. V. (2019). Structure and stability of the coral microbiome in space and time. *Scientific reports*, 9(1), 1-13.
- El-Morsy, E. M., Ibrahim, H. A. H., Farhat, A. Z., y Mohsien, M. T. (2017). Pathogenicity of Fungi Colonizing Some Hard Corals and Invertebrates from the Northern Egyptian Red Sea Coast. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 21(2), 47-61.
- Espinosa, C., Herrera-García, C. D., Espinosa-García, V., Couttolenc, A., Andrade-Torres, A., Padrón, J. M., y Trigos, Á. (2021). The antiproliferative potential of fungi associated with coral and algae collected from a Veracruz Reef System, Gulf of Mexico. *Latin american journal of aquatic research*, 49(5), 843-849.
- Francini-Filho, R. B., Moura, R. L., Thompson, F. L., Reis, R. M., Kaufman, L., Kikuchi, R. K., y Leão, Z. M. (2008). Diseases leading to accelerated decline of reef corals in the largest South Atlantic reef complex (Abrolhos Bank, eastern Brazil). *Marine Pollution Bulletin*, 56(5), 1008-1014.
- Galloway, S. B., Work, T. M., Bochsler, V. S., Harley, R. A., Kramarsky-Winters, E., McLaughlin, S. M., Meteyer, C. U., Morado, J. F., Nicholson, J. H., Parnell, P. G., Peters, E. C., Reynolds, T. L., Rotstein, D. S., Sileo, L. y Woodley, C. M. (2007). Coral disease and health workshop: coral histopathology II. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 56 and NOAA Technical Memorandum CRCP 4. National Oceanic and Atmospheric Administration, Silver Spring, MD. 84p.
- Garcés-Baquero, A. M. (2000). Desarrollo de la Enfermedad de Lunares Oscuros en los corales pétreos *Montastraea annularis* y *Siderastrea siderea* en la Bahía de Gayraca, Caribe colombiano (Doctoral dissertation, Ph. D. Thesis. Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano).
- García-Ayala, G. (2017). Prevalencia de signos de enfermedades y ensambles coralinos en arrecifes del Sistema Arrecifal Lobos-Tuxpan. Tesis de licenciatura. Universidad Veracruzana. Fac. Cien. Biol. Agro. Tuxpan, Veracruz, México.
- Garren, M., y Azam, F. (2012). Corals shed bacteria as a potential mechanism of resilience to organic matter enrichment. *The ISME Journal*, 6(6), 1159-1165.
- Garzón-Ferreira, J., Gil-Agudelo, D. L., Barrios, L. M., y Zea, S. (2001). Stony coral diseases observed in southwestern Caribbean reefs. *Hydrobiologia*, 460(1), 65-69.
- Geiser, D. M., Taylor, J. W., Fitchie, K. B. y Smith, G. W. (1998). Cause of the death in the West Indies. *Nature*. 394: 137-138.
- Gil-Agudelo, D. L., Fonseca, D. P., Weil, E., Garzón-Ferreira, J. y Smith, G. W. (2007). Bacterial communities associated with the mucopolysaccharide layers of three coral species affected and unaffected with dark spots disease. *Can. J. Microbiol.* 53:465-471.
- Gil-Agudelo, D. L., Smith, G. W., Garzón-Ferreira, J., Weil, E. y Petersen, D. (2004). Dark spots disease and yellow band disease, two poorly known coral diseases with high incidence in Caribbean reefs. En: *Coral health and disease*. Springer, Berlín, Heidelberg. 337-349.

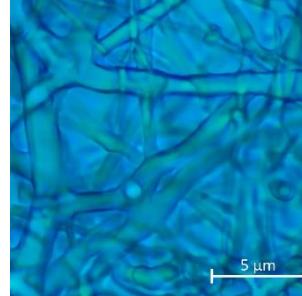
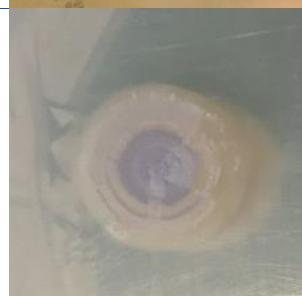
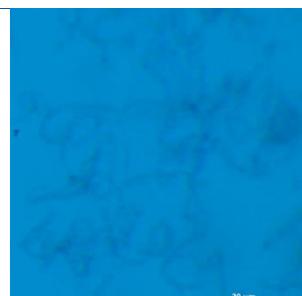
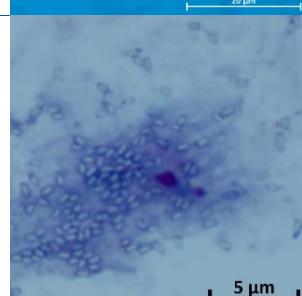
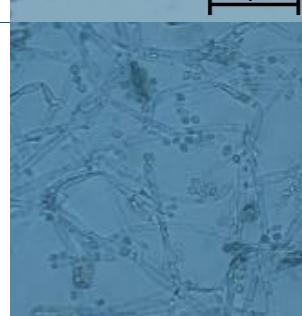
- Gil-Agudelo, D. L., y Garzón-Ferreira, J. (2001). Spatial and seasonal variation of dark spots disease in coral communities of the Santa Marta area (Colombian Caribbean). *Bulletin of Marine Science*, 69(2), 619-629.
- Gochfeld, D. J., Olson, J. B., y Slattery, M. (2006). Colony versus population variation in susceptibility and resistance to dark spot syndrome in the Caribbean coral *Siderastrea siderea*. *Diseases of aquatic organisms*, 69(1), 53-65.
- Golubic, S., Radtke, G., y Le Campion-Alsumard, T. (2005). Endolithic fungi in marine ecosystems. *Trends in microbiology*, 13(5), 229-235.
- González-Gándara, C., y Salas-Pérez, J. J. (2019). Caracterización del sustrato bentónico del arrecife Tuxpan, Veracruz, México, con énfasis en la comunidad de corales escleractinios. *Revista de biología marina y oceanografía*, 54(3), 259-271.
- Harvell, D., Jordán-Dahlgren, E., Merkel, S., Rosenberg, E., Raymundo, L., Smith, G., Weil, E., y Willis, B. (2007). Coral disease, environmental drivers, and the balance between coral and microbial associates. *Oceanography*, 20, 172-195.
- Huerta-Palacios, G., Holguín-Meléndez, F., Benítez-Camilo, F. A., y Toledo-Arreola, J. (2009). Epidemiología de la antracnosis [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc.] en mango (*Mangifera indica* L.) cv. Ataulfo en el Soconusco, Chiapas, México. *Revista mexicana de fitopatología*, 27(2), 93-105.
- Jordán-Garza A. G., González-Gándara, C. Salas-Pérez J. J. y Bazaldua-Fajardo, J. (2019). Clave para el Diagnóstico en Campo de Enfermedades de Corales Escleractinios en el Sistema Arrecifal Lobos-Tuxpan, Veracruz, p. 325-344. En: A. Granados-Barba, L. Ortiz-Lozano, C. González-Gándara y D. Salas-Monreal (eds.). *Estudios Científicos en el Corredor Arrecifal del Suroeste del Golfo de México*. Universidad Autónoma de Campeche. 376 p.
- Jordán-Garza, A. G., González-Gándara, C., Salas-Pérez, J. J. y Morales-Barragan, A. M. (2017). Coral assemblages are structured along a turbidity gradient on the Southwestern Gulf of Mexico, Veracruz. *Continental Shelf Research*, 138, 32-40.
- Kellogg, C. A., Piceno, Y. M., Tom, L. M., DeSantis, T. Z., Gray, M. A., y Andersen, G. L. (2014). Comparing bacterial community composition of healthy and dark spot-affected *Siderastrea siderea* in Florida and the Caribbean. *Plos one*, 9(10), e108767.
- Keral, N., Shivashankar, M., y Manmohan, M. S. (2019). Evaluation of cultural conditions on the growth of marine fungi and their antimicrobial activity. *Res. J. Life Sci. Bioinform. Pharm. Chem. Sci*, 5, 307-319.
- Kim, K., Harvell, C. D., Kim, P. D., Smith, G. W., y Merkel, S. M. (2000). Fungal disease resistance of Caribbean sea fan corals (*Gorgonia spp.*). *Marine Biology*, 136, 259-267.
- Koch, R., 1891. Über bacteriologische, Forschung Verhandlung des X Internationalen Medichinischen Congresses. Hirschwald, Berlin, p. 35.
- Kushmaro, A., Rosenberg, E., Fine, M. y Loya, Y. (1997). Bleaching of the coral *Oculina patagonica* by *Vibrio* AK-1. *Marine Ecology Progress Series*. 147: 159-165.
- López-Jácome, L. E., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C. A., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., y Franco-Cendejas, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en discapacidad*, 3(1), 10-18.
- Luna, G. M., Bongiorni, L., Gili, C., Biavasco, F., y Danovaro, R. (2010). *Vibrio harveyi* as a causative agent of the White Syndrome in tropical stony corals. *Environmental Microbiology Reports*, 2(1), 120-127.
- Lynch, M. J., Raphael, S. S., Mellor, L. D., Spare, P. D., y Inwood, M. J. H. (1987). *Métodos de laboratorio*, Vol. 2.
- Manos, J., y Belas, R. (2006). The genera *proteus*, *providencia*, and *morganella*. *Prokaryotes*, 6, 245-269.
- Martínez-Hernández, J. M., Ballados-González, G. G., Fernández-Bandala, D., Martínez-Soto, S., Velázquez-Osorio, V., Martínez-Rodríguez, P. B., Cruz-Romero, A., Grostieta, E., Lozano-Sardeneta, Y., Colunga-Salas, P., Becker, I. y Sánchez-Montes, S. (2019). Molecular detection of *Mycoplasma ovis* in an outbreak of hemolytic anemia in sheep from Veracruz, Mexico. *Tropical animal health and production*, 51, 243-248.
- Mata-Lara, M. (2012). Evaluación de estrategias de manejo arrecifal en Akumal, Q. Roo: Disturbios antropogénicos y enfermedades coralinas (Doctoral dissertation, Universidad Nacional Autónoma De México).
- Meyer, J. L., Castellanos-Gell, J., Aeby, G. S., Häse, C. C., Ushijima, B., y Paul, V. J. (2019). Microbial community shifts associated with the ongoing stony coral tissue loss disease outbreak on the Florida Reef Tract. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2244.

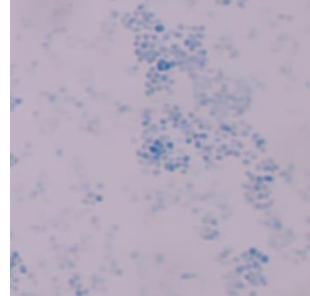
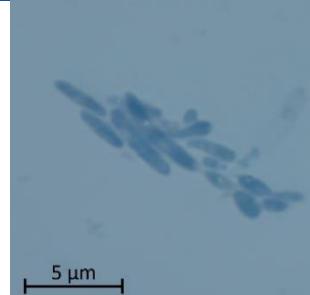
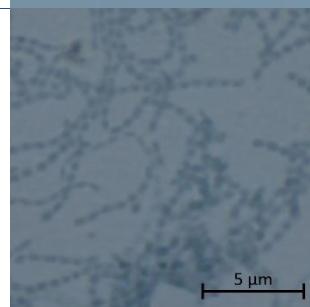
- Meyer, J. L., Rodgers, J. M., Dillard, B. A., Paul, V. J., y Teplitski, M. (2016). Epimicrobiota associated with the decay and recovery of *Orbicella* corals exhibiting dark spot syndrome. *Frontiers in microbiology*, 7, 893.
- Muller, E. M., y van Woesik, R. (2012). Caribbean coral diseases: primary transmission or secondary infection?. *Global Change Biology*, 18(12), 3529-3535.
- Mullin, P. G., Harryis, T. S., y Powers, T. O. (2005). Phylogenetic relationships of Nygolaimina and Dorylaimina (Nematoda: Dorylaimida) inferred from small subunit ribosomal DNA sequences. *Nematology* 7:59–79.
- Munn, C. B. (2015). The role of vibrios in diseases of corals. *Microbiology spectrum*, 3(4), 3-4.
- Neely, K. L., Macaulay, K. A., Hower, E. K., y Dobler, M. A. (2020). Effectiveness of topical antibiotics in treating corals affected by Stony Coral Tissue Loss Disease. *PeerJ*, 8, e9289.
- Nugues, M. M., y Bak, R. P. M. (2007). Dark spot syndrome: recent or old?. *Coral Reefs*, 26 (2), 359-359.
- O'Hara, C. M., Brenner, F. W., y Miller, J. M. (2000). Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. *Clinical microbiology reviews*, 13(4), 534-546.
- Ortiz-Lozano, E., Pérez-España, H., Granados-Barba, A., González-Gándara, C., Gutiérrez-Velázquez, A. y Martos, J. 2013. The reef corridor of the Southwest Gulf of Mexico: Challenges for its management and conservation. *Ocean and Coastal Management*. 86: 22-32.
- Patterson, K. L., Porter, J. W., Ritchie, K. B., Polson, S. W., Mueller, E., Peters, E. C., Santavy, D. L. y Smith, G. W. (2002). The etiology of white pox, a lethal disease of the Caribbean elkhorn coral, *Acropora palmata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(13), 8725-8730.
- Porter, J. W., Torres, C., Sutherland, K. P., Meyers, M. K., Callahan, M. K., Ruzicka, R., y Colella, M. (2011). Prevalence, severity, lethality, and recovery of dark spots syndrome among three Floridian reef-building corals. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 408(1-2), 79-87.
- Priess, K., Le Campion-Alsumard, T., Golubic, S., Gadel, F., y Thomassin, B. A. (2000). Fungi in corals: black bands and density-banding of *Porites lutea* and *P. lobata* skeleton. *Marine Biology*, 136(1), 19-27.
- Randall, C. J., Jordán-Garza, A. G., Muller, E. M., y van Woesik, R. (2016). Does dark-spot syndrome experimentally transmit among Caribbean corals?. *Plos one*, 11(1), e0147493.
- Raymundo, L. J., Couch, C. S., Harvell, C. D., Bruckner, A. W., Work, T. M., Weil, E., Woodley, C.M., Jordan-Dahlgren, E., Willis, B. L., Sato, Y. y Aeby, G. S. (2008). Coral disease handbook guidelines for assessment, monitoring & management. 121 p.
- Reed, K. C., Muller, E. M., y van Woesik, R. (2010). Coral immunology and resistance to disease. *Diseases of aquatic organisms*, 90(2), 85-92.
- Renegar, D. E. A., Blackwelder, P., Miller, J. D., Gochfeld, D. J., y Moulding, A. L. (2008). Ultrastructural and histological analysis of Dark Spot Syndrome in *Siderastrea siderea* and *Agaricia agaricites*.
- Reshef, L., Koren, O., Loya, Y., Zilber-Rosenberg, I., y Rosenberg, E. (2006). The coral probiotic hypothesis. *Environmental microbiology*, 8(12), 2068-2073.
- Reynoso, M., Magnoli, C., Barros, G., y Demo, M. (2015). Manual de microbiología general.
- Ritchie, K. B. (2006). Regulation of microbial populations by coral surface mucus and mucus-associated bacteria. *Marine Ecology Progress Series*, 322, 1-14.
- Rojas-Trivíño, A. (2011). Conceptos y práctica de microbiología general. Facultad de Ciencias Agropecuarias.
- Rosenberg, E., Koren, O., Reshef, L., Efrony, R. y Zilber-Rosenberg, I. (2007). The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nature Reviews Microbiology*. 5 (5): 355-362.
- Rubio-Portillo, E., Yarza, P., Penalver, C., Ramos-Esplá, A. A., y Anton, J. (2014). New insights into *Oculina patagonica* coral diseases and their associated *Vibrio* spp. communities. *The ISME journal*, 8(9), 1794-1807.
- Salas-Pérez, J. J., Monreal, D. S., Jordán-Garza, A. G., y Lehovec, F. R. (2023). Satellite features of river plumes over the Lobos-Tuxpan reef system. *Journal of Oceanography*, 1-17.
- Salas-Pérez, J. J., Ocaña-Valencia, Á. N., y González-Gándara, C. (2015). Temperatura superficial del mar y concentración de Clorofila-a en zonas arrecifales y desembocadura de sus ríos en el golfo de México occidental, p. 315-332. En: A. Granados-Barba, L. Ortiz-Lozano, D. Salas-Monreal y C. González-Gándara (eds.). *Aportes al conocimiento del Sistema Arrecifal Veracruzano: hacia el Corredor Arrecifal del Suroeste del Golfo de México*. Universidad Autónoma de Campeche. 366 p.
- Sekar, R., Mills, D. K., Remily, E. R., Voss, J. D., y Richardson, L. L. (2006). Microbial communities in the surface mucopolysaccharide layer and the black band microbial mat of black band-diseased *Siderastrea siderea*. *Applied and environmental microbiology*, 72(9), 5963-5973.

- Solano, O. D., Navas Suárez, G., y S. K. Moreno-Forero. (1993). Blanqueamiento coralino de 1990 en el Parque Nacional Natural Corales del Rosario (Caribe, colombiano). Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras-INEMAR, 22(1), 97-111.
- Stanley, G. D. (2003). The evolution of modern corals and their early history. *Earth-Science Reviews*, 60(3-4), 195-225.
- Sweet, M., Burn, D., Croquer, A., y Leary, P. (2013). Characterisation of the bacterial and fungal communities associated with different lesion sizes of dark spot syndrome occurring in the coral *Stephanocoenia intersepta*. *PLoS One*, 8(4), e62580.
- Thompson, F. L., Barash, Y., Sawabe, T., Sharon, G., Swings, J., y Rosenberg, E. (2006). *Thalassomonas loyana* sp. nov., a causative agent of the white plague-like disease of corals on the Eilat coral reef. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(2), 365-368.
- Treviño-Rangel, R. D. J. (2011). Identificación molecular y caracterización fenotípica de aislamientos clínicos del complejo *candida parapsilosis* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
- Vargas-Flores, T. y Kuno-Vargas, A. (2014). Morfología bacteriana. *Revista de actualización clínica*, 49, 2594-2598.
- Wegley, L., Edwards, R., Rodriguez-Brito, B., Liu, H., y Rohwer, F. (2007). Metagenomic analysis of the microbial community associated with the coral *Porites astreoides*. *Environmental microbiology*, 9(11), 2707-2719.
- Wong-Chin, J. M., Puchooa, D., Bahorun, T., y Jeewon, R. (2021). Antimicrobial properties of marine fungi from sponges and brown algae of Mauritius. *Mycology*, 12(4), 231-244.
- Work, T. M., Richardson, L. L., Reynolds, T. L., y Willis, B. L. (2008a). Biomedical and veterinary science can increase our understanding of coral disease. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 362(2), 63-70.
- Work, T., Aeby, G., Stanton, F. y Fenner, D. (2008b). Overgrowth of fungi (endolithic hypermycosis) associated with multifocal to diffuse distinct dark discoloration of corals in the Indo-Pacific. *Coral Reefs*. 27: 663.
- Work, T., y Meteyer, C. (2014). To understand coral disease, look at coral cells. *EcoHealth*, 11(4), 610-618.

Anexo.

Descripción de las características morfológicas de colonias fúngicas			
Muestra y especie	Descripción	Imagen macroscópica	Imagen microscópica
CS.I.1.CF1 <i>Nigrospora sp.</i>	Colonia circular con amplio patrón de crecimiento radial, color blanco, micelio aéreo de textura algodonosa. Al reverso presentó una coloración café oscuro. A nivel microscópico se observaron hifas cenocíticas, hialinas, sin la presencia de estructuras reproductoras.		 20 μm
CS.I.2.CF2 <i>Candida orthopsis</i>	Colonia con forma circular de color rojo, consistencia cremosa, textura lisa y superficie convexa. Bajo el microscópico se observaron formaciones unicelulares ovoides..		 20 μm
CS.2.2.CF3 N/I	Colonia color beige, plana, de textura polvosa con un amplio crecimiento. A nivel microscópico se observaron formaciones unicelulares ovoides.		 5 μm
CS.3.2.CF4 N/I	Colonia irregular de pigmentación grisácea con bordes blancos, textura filamentosa y micelio aéreo. Bajo microscopio se observaron hifas septadas, de pigmentación oscura, sin la presencia de conidios o conidióforos.		 5 μm
CS.3.3.CF5 <i>Candida parapsilosis</i>	Colonia de forma irregular con bordes ondulados, color blanco, textura cremosa con rugosidades. A nivel microscópico se observaron formaciones unicelulares ovoides.		 5 μm

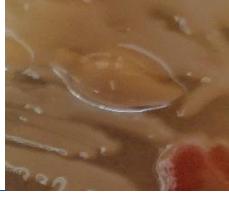
CE.1.1.CF1 <i>Nigrospora sp.</i>	Colonia irregular, color blanco, con amplio crecimiento, micelio aéreo de textura algodonosa. Al reverso presentó una coloración café oscuro. A nivel microscópico se observaron hifas cenocíticas, hialinas.		
CE.1.3.CF2 <i>Sordariomycetes sp.</i>	Colonia de forma circular, color beige, consistencia rígida, textura rugosa y bordes aserrados. Debido a su consistencia no se pudo tomar muestra para el análisis microscópico.		N/A
CE.1.3.CF3 <i>Colletotrichum sp.</i>	Colonia de forma circular con anillos concéntricos, de color azul al centro y bordes blancos presentó un micelio aplanado. Bajo microscopio se observaron estructuras similares a conidióforos de origen blástico.		
CE.2.2.CF4 <i>Candida parapsilosis</i>	Colonia de forma irregular con bordes ondulados, color blanco, textura cremosa con ligeras rugosidades. A nivel microscópico se observaron formaciones unicelulares ovoides.		
CE.2.3.CF5 N/I	Colonias elevadas con forma de hojuela color blanco, ocasionalmente con un centro negro, micelio aéreo con textura algodonosa. A nivel microscópico se observaron hifas septadas, conidióforos y microconidios hialinas.		

CE.2.3.CF6 N/I	Colonia de forma irregular y bordes ondulados, color crema con lunares blanquecinos, ligeramente elevada, de textura cremosa. A nivel microscópico se observaron formaciones unicelulares de forma redondeada.		
CE.3.2.CF7 <i>Candida parapsilosis</i>	Colonias de forma circular con bordes enteros bien definidos, color blancas, superficie convexa y textura lisa. A nivel microscópico presenta formaciones unicelulares de forma ovoide de 2 a 4 µm.		
AM.1.1.CFI Hongo sin clasificar	Colonia de forma irregular, de pigmentación grisácea con bordes blancos, textura filamentosa y micelio subáereo. Bajo microscopio se observaron estructuras similares a conidióforos de origen blástico.		

Características morfológicas de las colonias bacterianas. Las colonias se nombraron de acuerdo con el tipo de muestra; (CS) coral sano, (CE) coral enfermo y (AM) agua de mar; número de muestra y repetición (1.1, 1.2, 1.3, 2.1, 2.2, 2.3, 3.1, 3.2, 3.3) y el número de la colonia bacteriana (CB).

Colonia	Morfología macroscópica						Fotografía
	Forma	Borde	Superficie	Color	Consistencia	C.A.L.	
CS.1.1.CB1	Irregular	Difuso	Elevada	Rosa	Lisa	Brillante	
CS.1.1.CB2	Rizoide	Entero	Elevada	Roja	Lisa	Brillante	
CS.1.1.CB3	Irregular	Difuso	Plana	Anaranjada	Lisa	Brillante	
CS.1.1.CB4	Irregular	Entero	Elevada	Blanca	Mucoide	Brillante	
CS.1.1.CB5	Irregular	Aserrado	Elevada	Blanca	Lisa	Brillante	
CS.1.2.CB6	Irregular	Entero	Elevada	Blanca	Mucoide	Brillante	

CS.I.2.CB7	Irregular	Enterico	Plana	Blanca	Lisa	Brillante	
CS.I.2.CB8	Irregular	Ondulado	Mamelonada	Blanca	Lisa	Brillante	S/F
CS.I.2.CB9	Irregular	Enterico	Plana	Negra	Lisa	Brillante	
CS.I.3.CB10	Rizoides	Difuso	Elevada	Roja	Rugosa	Brillante	
CS.I.3.CB11	Irregular	Enterico	Elevada	Blanca	Mucoide	Brillante	
CS.2.I.CB12	Irregular	Lobulado	Plana	Blanca	Rugosa	Opaca	
CS.2.I.CB13	Irregular	Enterico	Convexa	Blanca	Mucoide	Brillante	
CS.2.I.CB14	Irregular	Difuso	Deprimida	Blanca	Mucoide	Brillante	

CS.2.2.CB15	Fusiforme	Enterop	Elevada	Roja	Lisa	Brillante	
CS.2.2.CB16	Irregular	Enterop	Elevada	Amarilla	Lisa	Brillante	
CS.2.2.CB17	Irregular	Difuso	Elevada	Morada	Lisa	Brillante	
CS.2.2.CB18	Irregular	Difuso	Elevada	Negra	Lisa	Brillante	
CS.2.2.CB19	Irregular	Difuso	Deprimida	Amarilla	Mucoide	Brillante	
CS.2.2.CB20	Irregular	Enterop	Convexa	Blanca	Mucoide	Brillante	
CS.2.2.CB21	Irregular	Difuso	Deprimida	Blanca	Mucoide	Brillante	

CS.2.2.CB22	Irregular	Enteró	Elevada	Roja	Lisa	Brillante	
CS.2.2.CB23	Irregular	Difuso	Elevada	Roja	Rugosa	Brillante	
CS.2.3.CB24	Irregular	Lobulado	Plana	Blanca	Rugosa	Opaca	
CS.2.3.CB25	Irregular	Lobulado	Elevada	Blanca	Rugosa	Brillante	
CS.2.3.CB26	Irregular	Enteró	Elevada	Blanca	Lisa	Brillante	
CS.2.3.CB27	Irregular	Enteró	Plana	Blanca	Lisa	Brillante	
CS.2.3.CB28	Irregular	Difuso	Deprimida	Blanca	Mucoide	Brillante	

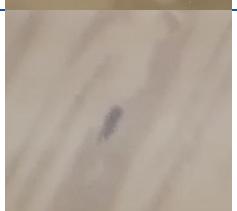
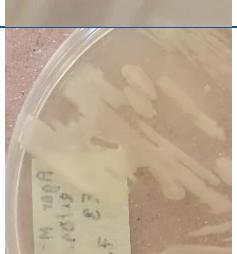
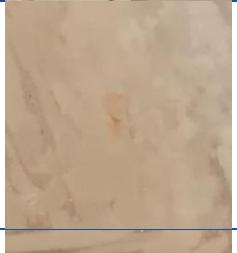
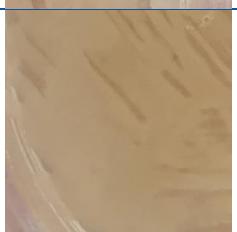
CS.2.3.CB29	Irregular	Enterico	Convexa	Blanca	Mucoide	Brillante	
CS.3.1.CB30	Irregular	Enterico	Elevada	Blanca	Mucoide	Brillante	
CS.3.1.CB31	Irregular	Enterico	Elevada	Blanca	Lisa	Brillante	
CS.3.1.CB32	Irregular	Difuso	Elevada	Morada	Lisa	Brillante	
CS.3.1.CB33	Irregular	Aserrado	Elevada	Blanca	Lisa	Brillante	
CS.3.2.CB34	Irregular	Enteros	Elevada	Blanca	Lisa	Brillante	
CS.3.2.CB35	Irregular	Enterico	Elevada	Roja	Lisa	Brillante	

CS.3.2.CB36	Irregular	Difuso	Deprimida	Blanca	Mucoide	Brillante	
CS.3.2.CB37	Irregular	Enteros	Plana	Blanca	Lisa	Brillante	
CS.3.2.CB38	Irregular	Enteros	Elevada	Blanca	Lisa	Brillante	
CS.3.2.CB39	Irregular	Ondulado	Mamelonada	Blanca	Lisa	Brillante	
CS.3.3.CB40	Irregular	Difusos	Elevada	Amarilla	Lisa	Brillante	
CS.3.3.CB41	Irregular	Difuso	Deprimida	Blanca	Mucoide	Brillante	
CS.3.3.CB42	Irregular	Difusos	Deprimida	S/N	Mucosa	Brillante	

CS.3.3.CB43	Irregular	Enteros	Convexa	Blanca	Mucosa	Brillante	
CS.3.3.CB44	Irregular	Enteros	Elevada	Blanca	Lisa	Brillante	
CE.I.I.CB1	Irregular	Enteros	Plana	S/N	Lisa	Opaca	
CE.I.I.CB2	Irregular	Enteros	Elevada	Blanca	Mucoide	Brillante	
CE.I.I.CB3	Irregular	Difuso	Plana	Roja	Rugosa	Brillante	
CE.I.2.CB4	Irregular	Enteros	Elevada	Blanca	Rugosa	Brillante	
CE.I.2.CB5	Irregular	Enteros	Elevada	Blanca	Lisa	Brillante	

CE.I.2.CB6	Irregular	Enter	Elevada	Roja	Rugosa	Brillante	
CE.I.2.CB7	Irregular	Difuso	Elevada	Negra	Lisa	Brillante	
CE.I.3.CB8	Irregular	Enter	Convexa	Blanca	Mucoide	Brillante	
CE.I.3.CB9	Irregular	Enter	Plana	S/N	Rugosa	Brillante	
CE.I.3.CB10	Irregular	Enter	Plana	S/N	Rugosa	Opaca	
CE.I.3.CB11	Irregular	Enter	Elevada	Negra	Lisa	Brillante	
CE.2.I.CB12	Irregular	Enter	Elevada	Blanca	Lisa	Opaca	

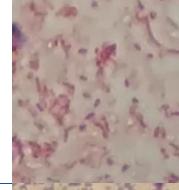
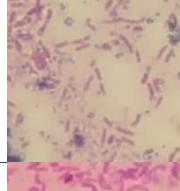
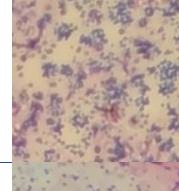
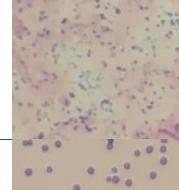
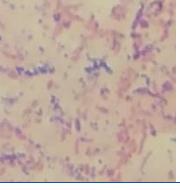
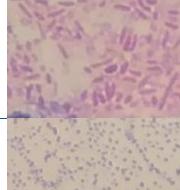
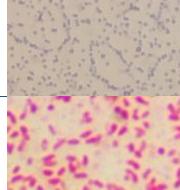
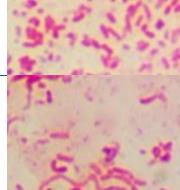
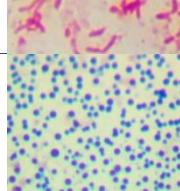
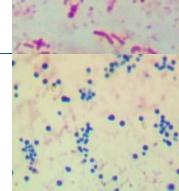
CE.2.1.CB13	Irregular	Entero	Plana	S/N	Lisa	Brillante	
CE.2.1.CB14	Irregular	Entero	Plana	S/N	Rugosa	Brillante	
CE.2.2.CB15	Irregular	Difuso	Deprimida	Blanca	Mucoide	Brillante	
CE.2.2.CB16	Irregular	Entero	Plana	Blanca	Lisa	Opaca	
CE.2.2.CB17	Irregular	Entero	Convexa	Blanca	Mucoide	Brillante	
CE.2.2.CB18	Irregular	Entero	Elevada	Blanca	Lisa	Brillante	
CE.2.2.CB19	Irregular	Entero	Plana	S/N	Rugosa	Brillante	

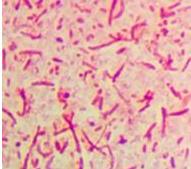
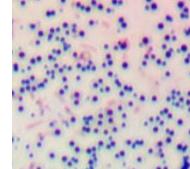
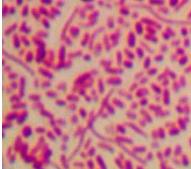
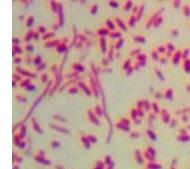
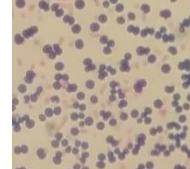
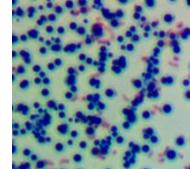
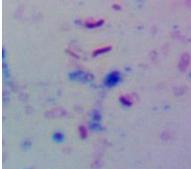
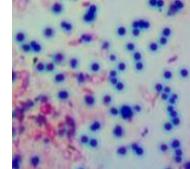
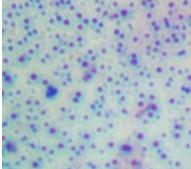
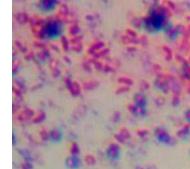
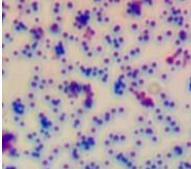
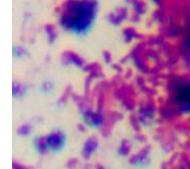
CE.2.3.CB20	Irregular	Enter	Convexa	Blanca	Mucoide	Brillante	
CE.2.3.CB21	Irregular	Difuso	Elevada	Negra	Lisa	Brillante	
CE.3.I.CB22	Irregular	Enteros	Elevada	Blanca	Lisa	Brillante	
CE.3.I.CB23	Irregular	Difusos	Plana	Roja	Rugosa	Brillante	
CE.3.I.CB24	Irregular	Difuso	Deprimida	Blanca	Mucoide	Brillante	
CE.3.I.CB25	Puntiforme	Difuso	convexa	Blanca	Mucoide	Brillante	
CE.3.2.CB26	Irregular	Enter	Elevada	Blanca	Lisa	Brillante	

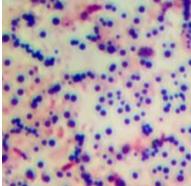
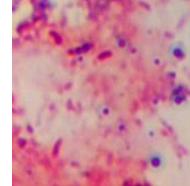
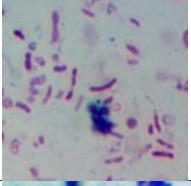
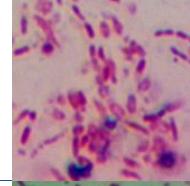
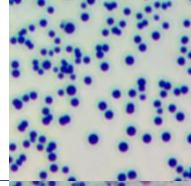
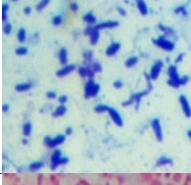
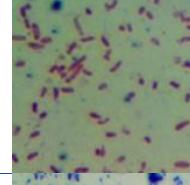
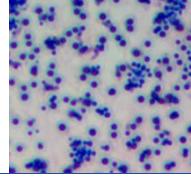
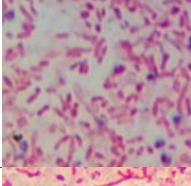
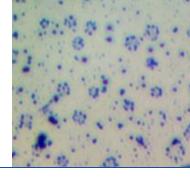
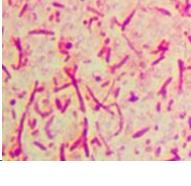
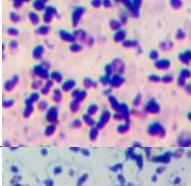
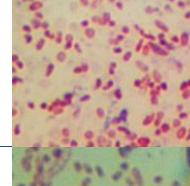
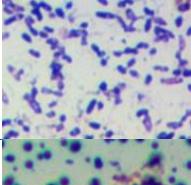
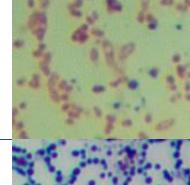
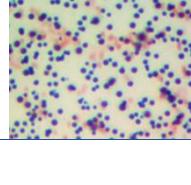
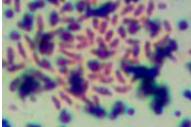
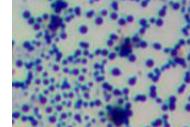
CE.3.2.CB27	Irregular	Aserrado	Elevada	Blanca	Lisa	Brillante	
AM.I.I.CB1	Irregular	Enteró	Plana	Beige	Lisa	Brillante	
AM.I.I.CB2	Irregular	Enteró	Elevada	Anaranjada	Rugosa	Brillante	
AM.I.I.CB3	Irregular	Ondulado	Plana	Café	Lisa	Brillante	
AM.I.2.CB4	Irregular	Enteró	Elevada	Amarilla	Lisa	Brillante	
AM.I.2.CB5	Circular	Enteró	Mamelonada	Beige	Lisa	Brillante	
AM.I.2.CB6	Irregular	Enteró	Elevada	Naranja	Rugosa	Brillante	

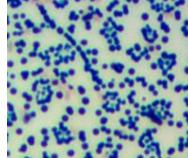
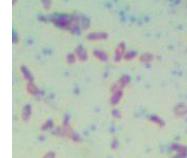
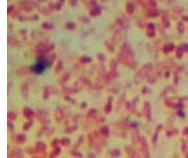
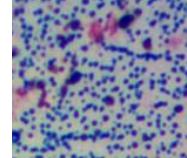
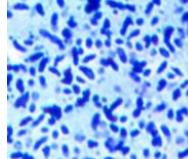
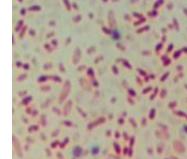
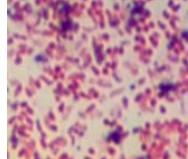
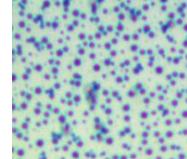
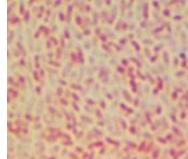
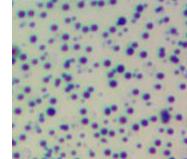
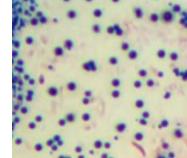
AM.I.2.CB7	Irregular	Entero	Elevada	Blanca	Rugosa	Brillante	
------------	-----------	--------	---------	--------	--------	-----------	---

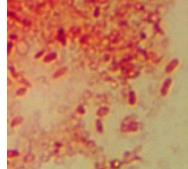
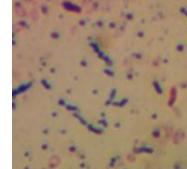
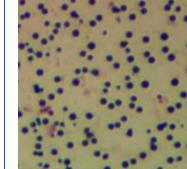
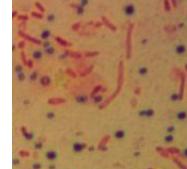
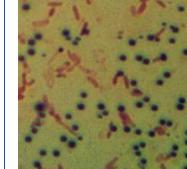
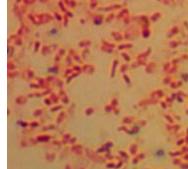
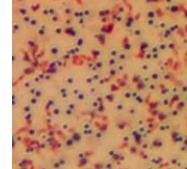
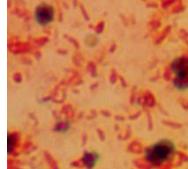
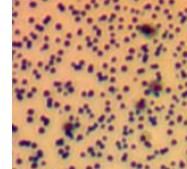
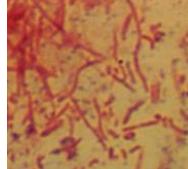
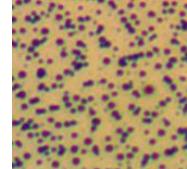
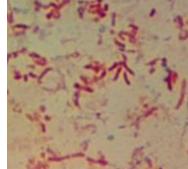
Características morfológicas de las colonias bacterianas cultivadas en agar marino. Las colonias se nombraron de acuerdo con el tipo de muestra; (CS) coral sano, (CE) coral enfermo y (AM) agua de mar; número de muestra y repetición (1.1, 1.2, 1.3, 2.1, 2.2, 2.3, 3.1, 3.2, 3.3) y el número de la colonia bacteriana (CB).

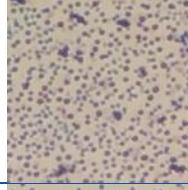
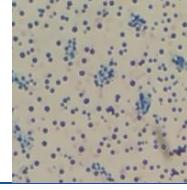
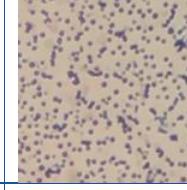
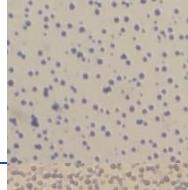
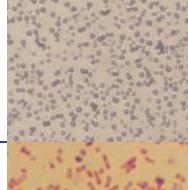
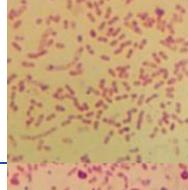
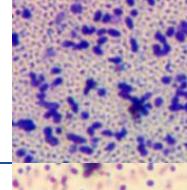
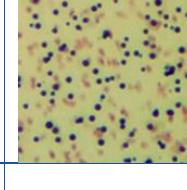
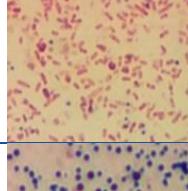
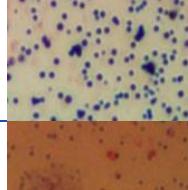
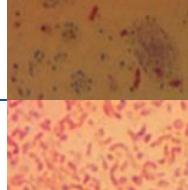
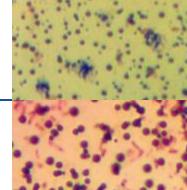
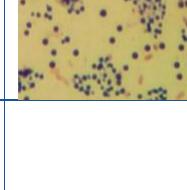
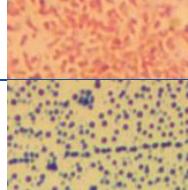
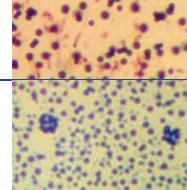
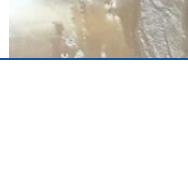
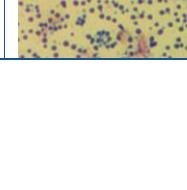
Colonia	Morfología bacteriana	Fotografía macroscópica	Fotografía microscópica		
CS.1.1.CB1	Bacilos + Bacilos -				
CS.1.1.CB2	Bacilos - Cocos + Estafilococos +				
CS.1.1.CB3	Bacilos - Cocos + Estreptobacilos - Estreptococos +				
CS.1.1.CB4	Bacilos - Cocos +				
CS.1.1.CB5	Cocos + Estreptococos +				
CS.1.2.CB6	Bacilos -				
CS.1.2.CB7	Bacilos - Estreptobacilos -				
CS.1.2.CB8	Cocos + Estafilococos +	S/F			

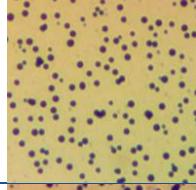
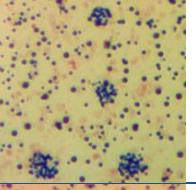
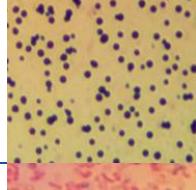
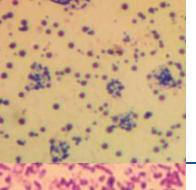
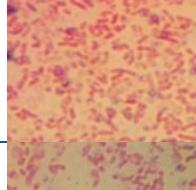
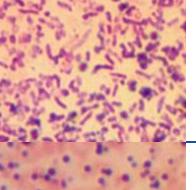
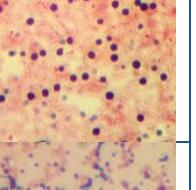
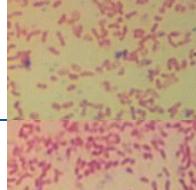
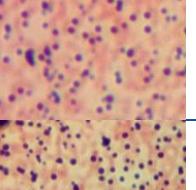
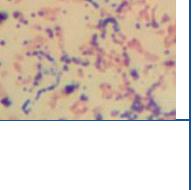
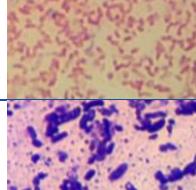
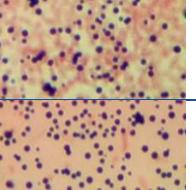
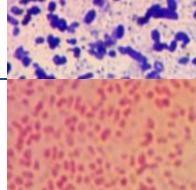
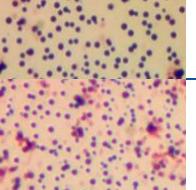
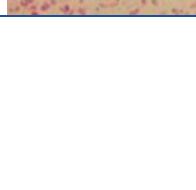
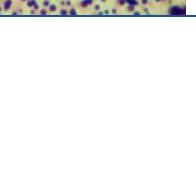
CS.1.2.CB9	Bacilos - Estreptobacilos -				
CS.1.3.CB10	Bacilos - Cocos + Estreptobacilos -				
CS.1.3.CB11	Bacilos - Estreptobacilos -				
CS.2.1.CB12	Bacilos - Cocos +				
CS.2.1.CB13	Bacilos - Cocos +				
CS.2.1.CB14	N/A				
CS.2.2.CB15	Bacilos - Cocos +				
CS.2.2.CB16	Bacilos - Cocos +				
CS.2.2.CB17	Bacilos - Cocos +				

CS.2.2.CB18	Bacilos - Cocos +				
CS.2.2.CB19	Bacilos - Cocos + Diplobacilos - Estreptobacilos -				
CS.2.2.CB20	Bacilos + Bacilos - Cocos + Estafilococos +				
CS.2.2.CB21	Bacilos - Cocos + Estafilococos +				
CS.2.2.CB22	Bacilos - Estreptobacilos -				
CS.2.2.CB23	N/A				
CS.2.3.CB24	Bacilos + Bacilos -				
CS.2.3.CB25	Bacilos + Bacilos - Cocos +				
CS.2.3.CB26	Bacilos - Cocos + Estreptococos +				

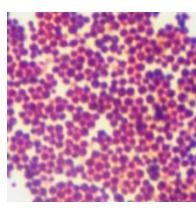
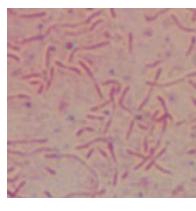
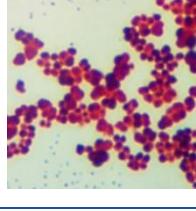
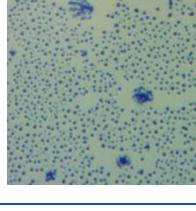
CS.2.3.CB27	Bacilos - Cocos Gram + Estafilococos + Estreptococos +				
CS.2.3.CB28	Bacilos - Cocos + Estreptococos +				
CS.2.3.CB29	N/A				
CS.3.1.CB30	Bacilos + Bacilos -				
CS.3.1.CB31	Bacilos -				
CS.3.1.CB32	Bacilos - Cocos +				
CS.3.1.CB33	N/A				
CS.3.2.CB34	Bacilos - Cocos +				
CS.3.2.CB35	Bacilos - Cocos + Diplococos +				

CS.3.2.CB36	Bacilos - Cocos + Estreptococos +				
CS.3.2.CB37	Bacilos - Cocos Gram + Estreptobacilos -				
CS.3.2.CB38	Bacilos - Cocos +				
CS.3.2.CB39	N/A				
CS.3.3.CB40	Bacilos - Cocos +				
CS.3.3.CB41	Bacilos - Cocos + Estreptobacilos -				
CS.3.3.CB42	Bacilos -				
CS.3.3.CB43	Bacilos - Estreptobacilos -				
CS.3.3.CB44	N/A				

CE.I.I.CB1	Cocos + Estafilococos + Estreptococos +				
CE.I.I.CB2	Cocos +				
CE.I.I.CB3	Cocos +				
CE.I.2.CB4	Bacilos + Bacilos - Cocos +				
CE.I.2.CB5	Bacilos - Cocos +				
CE.I.2.CB6	Cocos +				
CE.I.2.CB7	Bacilos - Cocos + Estafilococos +				
CE.I.3.CB8	Bacilos - Cocos +				
CE.I.3.CB9	Cocos + Estafilococos + Estreptococos +				

CE.1.3.CB10	Cocos + Estafilococos +				
CE.1.3.CB11	Cocos + Estafilococos +				
CE.2.1.CB12	Bacilos - Bacilos + Cocos +				
CE.2.1.CB13	Bacilos - Cocos + Estreptococos +				
CE.2.1.CB14	Bacilos - Cocos +				
CE.2.2.CB15	Bacilos + Cocos +				
CE.2.2.CB16	Bacilos - Cocos +				
CE.2.2.CB17	N/A				
CE.2.2.CB18	Bacilos - Cocos +				

CE.2.2.CB19	N/A				
CE.2.3.CB20	Bacilos - Cocos + Estafilococos +				
CE.2.3.CB21	Bacilos - Cocos + Estafilococos + Estreptobacilos -				
CE.3.1.CB22	Bacilos - Cocos + Estafilococos +				
CE.3.1.CB23	Bacilos - Cocos + Estafilococos +				
CE.3.1.CB24	Cocos + Estafilococos +				
CE.3.1.CB25	Bacilos - Cocos + Diplococos + Estafilococos +				
CE.3.2.CB26	Bacilos - Cocos +				
CE.3.2.CB27	Bacilos - Cocos +				

AM.I.I.CB1	Estafilococos +				
AM.I.I.CB2	Estreptobacilos -				
AM.I.I.CB3	N/A				
AM.I.2.CB4	Estafilococos +				
AM.I.2.CB5	Cocos + Estafilococos +				
AM.I.2.CB6	N/A				
AM.I.2.CB7	N/A				



“Lis de Veracruz: Arte, Ciencia, Luz”

www.uv.mx