

CAPACIDAD DE ADHESIÓN A MOCO DE CORAL DE BACTERIAS AISLADAS DE *Pocillopora* sp. Y *Porites panamensis* DEL SUROESTE DEL GOLFO DE CALIFORNIA

Suárez González, Irán¹, Oscar Piña Juárez¹, Maurilia Rojas Contreras¹, Marco Antonio Cadena Roa¹ & Ricardo Vázquez Juárez²

¹Laboratorio de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma de Baja California Sur. Km 5.5, Carretera al Sur, 23080, La Paz, Baja California Sur, México. ²Laboratorio de Genómica, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. Mar Bermejo 195, 23090 La Paz, Baja California Sur, México. Autor de correspondencia: mrojas@uabcs.mx

RESUMEN. El estudio de la microbiota en corales es de fundamental importancia para un mejor entendimiento de los procesos que determinan su asociación con el holobionte, sin embargo, aún se conoce poco acerca de los mecanismos básicos de dicha asociación. En esta investigación el objetivo fue aislar a partir de corales sin signos aparentes de enfermedad, las bacterias predominantes de la comunidad, determinar su capacidad de adhesión al moco producido por *Pocillopora* sp. e identificarlas molecularmente. Se recolectaron corales de los géneros *Pocillopora* sp. y *P. panamensis*, se cuantificó la población de cuatro grupos de microorganismos (expresados como Log de UFC g⁻¹): bacterias mesófilas aerobias (4.7 - 6.4), bacterias ácido lácticas (<1.0-5.8), bacterias del género *Vibrio* (<1.0-4.5), así como hongos y levaduras (<1.0-3.6). Se aislaron 156 cepas bacterianas del holobionte homogeneizado y se seleccionaron aquellas con mayor crecimiento a las 24 h para el ensayo de adhesión, que consistió en 25 cepas de *Pocillopora* sp. y 27 de *P. panamensis*. El ensayo de adhesión al extracto crudo de moco de *Pocillopora* sp., marcado enzimáticamente con HRP mostró que el 82 % de las cepas se adhieren. Se extrajo ADN de todas las cepas, sin embargo, con los oligonucleótidos universales utilizados se obtuvieron productos de PCR solo de 32. Se identificaron molecularmente 14 de *Pocillopora* sp. y 18 de *P. panamensis* con base en la secuenciación y análisis del gen 16S DNAr. Las cepas identificadas correspondieron a 17 especies, donde predominó el género *Bacillus*, con 64 % en *Pocillopora* sp. y 44 % en *P. panamensis*. Las especies de bacterias que comparten estos corales son *B. subtilis* y *Staphylococcus hominis*. Se sugiere que las especies identificadas adherentes tienen la capacidad de colonizar el moco del coral, son comensales y potencialmente benéficas, debido a que fueron aisladas de corales aparentemente sanos.

Palabras clave: holobionte, microbiota, dot-blot, *Bacillus*, coloniza.

Adhesion ability to coral mucus of isolated bacteria from *Pocillopora* sp. and *Porites panamensis* of California Gulf southeast.

ABSTRACT. The study of coral microbiota is of fundamental importance for a better understanding of the processes that determine its association with the holobiont, however, little is known about the basic mechanisms of this association. In this research, the objective was to isolate from corals without apparent signs of disease, the predominant bacteria of the community, determine their ability to adhere to the mucus produced by *Pocillopora* sp. and identify them molecularly. Corals of the genera *Pocillopora* sp. and *Porites panamensis* were recollected, the population of four groups of microorganisms (expressed as Log of CFU g⁻¹) was quantified. Results indicated aerobic mesophilic bacteria (4.7 - 6.4), lactic acid bacteria (<1.0-5.8), bacteria of the *Vibrio* genus (< 1.0-4.5), as well as fungi and yeasts (<1.0-3.6). 156 bacterial strains of the homogenized holobiont were isolated and those with the highest growth at 24 h were selected for the adhesion test, which consisted of 25 strains of *Pocillopora* sp. and 27 of *P. panamensis*. The adhesion test to the enzymatically labeled with HRP crude mucus extract of *Pocillopora* sp., showed that 82% of the strains adhere. DNA was extracted from all strains, however, with the universal oligonucleotides used, only 32 PCR products were obtained. 14 strains from *Pocillopora* sp. and 18 from *P. panamensis* were molecularly identified based on the sequencing and analysis of the 16S DNAr gene. The strains identified corresponded to 17 species, where the genus *Bacillus* predominated, with 64% in *Pocillopora* sp. and 44% in *P. panamensis*. The species of bacteria that share these corals are *B. subtilis* and *Staphylococcus hominis*. It is suggested that the identified adherent species have the ability to colonize coral mucus, are commensal and potentially beneficial, because they were isolated from apparently healthy corals.

Keywords: holobiont, microbiota, dot-blot, *Bacillus*, colonizes.

Suárez González I., O. Piña Juárez, M. Rojas Contreras, M. A. Cadena Roa & R. Vázquez Juárez. 2019. Capacidad de adhesión a moco de coral de bacterias aisladas de *Pocillopora* sp. y *Porites panamensis* del suroeste del Golfo de California. *CICIMAR Oceánides*, 34: 17-27

INTRODUCCIÓN

El estudio de las comunidades microbianas de los corales es clave para entender su asociación con el holobionte, sin embargo, los mecanismos por los cuales ésta se lleva a cabo han sido poco estudiados. La adhesión bacteriana al moco es comúnmente considerada como el primer paso en la colonización del tejido del hospedero (Henriksson & Conway, 1996; Rojas et

al., 2002; Hammes & Hertel, 2006). Por lo que comprender el comportamiento de las comunidades microbianas es clave para entender su salud (Mouchka et al., 2010).

Algunos autores proponen que las comunidades bacterianas asociadas con corales pueden ser especie y sitio específicas (Ritchie & Smith, 2004; Rohrer & Kelley, 2004; Sunagawa et al., 2010), con perfi-

Fecha de recepción: 13 de julio de 2018

Fecha de aceptación: 15 de abril de 2019

les microbianos que reflejan relaciones filogenéticas (Ritchie & Smith, 2004). Muchas de estas bacterias parecen tener relaciones simbióticas con el pólipo, y el coral puede resguardar comunidades microbianas benéficas, por ejemplo, fijadoras de nitrógeno o inhibidoras de patógenos potenciales, que son favorecidas en su crecimiento por medio de cambios en la composición del moco (Rohwer & Kelley, 2004). Así mismo, se han reportado ribotipos de gamma proteobacterias que pueden representar a asociados comunes y específicos de corales e invertebrados marinos (Kvennefors *et al.*, 2010). Sin embargo, para la mayoría de las especies de corales se desconoce la capacidad de adhesión de la comunidad que habita en su superficie mucosa y tejido. Se ha propuesto una hipótesis del concepto probiótico en corales, planteando que el coral holobionte puede adaptarse a condiciones de estrés durante cambios ambientales, cambiando las cantidades relativas de ciertas especies bacterianas (Reshef *et al.*, 2006). Así mismo se propuso que la comunidad microbiana de los corales no solo es adaptable en términos de diversidad, sino también en un equilibrio dinámico en términos de biomasa (Weinbauer *et al.*, 2012). Otros estudios indican que el microbioma es esencial para la inmunidad y salud del coral (Krediet *et al.*, 2013; Mao-Jones *et al.*, 2010; Rosenberg *et al.*, 2007) y otros revelaron algunas interacciones coral-bacteria generalmente estables entre los hábitats del arrecife y mostraron que *P. asteroides* y *Pocillopora verrucosa* del Caribe y del Mar Rojo comparten las bacterias *Ralstonia* sp. y *Propionibacterium* sp. (Ainsworth *et al.*, 2010). Así mismo, mostraron la diferenciación del microbioma núcleo del coral, como una forma de diferenciar las asociaciones estables y consistentes de la comunidad completa (Bäckhed *et al.*, 2012 & Hernández-Agreda *et al.*, 2017).

Está bien establecido que todos los corales secretan moco, el cual es esencial para procesos vitales como alimentación heterótrofa, limpieza del sedimento y defensa contra múltiples estresores ambientales (Ritchie & Smith, 2004), funciona como una barrera fisicoquímica de protección (Santavy & Peters, 1997; Sutherland *et al.*, 2004), y constituye un micro-hábitat y un medio de crecimiento para una comunidad bacteriana diversa, que generalmente es benéfica pero que puede ser patógena (Ducklow & Mitchell, 1979 a y b; Rublee *et al.*, 1980; Toren *et al.*, 1998; Banin *et al.*, 2000, 2001; Lipp *et al.*, 2002; Brown & Bythell, 2005; Li *et al.*, 2014). El moco se ha descrito con diferentes nombres, v.gr., microcapa superficial del coral (CSM por sus siglas en inglés), capa superficial de mucopolisacárido (SML) y capa de mucopolisacárido (MPSL) (Kellogg, 2004), consiste en un complejo rico en polímeros de glicoproteína sulfatada (mucina), producida por mucositos especializados que se encuentran principalmente en el ectodermo oral del pólipo, es sintetizado a partir de la fotosintetasa producida por sus dinoflagelados endosimbióticos (Patton *et al.*, 1977; Brown & Bythell, 2005; Krediet *et al.*, 2013). La tasa de producción ha

sido reportada como un criterio para designar grados de estrés (Thompson *et al.*, 1980) y enfermedades de corales en el Caribe (Porter *et al.*, 2001) y en el Indo-Pacífico (Sutherland *et al.*, 2004).

Pocillopora sp. es dominante en el Oeste de México (López-Pérez *et al.*, 2012; Reyes-Bonilla & Barraza, 2003), *P. panamensis* es también un coral conspicuo en el suroeste del Golfo de California (CONANP, 2006). Se ha reportado que las comunidades coralinas de la costa occidental de México se recuperan rápidamente de eventos naturales tales como El Niño (ENSO), aun en áreas con alta mortalidad (Reyes-Bonilla *et al.*, 2002). Sin embargo, expertos advierten que los arrecifes coralinos del Pacífico están en una trayectoria de degradación similar a la experimentada en la cuenca del Caribe, donde se han reducido, y sugieren que la proliferación de enfermedades en arrecifes de coral es signo de una enfermedad ambiental del océano (Galloway *et al.*, 2009). Enfermedades como banda negra (BBD black band disease), plaga blanca tipo I (WPL-I white plague type I) y anomalías del crecimiento esquelético (SKA, skeletal anomalies) se han registrado en el Indo-Pacífico, para *Pocillopora* sp. y *Porites* spp. (Sutherland *et al.*, 2004), sin embargo, en el Pacífico Mexicano, no hay registros de corales impactados por enfermedades microbianas y se sugiere que las lesiones que se observan en *Pocillopora* sp. se deben a la decoloración y pérdida de tejido inducida por depredación y sobrecrecimiento de esponjas o algas (Rodríguez-Villalobos *et al.*, 2014).

Uno de los retos que ha tomado relevancia en las últimas décadas, es determinar la contribución de las comunidades microbianas en la resiliencia de los arrecifes, debido a que las interacciones metabólicas con el holobionte son esencialmente desconocidas (Wegley *et al.*, 2007; McDevitt-Irwin *et al.*, 2017) y un primer paso para dicha contribución puede ser la habilidad de adherirse al moco superficial. El objetivo fue aislar las bacterias predominantes de la comunidad bacteriana de corales sin signos aparentes de enfermedad, determinar su capacidad de adhesión al moco producido por *Pocillopora* sp. e identificarlas molecularmente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio y recolección de muestras

Entre mayo del 2014 y enero del 2016 se recolectaron muestras de 30 g de tres colonias de los géneros *Pocillopora* sp., Lamareck, 1816 y *P. panamensis*, Verrill, 1866, a una profundidad de entre 2 y 10 m. Las muestras se tomaron en cuatro sitios ubicados en la costa sureste de la Península de Baja California (Fig. 1) en la Isla La Gaviota (IG) (24°17'19" N y los 110°19'56" W), Punta Arena (PA) (24°03'40" N y los 109°49'52" W) y dos sitios limítrofes del Parque Nacional Cabo Pulmo (PNCP), identificados como PNCP-Norte (23°22'40" N y los 109°28'03" W) y PNCP-Sur (23°5'00" N y los 109°5'00 W).

Las colonias se seleccionaron al azar en un área



Figura 1. Ubicación de los sitios en donde se realizó la recolecta del material biológico. La Gaviota (LG), Punta Arena (PA), sitios limítrofes norte y sur al Parque Nacional Cabo Pulmo (PNCP-Norte y PNCP-Sur).

de 100 m² entre aquellas que no presentaban signos de algún daño en el tejido o presencia de algas epífitas; características necesarias para considerarlas en buen estado de salud. Los trozos de coral se envolvieron con papel aluminio y se depositaron por separado dentro de bolsas plásticas estériles con capacidad de 1000 mL, inmediatamente después fueron transportadas en hielera para su procesamiento en el laboratorio.

Aislamiento y condiciones de cultivo de las bacterias

Para llevar a cabo el análisis microbiológico de los corales, de cada género se incorporaron cantidades iguales de las 3 muestras tomadas de cada sitio para completar 10 g, los cuales se colocaron en frascos de dilución con 90 mL de solución salina tamponada con fosfato a temperatura ambiente (PBS, NaCl 145 mM, KH₂PO₄ 2.87 mM y K₂HPO₄ 6.95 mM, pH 7.2) y se trituraron con un homogeneizador de tejidos (Ultra-Turrax T25, Janke & Kunkel). Se utilizó el método de cuenta viable y la técnica de extensión en superficie, sembrando por duplicado placas de Petri con los medios de cultivo: Agar Marino (AM), Agar

Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS), Agar Mann Rogosa and Sharp (MRS) y Agar Papa Dextrosa (APD) para cuantificar bacterias mesófilas aerobias, *Vibrio*, bacterias ácido lácticas, hongos y levaduras respectivamente. Para el aislamiento se seleccionaron colonias de bacterias presentes en las diluciones más altas (bacterias predominantes) con distintas características macroscópicas, las cuales fueron purificadas en los medios de cultivo mencionados. La morfología celular, fue examinada por microscopía de contraste de fases (Nikon Eclipse E-600), se realizaron las pruebas bioquímicas tinción de Gram, catalasa y oxidasa y posteriormente, la biomasa bacteriana de los cultivos puros se guardó a -85°C en PBS y 40 % (v/v) de glicerol.

Obtención de moco superficial de coral

Se extrajeron tres fragmentos de cada coral en estudio de la Isla La Gaviota, de aproximadamente 80 g. Se colocaron por separado sobre una charola estéril y se dejaron en reposo por 30 min para permitir la salida de moco, enseguida las muestras fueron raspadas con una espátula de hule estéril, para la disolución

del moco se adicionó por goteo aproximadamente 1 mL de una solución equilibrada del tampón HEPES plus Hanks (H-H) refrigerado (NaCl 136,87 mM, KCl 5,37 mM, CaCl₂·2H₂O 1,26 mM, MgSO₄·7H₂O 0,81 mM, Na₂HPO₄ 0,35 mM, KH₂PO₄ 2,57 mM y HEPES 9,98 mM, pH 7,4). El moco de *P. panamensis* no se pudo obtener en cantidad suficiente debido a su baja producción, sin embargo, de *Pocillopora* spp se recolectaron aproximadamente 20 mL, que se colocaron en un tubo estéril el cual permaneció sobre hielo. El moco de coral disuelto en el buffer se transfirió a un tubo cónico de 50 mL para centrifugarse a 11000 rpm por 10 min a 4°C. El sobrenadante se colocó en un tubo estéril y volvió a centrifugarse en frío a 11000 rpm por 30 min. Se desechó el precipitado y el extracto de moco crudo se guardó a -20°C.

Marcado enzimático del extracto de moco crudo de *Pocillopora* sp.

El moco de *Pocillopora* sp. se conjugó con la enzima Horse Radish Peroxidase (HRP) usando el método de Hudson y Hay (1989) y de acuerdo con la metodología descrita por Rojas y Conway (2001). Brevemente, se disolvieron 4 mg de HRP (HRP1000U/mg, Sigma) en 2 mL de agua destilada estéril, se adicionaron 400 µL de periodato de sodio 0.1M recién preparado; esta mezcla se agitó suavemente por 20 minutos a temperatura ambiente; enseguida la solución se dializó contra un buffer de acetatos 0.001M, pH 4.4 durante 12 horas a 4°C. Posteriormente, se suplementaron las preparaciones de moco congelado con el inhibidor de proteasas Na₂EDTA hasta la concentración final 1Mm; se dejó descongelar y se ajustó la proteína del moco a 4 mg/mL. A la enzima previamente dializada se le añadieron 20 µL de buffer de carbonato de sodio 0.1M, pH 9.5, con el fin de elevar el pH de la mezcla hasta 9-9.5. Enseguida, se hizo una mezcla 1/1 de la enzima y el mucus tratado con el inhibidor de proteasas y se mantuvo a temperatura ambiente por 2 horas mezclando ocasionalmente. Posteriormente, se adicionaron 100 µL de una solución recién preparada con 4mg/mL en agua destilada de borohidruro de sodio (para reducir enzima libre). La mezcla se dializó contra un buffer de boratos 0.1M, pH 7.4 durante 12 h a 4°C. Finalmente, el mucus se mezcló con volúmenes iguales de glicerol al 80% y se guardó a -20°C.

Cultivo de las bacterias a ensayar

Las cepas guardadas a -80°C fueron reactivadas en AM e incubadas a 30°C por 24 h, posteriormente se sembraron en el mismo medio y después de 18 h las células bacterianas se cosecharon y lavaron con 1 mL de H-H y se centrifugaron a 3500 rpm por 5 min a 4°C; el sobrenadante se decantó y los pellets se suspendieron en H-H hasta llegar a una DO₆₀₀ de 0.9-1.0.

Ensayo de adhesión

El ensayo de adhesión se basó en los métodos descritos previamente por Rojas & Conway, (2001). Concisamente, una membrana microporo de difluoro-

ro de polivinilideno (Immobilon PVDF, Millipore) se hidrató con metanol por dos segundos, inmediatamente después se lavó en agua destilada por 5 min y se introdujo en buffer H-H para equilibrarla; con la finalidad de mantenerla húmeda se colocó sobre una cama de papel filtro impregnado previamente con H-H. Sobre la membrana se inmovilizaron por triplicado gotas de 20 µL de las suspensiones de bacterias. La membrana se separó del papel filtro y se colocó directamente en una charola con 15 mL de una solución al 3 % (p/v) de Albúmina de Suero Bovino (BSA) (que actuó como agente bloqueante de sitios de adhesión no específicos) preparada con buffer H-H, se mantuvo en reposo durante 10 min. La membrana se lavó 3 veces con 15 mL de buffer H-H y se incorporó una solución 1:1000 de tampón H-H con la mucina marcada y se mantuvo en reposo durante 2 h a temperatura ambiente. Para visualizar la reacción de adhesión de la bacteria inmovilizada con el moco marcado, la membrana se lavó con tampón de acetato de sodio 0.1 M, pH 5,0 y luego se incubó en oscuridad con 10 mL del mismo tampón conteniendo 2,5 µL de una solución de peróxido de hidrógeno al 30% (Sigma) y 3,5 mg de 3,3'-diaminobenzidina (Sigma). Las membranas se lavaron con agua y se secaron a temperatura ambiente.

Identificación molecular

La extracción de ADN de las cepas predominantes aisladas y ensayadas para adhesión, de los dos géneros de coral se efectuó con el set comercial Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega). Se amplificó el gen 16S DNAr por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con los oligonucleótidos (pA: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y pH*: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') (Broda *et al.*, 1999), Los productos de la PCR que se obtuvieron fueron enviados a la empresa MACROGEN Korea, para su purificación y secuenciación por el método de Sanger. Las secuencias recibidas fueron comparadas con las reportadas en GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) disponible en el sitio de internet de la National Center for Biotechnology Information (NCBI), finalmente, las secuencias fueron registradas en este sitio.

RESULTADOS

Número de bacterias

En este estudio se registró la población de bacterias cultivables en muestras homogeneizadas de *Pocillopora* sp. y *P. panamensis* de cuatro sitios del suroeste del Golfo de California como el rango promedio de bacterias, expresado como Log de UFC g⁻¹ de cada grupo de microorganismos (Tabla 1). Como se observa, el grupo de bacterias mesófilas aerobias cultivadas en agar marino fluctuaron entre 5 y 5.9 en *Pocillopora* sp. y entre 4.7 y 6.4 en *P. panamensis*. El conteo de bacterias ácido-lácticas presuntivas en agar MRS fue más alto en las zonas limitrofes del Parque Nacional Cabo Pulmo (PNCP), en un rango de 2.6

Tabla 1. Grupos de bacterias, hongos y levaduras cultivables documentadas como Log de UFC g⁻¹ en corales del género *Pocillopora* spp. (PL) y *P. panamensis* (PR) en los cuatro sitios de recolecta. Cada uno de los valores son el promedio de dos replicas.

Sitio de recolecta	Coral	Grupos de bacterias			
		Mesófilas aerobias	Acido lácticas	Vibrio	Hongos y levaduras
LG	PL	5.0	2.9	< 1.0	< 1.0
	PR	5.7	< 1.0	< 1.0	< 1.0
PA	PL	5.7	2.8	< 1.0	< 1.0
	PR	4.7	< 1.0	< 1.0	< 1.0
PNCP-Norte	PL	5.7	4.9	2.7	3.0
	PR	5.3	5.8	4.5	3.6
PNCP-Sur	PL	5.9	2.6	3.7	d/n
	PR	6.4	2.7	2.5	d/n

d/n=dato no disponible

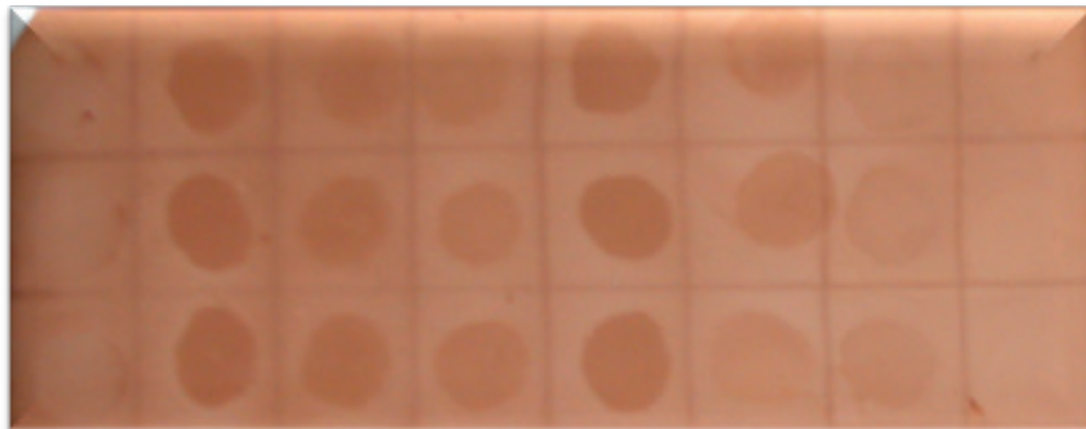
a 4.9 en *Pocillopora* sp. y de 2.7 a 5.8 en *P. panamensis*, mientras que bacterias presuntivas del género *Vibrio* cultivadas en TCBS) mostraron los registros más altos en el género *P. panamensis*. La observación microscópica de las bacterias aisladas reveló que la mayoría presentaron una morfología bacilar. Las cepas predominantes en los dos géneros de coral, aisladas de los 4 sitios de recolecta fueron 156, de las cuales 91 correspondieron a *Pocillopora* sp. y 65 a *P. panamensis*.

Bacterias que se adhieren al moco de coral

La capacidad de adherirse a moco de las cepas aisladas se evaluó cualitativamente, observando la intensidad de color de la reacción de adhesión de cada cepa al moco de coral marcado enzimáticamente con HRP (Fig. 2). Este ensayo se realizó con las 52 cepas que presentaron mayor crecimiento a las 18 horas de incubación, tomando en cuenta que deben alcanzar una DO₆₀₀ de 0.9 a 1.0. El ensayo arrojó que el 82 % de las 52 cepas bacterianas predominantes en estos dos corales presentan adhesión al moco de coral mientras que el 18% no mostraron esta característica.

Identificación molecular de las cepas

Se identificaron a través de la amplificación por PCR y secuenciación del gen 16S ADNr, 32 cepas que comprenden el 62 % de las ensayadas para adhesión; de las cuales 26 presentaron adhesión positiva (Tabla 2) y 6 no se adhirieron (Tabla 3). Las secuencias de estas cepas comparadas en la base de datos de NCBI con la herramienta BLAST mostraron en su mayoría un porcentaje de identidad del 100%. En general, fue predominante el género *Bacillus* (53%), el cual se registró en los dos géneros de coral estudiados (Fig. 3) y en los cuatro sitios de recolecta (Tabla 4), por lo que consideramos que presenta una distribución cosmopolita en la región. Las especies de bacterias identificadas de *Pocillopora* sp. y de *P. panamensis* se muestran en las Tablas 2 y 3. Las seis cepas identificadas que no se adhieren a moco de coral corresponden a las especies *S. hominis* (3), *S. epidermidis* (1) y *Bacillus foraminis* (2), de éstas, *S. epidermidis* PRP18 y *S. hominis* PRF50 fueron aisladas de *P. panamensis* (Tabla 3). Las especies de bacterias que comparten los dos géneros de coral son *B. subtilis* y *Staphylococcus hominis* (Tabla 4). Las especies que se registraron en orden de mayor a menor frecuencia fueron *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. aryabhattai*, *B. foraminis*,



PRF50 PLG1 PLA9 PLG24 PRG6 PRG19 PRF31 PRP18

Figura 2. Membrana de Immovilon PVDF que muestra la intensidad de color del HRP-moco adherido a algunas cepas ensayadas. Muestra resultados cualitativos por triplicado de *Staphylococcus hominis* (PRF50), *Pseudovibrio denitrificans* (PLG1), *Bacillus megaterium* (PLA9), *Bacillus foraminis* (PLG24), *Bacillus* sp. (PRG6), *Staphylococcus pasteuri* (PRG19), *Bacillus aryabhattai* (PRF31), *Staphylococcus epidermidis* (PRP18).

Tabla 2.- Bacterias predominantes en corales del género *Pocillopora* spp. y *P. panamensis* que se adhieren a HRP-moco de coral.

Clave de cepa	Especie	Identidad	No. acceso a GenBank
PLG1	<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	100%	MK418931
PLG24	<i>Bacillus foraminis</i>	99%	MK418942
PLA3	<i>Bacillus megaterium</i>	100%	MK418926
PLA9	<i>Bacillus megaterium</i>	100%	MK418920
PLA12	<i>Enterobacter cloacae</i>	99%	MK418921
PLP10	<i>Bacillus megaterium</i>	100 %	MK418946
PLF7	<i>Bacillus megaterium</i>	99%	MK418933
PLF9	<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	99%	MK418935
PLF10	<i>Bacillus megaterium</i>	100%	MK418936
PLF71	<i>Bacillus subtilis</i>	100%	MK418953
PRG6	<i>Bacillus</i> sp.	99%	MK418940
PRG15	<i>Kocuria turfanaensis</i>	99%	MK418928
PRG19	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99%	MK418929
PRA1	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	99%	MK418922
PRA6	<i>Bacillus aryabhatai</i>	100%	MK418923
PRP1-1	<i>Photobacterium</i> sp.	99%	MK418925
PRP1-2	<i>Bacillus subtilis</i>	100%	MK418924
PRP3a	<i>Bacillus velezensis</i>	100%	MK418950
PRP6c	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	MK418943
PRP7	<i>Bacillus subtilis</i>	100%	MK418945
PRP16	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	99%	MK418947
PRP19	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	100%	MK418949
PRP24	<i>Staphylococcus</i> sp.	99%	MK418944
PRF31	<i>Bacillus aryabhatai</i>	99%	MK418938
PRF35	<i>Enterococcus faecium</i>	100%	MK418937
PRF46	<i>Bacillus aryabhatai</i>	100%	MK418941

Las claves significan lo siguiente: PL= *Pocillopora* spp., PR= *P. panamensis*, G= La Gaviota, A= Punta Arena, P=PNCP-Norte, F=PNCP-Sur, el número y las letras en minúscula indica la cepa.

Tabla 3.- Bacterias predominantes en corales de los géneros *Pocillopora* sp. y *P. panamensis** que no se adhieren a HRP-moco de coral.

Clave de cepa	Especie	Identidad	No. acceso a GenBank
PLF6	<i>Bacillus foraminis</i>	100%	MK418932
PLF8	<i>Bacillus foraminis</i>	100%	MK418934
PLF54	<i>Staphylococcus hominis</i>	100%	MK418951
PLF55	<i>Staphylococcus hominis</i>	100%	MK418952
PRP18 *	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100%	MK418948
PRF50 *	<i>Staphylococcus hominis</i>	100%	MK418927

Las claves significan lo siguiente: PL= *Pocillopora* spp., PR= *P. panamensis*, P=PNCP-Norte, F=PNCP-Sur, el número indica la cepa.

Pseudovibrio denitrificans, *S. hominis* y *S. pasteurii*. El resto de las especies se identificaron en una sola ocasión y sitio de recolecta (Tabla 4).

DISCUSIÓN

Para avanzar en el conocimiento del mecanismo de asociación de las bacterias a su hospedero holobionte, con el cual contribuyen a mantener un nicho ecológico saludable, se estudió la adhesión de bacterias predominantes aisladas de los corales a un extracto crudo de moco del mismo coral marcado enzimáticamente, de tal forma que se aporta información básica sobre la capacidad que tiene la fracción cultivable de las comunidades bacterianas de los corales de los géneros *Pocillopora* sp. y *P. panamensis* de adherirse al moco, como un primer paso para colonizarlo y establecer algún tipo de asociación. La adhesión puede ser un proceso específico que involucre la interacción de adhesinas superficiales de la bacteria y receptores en la superficie mucosa del hospedero, una vez que la adhesión ocurre, la bacteria puede inducir la expresión de genes que pueden causar la activación de rutas metabólicas de señalización en las células del hospedero o viceversa (Nousiainen *et al.*, 2004; Ouwehand & Vesterlund, 2004; Richards *et al.*, 2005; Wilson, 2005; Barbés, 2008; Little *et al.*, 2008; Azcarate-Peril *et al.*, 2008; Lebeer, 2008; Kleerebezem, 2010).

Inicialmente se realizó el conteo de diferentes grupos de microorganismos en los dos géneros de coral, encontrando poblaciones expresadas en Log de UFC g⁻¹ similares entre los sitios de recolecta. En el caso de las bacterias ácido lácticas, su registro fue alto en los dos géneros recolectados de PNCP-norte, sin embargo, en La Gaviota y Punta Arenas, *P. panamensis* presentó cuentas viables < 10 UFC g⁻¹. No se cuenta con antecedentes del registro de poblaciones de bacterias asociadas a corales sanos en la zona de estudio, sin embargo, la abundancia y composición de las poblaciones de bacterias presentes en el género *P. panamensis* han sido reportadas previamente por Ducklow & Mitchell (1979b) en Barbados; los autores observaron diferencias significativas al evaluar las UFC/mL de tres especies de coral y el agua de mar circundante a las colonias, en el agua de mar registraron 3.2 Log de UFC mL y en el moco de *P. astreoides*, 6.6 Log de UFC mL, este registro es comparable a lo observado en esta investigación en un homogenizado (tejido y moco) del coral.

En esta investigación los ensayos de adhesión a moco de coral de bacterias predominantes aisladas de *Pocillopora* sp. y *P. panamensis*, permitieron constatar que el 71 % y 88 % respectivamente, se adhieren al moco de *Pocillopora* sp. La adhesión de bacterias aisladas de *P. panamensis* a moco de *Pocillopora* sp. fue similar, lo cual sugiere que los receptores de las adhesinas bacterianas en el moco de los dos géneros de coral pueden ser análogos. El moco de corales está compuesto principalmente por mucinas, las cuales varían en concentración dependiendo de la especie de coral (Jatkar *et al.*, 2010), sin embargo, se requiere llevar a cabo estudios más específicos para compren-

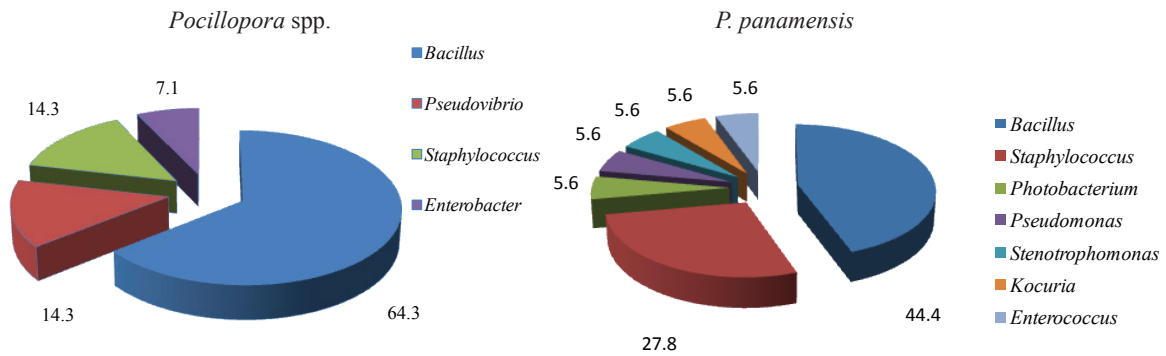


Figura 3. Géneros de bacterias predominantes en porcentaje de ocurrencia, identificadas en los corales *Pocillopora* spp. y *P. panamensis* del suroeste del Golfo de California.

der la relación adhesina bacteriana-receptor en moco.

Estos resultados también permiten sugerir que las bacterias se adhieren al moco de coral como un primer paso para colonizarlo y establecer una asociación estable. Mantener dicha asociación en las colonias coralinas es de fundamental importancia, ya que a través de la ocupación del nicho en las capas de moco, los microorganismos benéficos pueden prevenir competitivamente que los patógenos entren físicamente en el coral o se adhieran a la epidermis coralina, por otra parte, algunas bacterias en las capas de moco de coral producen compuestos antimicrobianos que pueden contribuir con el holobionte como una primera línea de defensa contra patógenos y otros organismos invasores (Shnit-Orland & Kushmaro, 2009), de tal forma que las propias comunidades microbianas juegan un papel importante en la determinación de los tipos de microbios que colonizan la superficie del coral a través de la ocupación de nicho y el antagonismo hacia otras bacterias (Ritchie, 2006; Rypien *et al.*, 2010). Así mismo, se observó que no todas las bacterias se adhieren al moco, como fue el caso de algunas cepas de *Staphylococcus* y *Bacillus*, lo que sugiere que éstas son transitorias y tienen menos posibilidades de establecer una asociación estrecha con el coral. Ritchie, (2006), propone un esquema de especies de bacterias aisladas del moco de *Acropora palmata* en el que identifica residentes, visitantes y de la columna de agua y considera a varias especies de *Staphylococcus*, *Pseudomonas* y *Vibrio* como visitantes, lo cual coincide con algunas cepas encontradas en este estudio que no se adhieren; no obstante, se requiere más investigación para determinar cuál es el papel que juegan en el moco y que mecanismos tienen para permanecer en ese nicho ecológico, por ejemplo, se ha reportado que algunas especies de *Staphylococcus* pueden formar biopelículas bajo diversos factores, lo que las hace capaces de sobrevivir en entornos normalmente hostiles, de manera que la formación de éstas es una estrategia de supervivencia bacteriana (Götz, 2002), que puede actuar como membrana protectora (Zhi-Ping *et al.*, 2018).

Si bien, las investigaciones basadas en técnicas

cultivo-dependientes que caracterizan la comunidad bacteriana son escasas, en las últimas décadas el estudio del microbioma asociado a las distintas especies coralinas se ha desarrollado significativamente, en gran medida gracias al empleo de técnicas independientes del cultivo, las cuales han generado una revolución en el conocimiento de su diversidad (Rohwer *et al.*, 2002; Wegley *et al.*, 2007; Reis *et al.*, 2009; Carlos *et al.*, 2013). Numerosos autores han descrito las asociaciones coral-bacteria, y aportado evidencias de que las especies coralinas poseen a su vez comunidades bacterianas específicas, incluso si las poblaciones de la misma especie de coral están separadas espacial o temporalmente (Rohwer *et al.*, 2002; Rohwer & Kelley, 2004; Bourne *et al.*, 2008). Los resultados de esta investigación reflejaron que en las cepas de *Pocillopora* sp. y *P. panamensis* predominó el género *Bacillus* con un 64 y 44 % respectivamente. Dos de las 17 especies identificadas, se encontraron en ambos corales: *B. subtilis* y *Staphylococcus hominis*, formando parte de la microbiota común de los corales estudiados. En particular, *Staphylococcus hominis* no presentó adhesión a moco, por lo que es necesario investigar cual es el papel que juega en los dos géneros de coral. En *P. panamensis* se identificaron tres especies más, pertenecientes al género *Staphylococcus*: *S. epidermidis*, *S. pasteurii* y *Staphylococcus* sp., las dos últimas con resultado positivo en el ensayo de adhesión al moco de *Pocillopora* sp., lo que permite suponer que también podrían encontrarse en éste coral. Adicionalmente, los resultados nos permiten sugerir que la bacteria *Bacillus megaterium*, aislada de *Pocillopora* sp. puede colonizar a *P. panamensis*, sin embargo, dado que solamente se identificó una muestra representativa de las bacterias adherentes, no podemos determinar si coloniza también a ésta última. Aspecto importante debido a que diversos autores han planteado que la producción y secreción de compuestos antimicrobianos por bacterias asociadas al moco es parte de la estrategia de defensa del coral escleractinio contra los patógenos (Rohwer *et al.*, 2002; Reshef *et al.*, 2006; Ritchie, 2006); en este sentido, el registro de la asociación de *B. megaterium* con *Pocillopora* sp. es relevante, debido a que en el Mar Caribe y en Bocas del Toro Panamá se encontró asociada con *Montastraea*

Tabla 4. Sitios de recolecta donde se ubicaron las diferentes especies de bacterias identificadas molecularmente para ambos géneros de coral.

Especies identificadas	Géneros de coral y sitios de recolecta							
	<i>Pocillopora</i> spp.				<i>P. panamensis</i> .			
	LG	PA	PNCP-Norte	PNCP-Sur	LG	PA	PNCP-Norte	PNCP-Sur
<i>Bacillus</i> sp.					1			
<i>Bacillus subtilis</i>				1			3	
<i>Bacillus aryabhatai</i>						1		2
<i>Bacillus megaterium</i>		2	1	2				
<i>Bacillus foraminis</i>	1			2				
<i>Enterobacter cloacae</i>		1						
<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	1			1				
<i>Enterococcus faecium</i>								1
<i>Bacillus velezensis</i>							1	
<i>Kocuria turfanaensis</i>					1			
<i>Photobacterium</i> sp.							1	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>					1			
<i>Stenotrophomonas</i> sp.						1		
<i>Staphylococcus hominis</i>				2				1
<i>Staphylococcus pasteurii</i>							2	
<i>Staphylococcus</i> sp.							1	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>							1	

La Gaviota (LG), Punta Arena (PA), sitios limítrofes norte y sur al Parque Nacional Cabo Pulmo (PNCP-Norte y PNCP-Sur).

franki, (Rohwer *et al.*, 2001) y en Cayos de Florida con *A. palmata* (Ritchie, 2006). Así mismo *B. megaterium* se reportó como simbiote de *A. palmata* dado que se aisló del moco y se comprobó que al igual que otras bacterias inhibió el crecimiento de una cepa de *B. subtilis* resistente al antibiótico kanamicina, por lo que se considera que tiene una importante contribución antimicrobiana a las propiedades protectoras del moco coralino (Ritchie, 2006). Shnit-Orland y Kushmaro (2009), aislaron bacterias del moco de seis corales duros y dos blandos en el Golfo de Eilat, también reportaron propiedades antimicrobianas de cepas bacterianas aisladas de *Pocillopora* sp. y *P. panamensis*, del primero encontraron dos cepas del género *Vibrio*, uno de ellos identificado como *Vibrio campbelli* y dos cepas del género *Pseudoalteromonas*, mientras que en *P. panamensis* encontraron tres cepas de éste mismo género, así como la especie *Pseudomonas stutzeri*.

Si bien, la diversidad de la microbiota asociada a los corales es en gran medida subestimada cuando se lleva a cabo con base en técnicas cultivo-dependientes, tiene la virtud de permitir el desarrollo de ensayos *in vitro*, que pueden significar un aporte de nuevas evidencias a hipótesis que se han planteado sobre la asociación coral-bacteria y a desarrollar nuevas interrogantes. En general, los mecanismos molecula-

res que permiten el establecimiento, reconocimiento y mantenimiento de simbiontes específicos dentro del holobionte de coral son desconocidos (Bourne *et al.*, 2016). Los resultados de esta investigación sugieren que estas bacterias presentes en los corales juegan un papel importante en la salud y supervivencia debido a que lo colonizan, pero resulta evidente que se requieran más estudios para analizar otras funciones reportadas (Rosenberg *et al.*, 2009; Bourne, 2012; McDewitt-Irwin *et al.*, 2017; Peixoto *et al.*, 2017).

CONCLUSIÓN

Un alto porcentaje de la comunidad bacteriana de *Pocillopora* sp. y *P. panamensis* tiene capacidad de adhesión al moco del primer género de coral mencionado, lo cual significa un primer paso en el mecanismo de colonización de los corales por las bacterias con receptores en moco que podrían estar en las mucinas que comparten todos los corales. Así mismo de las especies identificadas, *B. aryabhatai* y *Bacillus megaterium* son un ejemplo de bacterias que se encuentran asociadas a los corales en varios sitios de su distribución. La importancia de bacterias heterótrofas cultivables, que habitan en la mucosa de corales debe ser más estudiada, ya que estos microorganismos finalmente revelan información esencial concerniente

al mutualismo adaptativo en el holobionte, dado este panorama es prioritaria la descripción detallada de los mecanismos de asociación de las bacterias con el coral.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a CONACYT, al programa de posgrado en Ciencias Marinas y Costeras de la Universidad Autónoma de Baja California Sur y al laboratorio de Genómica y Bioinformática del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.

REFERENCIAS

- Ainsworth, T.D., T.R. Vega & R.D. Gates. 2010. The future of coral reefs: a microbial perspective. *Trends Ecol. Evol.*, 25:233–40.
- Azcarate-Peril, M.A., E.G. Altermann, R. Tallon, R.B. Sanozky-Dawes, E.A. Pfeiler, S. O'Flaherty, B.L. Buck, A. Dobson, T. Duong, M.J. Miller, R. Barrangou & T.R. Bäckhed, F., C.M. Fraser, Y. Ringel, M.E. Sanders, R.B. Sartor, P.M. Sherman, J. Versalovic, V. Young & B.B. Finlay. 2012. Defining a Healthy Human Gut Microbiome: Current Concepts, Future Directions, and Clinical Applications. *Cell Host Microbe*, 12: 612-622.
- Banin, E., T. Israely, A. Kushmaro, Y. Loya, E. Orr & E. Rosenberg. 2000. Penetration of the Coral-Bleaching Bacterium *Vibrio shiloi* into *Oculina patagonica*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 3031–3036.
- Banin, E., T. Israely, M. Fine, Y. Loya & E. Rosenberg. 2001. Role of endosymbiotic zooxanthellae and coral mucus in the adhesion of the coral-bleaching pathogen *Vibrio shiloi* to its host. *FEMS Microbiol. Lett.*, 199: 33–37.
- Barbés, C. 2008. *Lactobacilli* En: Versalovic, J. & M. Wilson (Eds). *Therapeutic Microbiology: Probiotics and Related Strategies*, pp. 19-33. Washington, DC: ASM Press.
- Bourne, D., Y. Lida, S. Uthicke & C. Smith-Keune. 2008. Changes in coral-associated microbial communities during a bleaching event. *ISME J.*, 2: 350–363.
- Bourne, D. G. 2012. Corals form characteristic associations with symbiotic nitrogen fixing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78: 3136–3144.
- Bourne, D.G., K.M. Morrow & N. Webster. 2016. Insights into the Coral Microbiome: Underpinning the Health and Resilience of Reef Ecosystems. *Annu. Rev. Microbiol.*, 70: 317-340.
- Broda, D.M., P.A. Lawson, R.G. Bell & D.R. Musgrave. 1999. *Clostridium frigidicarnis* sp. nov., a psychrotolerant bacterium associated with 'blown pack' spoilage of vacuum-packed meats. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49: 1539-1550.
- Brown, B.E. & J.C. Bythell. 2005. Perspectives on mucus secretion in reef corals. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 296: 291–309.
- CONANP. 2006. *Programa de Conservación y Manejo Parque Nacional Cabo Pulmo*. 128 p. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México.
- Carlos, C., T.T. Torres & L.M.M. Ottoboni. 2013. Bacterial communities and species-specific associations with the mucus of Brazilian coral species. *Sci. Repts*, 3: 1624.
- Ducklow, W.H. & R. Mitchell. 1979a. Bacterial populations and adaptations in the mucus layers on living corals. *Limnol. Oceanogr.*, 24: 715-725.
- Ducklow, H.W. & R. Mitchell. 1979b. Observations on naturally and artificially diseased tropical corals: a scanning electron microscope study. *Microb. Ecol.*, 5: 215-223.
- Galloway, S.B., A.W. Bruckner & C.M. Woodley (Eds). 2009. *Coral Health and Disease in the Pacific: Vision for Action*. 314 p. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 97 and CRCP 7. National Oceanic and Atmospheric Administration, Silver Spring, MD.
- Götz, F. 2002. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol. Microbiol.*, 43: 1367–1378.
- Hammes, W.P. & C. Hertel. 2006. *The genera Lactobacillus and Carnobacterium*. En: Dworkin, M., S. Falkow, E. Rosenberg, K.H. Schleifer & E. Stackebrandt. (Eds). *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria*, pp 320-403. Vol. 4. Springer.
- Henriksson, A. & P.L. Conway. 1996. Adhesion of *Lactobacillus fermentum* 104-S to porcine stomach mucus. *Curr. Microbiol.*, 33: 31-34.
- Hernández-Agreda, A., R.D. Gates & T.D. Ainsworth. 2017. Defining the Core Microbiome in Corals' Microbial Soup. *Trends Microbiol.*, 25 : 125-140.
- Hudson, L. & G.C. Hay. 1989. *Antibody as a probe*. En: Elaine, K. H. & J.P. Frances (Eds). *Practical Immunology*. pp 44-46. Blackwell Scientific Publications, London, UK.
- Jatkar, A.A., B.E. Brown, J.C. Bythell, R. Guppy, N.J. Morris & J.P. Pearson. 2010. Coral Mucus: The Properties of Its Constituent Mucins. *Biomacromolecules*, 11: 883–888
- Kellogg, C.A. 2004. Tropical Archaea: diversity associated with the surface microlayer of corals. *Mar.*

- Ecol. Prog. Ser.*, 273:81–88.
- Kleerebezem, M., P. Hols, E. Bernard, T. Rolain, M. Zhou, R.J. Siezen & P.A. Bron. 2010. The extracellular biology of the lactobacilli. *FEMS Microbiol. Rev.*, 34: 199-230
- Krediet, C.J., K.B. Ritchie, V.J. Paul & M. Teplitski. 2013. Coral-associated micro-organisms and their roles in promoting coral health and thwarting diseases. *Proc. R. Soc. B.*, 280: 20122328.
- Kvennefors, E.C.E, E. Sampayo, T. Ridgway, A.C. Barnes & O. Hoegh-Guldberg. 2010. Bacterial Communities of Two Ubiquitous Great Barrier Reef Corals Reveals Both Site and Species-Specificity of Common Bacterial Associates. *PLoS ONE*, 5: e10401.
- Lebeer, S., J. Vanderleyden & S.C.J. De Keersmaecker. 2008. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 72: 728-764.
- Li, J., Q. Chen, L.J. Long, J.D. Dong, J. Yang & S. Zhang. 2014. Bacterial dynamics within the mucus, tissue, and skeleton of the coral *Porites lutea* during different seasons. *Sci. Rep.*, 4:7320.
- Lipp, E.K., J.L. Jarrell, D.W. Griffin, J. Lukasik, J. Jacukiewicz, J. & J.B. Rose. 2002. Preliminary evidence for human fecal contamination of corals in the Florida Keys, USA. *Mar. Pollut. Bull.*, 44: 666-670.
- Little, A.E.F., C.J. Robinson, S.B. Peterson, K.F. Raffa & J. Handelsman. 2008. Rules of engagement: interspecies interactions that regulate microbial communities. *Annu. Rev. Microbiol.*, 62, 375-401.
- López-Pérez, R.A., L.E. Calderón-Aguilera, H. Reyes-Bonilla, J. D. Carriquiry-Beltran, P. Medina-Rosas, A.L. Cupul-Magaña, M.D. Herrero-Pérezrul, H.A. Hernández-Ramírez, M.Á. Ahumada Sempoal & B.M. Luna Salguero. 2012. Coral communities and reefs from Guerrero, Southern Mexican Pacific. *Mar. Ecol.*, 33(4), 407-416.
- Mao-Jones, J., K.B. Ritchie, L.E. Jones & S.P. Ellner. 2010. How Microbial Community Composition Regulates Coral Disease Development. *PLoS Biol.*, 8:1-16.
- McDevitt-Irwin, J.M., J.K. Baum, M. Garren & R.L. Vega. 2017. Responses of Coral-Associated Bacterial Communities to Local and Global Stressors. *Front. Mar. Sci.*, 4:262.
- Mouchka, M.E., I. Hewson & C.D. Harvell. 2010. Coral-associated bacterial assemblages: current knowledge and the potential for climate-driven impacts. *Comp. Biol.*, 50:662–674.
- Morrow, K.M., A.G. Moss, N.E. Chadwick & M. R. Liles. 2012. Bacterial associates of two Caribbean coral species reveal species-specific distribution and geographic variability. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78(18): 6438-6449.
- Nousiainen, J., P. Javanainen, J. Setälä & A. von Wright. 2004. *Lactic acid bacteria as animal probiotics*. En: Salminen, S., A. von Wright & A.C. Ouwehand. (Eds). *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, pp 547-580. Marcel Dekker.
- Ouwehand, A.C. & S. Vesterlund. 2004. *Antimicrobial components from lactic acid bacteria*. En: Salminen, S., A. Von Wright & A. C. Ouwehand (Eds.). *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, pp 375-395. NY: Marcel Dekker.
- Patton, J.S., S. Abraham & A.A. Benson. 1977. Lipogenesis in the intact coral *Pocillopora capitata* and its isolated zooxanthellae: evidence for a light-driven carbon cycle between symbiont and host. *Mar. Biol.*, 44: 235–247.
- Peixoto, R.S., P.M. Rosado, D.C.A. Leite, A.S. Rosado & D.G. Bourne. 2017. Beneficial microorganisms for corals (BMC): Proposed mechanisms for coral health and resilience. *Front. Microbiol.*, 8: 341.
- Porter, J.W., P. Dustan, W.C. Jaap, K.L. Patterson, V. Kosmynin, O.W. Meier, M.E. Patterson & M. Parsons. 2001. Patterns of spread of coral disease in the Florida Keys. *Hydrobiologia*, 460: 1–24.
- Reis, A.M.M., S.D. Araújo Jr., R.L. Moura, R.B. Francini-Filho, G. Pappas Jr., A.M.A. Coelho, R.H. Krüger & F.L. Thompson. 2009. Bacterial diversity associated with the Brazilian endemic reef coral *Mussismilia braziliensis*. *J. Appl. Microbiol.*, 106: 1378-1387.
- Reshef, L., O. Koren, Y. Loya, I. Zilber-Rosenberg & E. Rosenberg. 2006. The Coral Probiotic Hypothesis. *Environ. Microbiol.*, 8(12): 2068-2073.
- Reyes-Bonilla, H., J. Carriquiry, G. Leyte-Morales & A. Cupul-Magaña. 2002. Effects of the El Niño-Southern Oscillation and the anti-El Niño event (1997–1999) on coral reefs of the western coast of México. *Coral Reefs*, 21: 368–372.
- Reyes-Bonilla, H. & J.E. Barraza. 2003. *Corals and associated marine communities from El Salvador*. En: Cortés, J. (Ed). *Latin American Coral Reefs*. pp 351–360. Elsevier Science.
- Richards, J.D., J. Gong & C.F.M. de Lange. 2005. The gastrointestinal microbiota and its role in monogastric nutrition and health with an emphasis on pigs: current understanding, possible mo-

- dulations, and new technologies for ecological studies. *Can. J. Anim. Sci.*, 85: 421-435.
- Ritchie, K.B. & G.W. Smith. 2004. *Microbial communities of coral surface mucopolysaccharide layers*. En: Rosenberg, E. & Y. Loya (Eds). *Coral Health and Disease*, pp 259–263. Springer Verlag.
- Ritchie, K.B. 2006. Regulation of microbial populations by coral surface mucus and mucus-associated bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 322: 1–14.
- Rodríguez-Villalobos, J.C., A. Rocha-Olivares, T.M. Work, L.E. Calderón-Aguilera & J.A. Cáceres-Martínez. 2014. Gross and microscopic pathology of lesions in *Pocillopora* sp. from the subtropical eastern Pacific. *J. Invertebr. Pathol.*, 120: 9-17.
- Rojas, M. & P.L. Conway. 2001. A dot-blot assay for adhesive components relative to probiotics. *Methods Enzymol.*, 336:289-402.
- Rojas, M., F. Ascencio & P.L. Conway. 2002. Purification and characterization of a surface protein from *Lactobacillus fermentum* 104 R that binds to porcine small intestinal mucus and gastric mucin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 2330-2336.
- Rosenberg, E., O. Koren, L. Reshef, R. Efrony & I. Zilber-Rosenberg. 2007. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nat. Rev. Microbiol.*, 5: 355–362.
- Rosenberg, E., A. Kushmaro, E. Kramarsky-Winter, E. Banin & L. Yossi. 2009. The role of microorganisms in coral bleaching. *ISME J.*, 3: 139-146.
- Rohwer, F., M. Breitbart, J. Jara, F. Azam & N. Knowlton. 2001. Diversity of bacteria associated with the Caribbean coral *Montastraea franksi*. *Coral Reefs*, 20: 85-91.
- Rohwer, F. V. Seguritan, F. Azam & N. Knowlton. 2002. Diversity and distribution of coral-associated bacteria. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, 243:1-10.
- Rohwer, F. & S. Kelley. 2004. *Culture independent analyses of coral-associated microbes*. En: Rosenberg, E. & Y. Loya (Eds). *Coral Health and Disease*, pp 265–277. Springer Verlag.
- Rublee, P.A., H.R. Lasker, M. Gottfried & M.R. Roman. 1980. Production and bacterial colonization of mucus from the soft coral *Briarum asbestinum*. *Bull. Mar. Sci.*, 30: 888–893.
- Rypien, K.L., J.R. Ward & F. Azam. 2010. Antagonistic interactions among coral-associated bacteria. *Environ. Microbiol.*, 12: 28–39.
- Santavy, D.L. & E.C. Peters. 1997. Microbial pests: coral disease research in the western Atlantic. *Proc. 8th Int. Coral Reef Symp.*, 1: 607–612.
- Shnit-Orland, M. & A. Kushmaro. 2009. Coral mucus-associated bacteria: a possible first line of defense. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 67:371–380.
- Sunagawa, S., C.M. Woodley & M. Medina. 2010. Threatened Corals Provide Underexplored Microbial Habitats. *PLoS ONE*, 5: 1-7.
- Sutherland K.P., J.W. Porter & C. Torres. 2004. Disease and immunity in Caribbean and Indo-Pacific zooxanthellate corals. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, 266:273–302.
- Thompson, J.H, E.A Shinn & T.J. Bright. 1980. Effects of drilling mud on seven species of reef-building corals as measured in the field and laboratory. *Elsevier Oceanogr. Ser.*, 27: 433–453.
- Toren, A., L. Landau, A. Kushmaro, Y. Loya & E. Rosenberg. 1998. Effect of Temperature on Adhesion of *Vibrio* Strain AK-1 to *Oculina patagonica* and on Coral Bleaching. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 1379–1384.
- Wegley, L., R. Edwards, B. Rodríguez-Brito, H. Liu & F. Rohwer. 2007. Metagenomic analysis of the microbial community associated with the coral *Porites astreoides*. *Environ. Microbiol.*, 9: 2707–19.
- Wegley, K.L., A.F. Haas & C.E. Nelson. 2018. Ecosystem Microbiology of Coral Reefs: Linking Genomic, Metabolomic, and Biogeochemical Dynamics from Animal Symbioses to Reefscape Processes. *mSystems*, 3: e00162-17.
- Wilson, M. 2005. *Microbial Inhabitants of Humans: their ecology and role in health and disease*. Ed. Cambridge, University Press.
- Weinbauer, M.G., J. Ogier & C. Maier. 2012. Microbial abundance in the coelenteron and mucus of the cold-water coral *Lophelia pertusa* and in the bottom water of the reef environment. *Aquat. Biol.*, 16: 209–216.
- Zhi-Ping, M., Y. Song, C. Zhong-Hua, L. Zhi-Jun Lin, L. Guang-Hui, Y. Wang & J. Zhou. 2018. Anti-quorum sensing activities of selected coral symbiotic bacterial extracts from the South China Sea. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 8:144.

