



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**BUSQUEDA DE RELACIONES ENTRE LA  
COMUNICACIÓN CELULAR BACTERIANA EL  
POTENCIAL DE VIRULENCIA Y LA ESTRUCTURA  
DE LA COMUNIDAD BACTERIANA EN LA  
ENFERMEDAD DE LA PLAGA BLANCA TIPO II**

Anny Johanna Cárdenas Barbosa

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Maestría en Ciencias - Microbiología

Bogotá, Colombia

2012



# **BUSQUEDA DE RELACIONES ENTRE LA COMUNICACIÓN CELULAR BACTERIANA EL POTENCIAL DE VIRULENCIA Y LA ESTRUCTURA DE LA COMUNIDAD BACTERIANA EN LA ENFERMEDAD DE LA PLAGA BLANCA TIPO II**

Anny Johanna Cárdenas Barbosa

Tesis de grado para optar al título de

**Magister en Ciencias - Microbiología**

Directora:

Catalina Arévalo Ferro Dr. Rer. Nat.

Profesor Asociado Departamento de Biología

Línea de Investigación

Ecología microbiana

Grupo de Investigación

Comunicación y Comunidades Bacterianas

Universidad Nacional de Colombia

Maestría en Ciencias – Microbiología

Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia



*A mis papas por darme las mejores  
enseñanzas de la vida*

*A Migue por su aliento y comprensión  
en todo momento*

*A mi hermano por su incondicional apoyo  
por sus consejos y sus valores*

*A mi directora de tesis, la profe Catalina,  
de quién siempre seguiré aprendiendo*

*A Martín por darme hermosos  
momentos cada día*

*A mis amigos Sofi, Juan Pablo y Sebastián  
por hacer que este camino siempre  
estuviera lleno de alegría*

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi más sincera gratitud a la profesora Catalina Arevalo Ferro por su gran incentivo, supervisión y paciencia para el desarrollo de esta tesis. A los profesores Hernando Valencia y Luis Fernando Cadavid por abrirme siempre las puertas de sus laboratorios incondicionalmente. A mis compañeros del grupo de Comunicación y Comunidades Bacterianas por su constante apoyo. A mi hermosa familia por siempre apoyar y respaldar mis planes y acompañarme siempre. A Migue por su entrega incondicional. A mis amigos de biología por transmitirme siempre la mejor energía.

## RESUMEN

Una de las principales causas de la dramática disminución en las comunidades de arrecifes de corales es la aparición de nuevas enfermedades infecciosas. Entre estas enfermedades la Plaga Blanca tipo II, que es una de las más destructivas del Caribe colombiano. En el presente trabajo se comparó la composición de la bacteriobiota, presencia de genes involucrados en circuitos de *Quorum Sensing* y el potencial de virulencia de cepas pertenecientes a las comunidades bacterianas de *Siderastrea siderea* y *Diploria strigosa* sanos y con la enfermedad de la Plaga Blanca tipo II. Se planteo un modelo que relaciona dichos aspectos como factores involucrados en el desarrollo de la enfermedad.

**Palabras claves:** *Siderastrea siderea*, *Diploria strigosa*, *Plaga Blanca*, *Quorum Sensing*

## ABSTRACT

One of the main causes of the dramatic decline in coral reef communities is the emergence of new infectious diseases. The White Plague Type II is one of the most destructive disease of the Caribbean Sea. In this work we evaluate the bacteriobiota composition, the presence of Quorum Sensing genes and the virulence potential occurring in strains belonging to the bacterial communities of both healthy and diseased *Siderastrea siderea* and *Diploria strigosa*. We propose a model that includes these aspects as involved factors in the development of the disease.

**Key Words:** *Siderastrea siderea*, *Diploria strigosa*, *White Plague Disease*, *Quorum Sensing*.

# CONTENIDO

<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Estado del arte .....</b>	<b>5</b>
2.1. Arrecifes coralinos	
2.2. <i>Siderastrea sidérea</i>	
2.3. <i>Diploria strigosa</i>	
2.4. Microbiología de corales	
2.5. Enfermedades coralinas	
2.5.1. La enfermedad de la Plaga Blanca	
2.6. El <i>Quorum Sensing</i>	
<b>3. Planteamiento de problema y justificación.....</b>	<b>20</b>
<b>4. Objetivos.....</b>	<b>21</b>
4.1. General	
4.2. Específicos	
<b>5. Metodología.....</b>	<b>22</b>
5.1. Toma de muestras	
5.2. .Técnicas moleculares	
5.2.1. Extracción DNA total a partir de muestras de corales	
5.2.2. Extracción de DNA colonia	
<b>5.2.3. Pirosecuenciación</b>	
5.2.4. Amplificación del 16S rADN de <i>Aurantimonas coralicida</i>	
5.2.5. PCR 16S rADN de colonias	
5.2.6. PCR genes tipo <i>luxI</i>	
5.3. Análisis de secuencias	
5.3.1. Pirosecuencia	
5.3.2. 16S rADN completo	
5.3.3. Diseño de <i>primers</i> para genes tipo <i>luxI</i>	
5.4. Obtención y caracterización fenotípica de aislamientos bacterianos	
5.4.1. Caracterización morfológica y bioquímica	
5.4.2. Producción de AHLs	
<b>6. Resultados.....</b>	<b>37</b>
6.1. Comunidad no cultivable	
6.2. Comunidad cultivable	

6.3. Detección de factores de virulencia	
6.4. Detección de genes tipo <i>luxI</i> en aislamientos bacterianos	
6.4.1. Detección de AHLs en aislamientos bacterianos	
<b>7. Discusión.....</b>	<b>64</b>
7.1. Estructura taxonómica de las comunidades bacterianas	
7.2. Potencial de virulencia de las comunidades bacterianas asociadas a corales	
7.3. Presencia de genes de QS en las comunidades bacterianas	
7.4. Dinámica de la comunidad bacteriana durante la enfermedad de la Plaga Blanca	
<b>8. Conclusiones.....</b>	<b>81</b>
<b>9. Recomendaciones.....</b>	<b>83</b>
<b>10. Referencias bibliográficas.....</b>	<b>84</b>
<b>11. Anexos</b>	

## INDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Dendograma de especies coralinas basado en la composición de comunidades microbianas y sus características metabólicas.

**Figura 2.** Esquema generalizado de circuitos de QS en bacterias Gram negativas y Gram positivas.

**Figura 3.** Fotografía *Siderastrea siderea* afectada con la enfermedad de la Plaga Blanca tipo II durante un brote en octubre de 2009

**Figura 4.** Primera y segunda amplificación para el marcaje de las regiones V5-V6 antes de la pirosecuenciación.

**Figura 5.** Caracteres morfológicos para la descripción macroscópica de una colonia

**Figura 6.** Diagrama del ensayo para la detección de AHLs producidas

**Figura 7.** Abundancias relativas de secuencias designadas taxonómicamente a nivel de phylum.

**Figura 8.** Abundancias relativas de secuencias designadas taxonómicamente a nivel de clase dentro del phylum Proteobacteria

**Figura 9.** Abundancias relativas de órdenes pertenecientes a las clases Alpha-Beta y Gammaproteobacteria.

**Figura 10.** Análisis de rarefacción basado en el número de OTUs encontrados en cada una de las muestras.

**Figura 11.** Análisis de similaridad de comunidades de Jaccard.

**Figura 12.** Fotografías de algunas colonias procedentes de muestras de corales y su tinción de Gram.

**Figura 13.** Actividad bioquímica de algunos aislamientos procedentes a corales enfermos y sanos.

**Figura 14.** Ejemplo de algunos dendogramas a nivel de género.

**Figura 15.** Diagramas de Venn de la comunidad cultivable.

**Figura 16.** Relaciones taxonómicas de los aislamientos obtenidos a partir de las muestras de corales.

**Figura 17.** Porcentaje de aislamientos pertenecientes a los phyla Actinobacteria, Proteobacteria y Firmicutes.

**Figura 18.** Efecto de temperatura, pH y salinidad en la expresión de factores de virulencia.

**Figura 19.** Perfiles de bandeo de las cepas 13SE y 24SE (*Pseudomonas putida*), y *Pseudomonas putida* ISOF.

**Figura 20.** Perfiles de bandeo de las cepas 5SS (*Vibrio rotiferianus*), 8SS (*Vibrio natriegens*), 10SS (*Vibrio rotiferianus*) y 27SE (*Vibrio natriegens*).

**Figura 21.** Efecto de la lactonasa AiiB de *Agrobacterium tumefaciens* en la expresión de proteasas de 5 aislamientos coralinos.

**Figura 22.** Dinámica de la enfermedad de Plaga Blanca con respecto a la estructura, la virulencia y la comunicación de las comunidades bacteriana sanas y enfermas.

## INDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Cepas control usadas para la caracterización bioquímica de los aislamientos procedentes de corales.

**Tabla 2.** Cepas biosensoras de AHLs usadas en este trabajo.

**Tabla 3.** Diferentes tratamientos para la detección de factores de virulencia de aislamientos provenientes de muestras de corales.

**Tabla 4.** Número de OTUs obtenidos para cada muestra de coral, índices de riqueza y diversidad.

**Tabla 5.** Actividad bioquímica de algunos aislamientos procedentes a corales enfermos y sanos.

**Tabla 6.** Identificación taxonómica de 31 aislamientos procedentes de diferentes muestras de corales utilizando análisis de secuencias del gen ribosomal 16S rADN.

**Tabla 7.** Actividad positiva de Hemolisinas, proteasas y lipasas en los aislamientos probados.

**Tabla 8.** Número de aislamientos con actividad positiva para cada factor de virulencia.

**Tabla 9.** Número de cepas en las cuales hubo incidencia de la temperatura, la salinidad y el pH con la expresión de factores de virulencia.

**Tabla 10.** AHLs producidas por los aislamientos coralinos y detectadas por diferentes cepas biosensoras.

**Tabla 11.** Lista de *primers* diseñados para amplificar el gen tipo *luxI* de aislamientos bacterianos procedentes de corales

**Tabla 12.** Aislamientos bacterianos en los cuales se probaron los *primers* diseñados.

**Tabla 13.** Aislamientos bacterianos que tuvieron productos de amplificación usando *primers* diseñados para el gen de la sintetasa de AHLs.

**Tabla 14.** Resultados de búsqueda de genes por Blast de las secuencias obtenidas al amplificar con los *primers* diseñados para el gen tipo *luxI*.

## INDICE DE ANEXOS

**Anexo 1.** Artículo publicado en la revista ISME (*International Society of Microbial Ecology*): Shifts in bacterial communities of two caribbean reef-building coral species affected by white plague disease

**Anexo 2.** Porcentaje de secuencias clasificadas a nivel de género encontrado en cada una de las muestras.

**Anexo 3.** Porcentaje de secuencias clasificadas a nivel de familia encontrado en cada una de las muestras.

**Anexo 4.** Cepario obtenido a partir de las muestras de corales *Siderastrea siderea* y *Diploria strigosa* enfermos y sanos (Caracterización Molecular, Bioquímica y Morfológica)

**Anexo 5.** Número de acceso al GenBank de secuencias de nucleótidos utilizadas para el diseño de *primers* para amplificar genes tipo *luxI* a partir de ADN de aislamientos coralinos

**Anexo 6.** Base de datos de número de acceso al GenBank de secuencias de aminoácidos y nucleótidos utilizadas para el diseño de *primers* para amplificar genes tipo *luxI* de bacterias pertenecientes a las clases Alphaproteobacteria y Gamma proteobacteria

**Anexo 7.** Otros productos

**7.1.** Capítulo de libro: Papel de las comunidades bacterianas en sistemas arrecifales.

**7.2.** Certificado de participación en congresos.

**7.2.1** Participación en el XX Congreso Latinoamericano de Microbiología y IX Encuentro Nacional de Microbiólogos, 27 al 30 de Septiembre de 2010, Montevideo Uruguay

**7.2.2** *MENCION DE HONOR* a trabajo de investigación en XX Congreso Latinoamericano de Microbiología y IX Encuentro Nacional de Microbiólogos, 27 al 30 de Septiembre de 2010, Montevideo – Uruguay

**7.2.3.** Participación en el simposio “Microbial Interactions in Marine Systems (MiMaS) 6 al 8 de Julio de 2010, Greifswald, Alemania.

# 1. INTRODUCCIÓN

Los arrecifes coralinos se clasifican como uno de los ecosistemas más diversos del planeta ya que sustentan a más de un cuarto de las especies marinas existentes, convirtiéndolos en la principal fuente económica y turística oceánica (Mulhall, 2009). Lamentablemente este ecosistema ha sido altamente sensible a prácticas como la sobrepesca, el turismo irresponsable, la contaminación y el cambio climático, los cuales han llevado a la preocupante disminución de las poblaciones asociadas. La consecuencia ecológica del desequilibrio de este diverso ecosistema es la pérdida de numerosas especies que mantienen estrechas simbiosis con los corales y esto se ve reflejado en la sociedad humana, ya que los arrecifes coralinos tienen un valor económico calculado de 375 billones US\$ al año (Constanza et al., 1997), sustentando la economía pesquera en más de 100 países del mundo los cuales, en su mayoría, están en vías de desarrollo y no tienen la capacidad de ofrecer un plan de manejo para estos recursos (Moore and Best, 2009).

Una de las principales razones por las que los arrecifes coralinos han experimentado la pérdida de más del 30% de su población en los últimos 30 años es la aparición de nuevas enfermedades infecciosas (Rosenberg et al., 2007). La descripción de la primera enfermedad coralina se realizó en 1965 y durante los siguientes 30 años solamente se detectaron 3 más; en 1990 se le sumaron a la lista 13 enfermedades nuevas y en la actualidad son 23 las enfermedades detectadas en corales (Weil et al., 2006). Aún se debate si el incremento en su frecuencia durante las últimas décadas es el resultado de factores ambientales a causa del cambio climático o es la secuela de actividades antropogénicas como la contaminación, la pesca y el turismo irresponsable entre otras. En el Caribe se han descrito aproximadamente 18 enfermedades infecciosas (Garzón-Ferreira et al., 2001), sin embargo, la caracterización y el diagnóstico de la mayoría de ellas aún no son claros ya que durante el inicio de la enfermedad los síntomas son poco diferenciables entre una y otra y solo se puede hacer un diagnóstico preciso en estadios más avanzados (Bourne et al., 2009). Por ejemplo, una zona blanca apareciendo en una colonia coralina puede ser confundida con el blanqueamiento coralino, la Banda Blanca, o la Plaga Blanca y solo hasta etapas avanzadas de la lesión se pueden diferenciar claramente. Otra dificultad

que se presenta en el estudio de ciertas enfermedades coralinas es que de los microorganismos que habitan los tejidos de estos cnidarios, menos del 2% pueden ser cultivados en el laboratorio y por lo tanto los aspectos fisiológicos de estos microorganismos están siendo ignorados. El tercer problema en el estudio de estas patologías es su origen polimicrobial. Muchas de estas enfermedades son el resultado de la acción de consorcios bacterianos y no de un único agente causal, de esta manera se dificulta enormemente el estudio de la patogénesis, como es el caso del consorcio de la enfermedad de la Banda Negra. Se sabe que este consorcio está compuesto principalmente por cianobacterias y en menor abundancia otros grupos como bacterias reductoras y oxidadoras del azufre que contribuyen con la producción y acumulación de sulfuros que son letales para el coral cuando existen condiciones de anoxia (Barneah et al., 2007; Sato et al., 2010; Sekar et al., 2006). Estas comunidades bacterianas, que actúan sinérgicamente, son responsables de actividades fundamentales para los organismos y de esta manera han cambiado la perspectiva de la microbiología clásica con la que se trataban las enfermedades, en las que los postulados de Koch se cumplían satisfactoriamente. Ahora se sabe que muchas de estas enfermedades no cumplen con dichos postulados y por lo tanto la microbiología moderna debe buscar una mirada más holística que abarque otros de los aspectos que llevan al desarrollo de una enfermedad.

Un claro ejemplo de enfermedades coralinas en la cuales no se han logrado cumplir satisfactoriamente los postulados de Koch es en la enfermedad de la Plaga Blanca (EPB). Esta fue descrita por primera vez en 1995, el agente causal solo se reportó hasta 1998 reconociendo inicialmente al bacilo Gram negativo del género *Sphingomonas* como el responsable de esta enfermedad en la Florida (Richardson et al., 1998). No obstante en el 2003 fue reclasificada como *Aurantimonas coralicida*, llevando a la creación de un nuevo género y especie dentro del orden Rhizobiales (Denner et al., 2003). Sin embargo, se cree que el cumplimiento de los postulados no es satisfactorio ya que no se ha logrado evidenciar su presencia en todos los corales enfermos del mundo, además, contradictoriamente se ha detectado en algunas especies de corales sanos (Pantos et al., 2003; Sunagawa et al., 2009). Además, otro agente causal clasificado como *Thalassomonas loyana*, fue reportado en el 2006 para brotes de Plaga Blanca en el arrecife coralino Eilat en Israel, pero esta especie tampoco ha cumplido completamente los postulados de Koch en estudios posteriores de la enfermedad. Por dichas razones se requiere un análisis holístico que tenga en cuenta los diferentes aspectos que pueden llevar a la ruptura de la homeóstasis del holobionte coralino como la inmunidad, factores ambientales y sobre todo, relaciones

entre los organismos que componen esta comunidad como es el caso de la patogénesis causada por enfermedades polimicrobiales. Debido a que los corales mantienen estrechas asociaciones con una gran variedad de microorganismos (algas, dinoflagelados, hongos, virus, bacterias) que albergan sobre sus superficies y tejidos, pequeñas rupturas en alguna de estas interacciones podría tener grandes repercusiones a nivel de la comunidad. Un ejemplo de lo anterior podría ser que la pérdida de una especie lleve a la creación de nichos que favorezcan la colonización de otros microorganismos con un alto potencial de virulencia y estos a su vez establezcan también nuevos nichos para la colonización de nuevos microorganismos que no pertenecen a la comunidad. De esta manera el desarrollo de la enfermedad viene como resultado de la acción sinérgica de diferentes microorganismos. Es por esta razón que el reconocer y entender mecanismos que influyan en la dinámica de las poblaciones bacterianas estudiándolas en comunidad, es un gran aporte al entendimiento de enfermedades como la Plaga Blanca.

Lamentablemente se sabe muy poco de las relaciones que mantiene éste complejo hospedero con sus simbioses bacterianas, sin embargo, se ha postulado que las poblaciones bacterianas que se asocian normalmente con corales son la primera línea de defensa de estos debido a la producción de antibióticos y bacteriocinas que antagonizan con cepas altamente virulentas, controlando la densidad de estas sobre el mucus coralino y de esta forma, el desarrollo de posibles enfermedades (Shnit-Orland and Kushmaro, 2009). Es por esto que las bacterias productoras de antibióticos y bacteriocinas son fundamentales para la regulación de la estructura taxonómica de la comunidad bacteriana. Dentro de las relaciones mencionadas anteriormente existe otra estrategia importante para la regulación de poblaciones bacterianas y su expresión genética y por ende de la salud del coral, el *Quorum Sensing* (QS). El QS es un mecanismo de comunicación celular bacteriana en el que la expresión genética se regula dependiendo de la densidad poblacional y de esta forma interviene en la expresión de diferentes fenotipos en una comunidad bacteriana (Bassler, 1999). En este proceso las bacterias producen y detectan moléculas de señalización extracelulares (generalmente acil homoserín lactonas (AHLs) en bacterias Gram negativas y péptidos en bacterias Gram positivas) para monitorear la densidad celular y sincronizar la expresión de genes. Muchos de los genes regulados por QS están involucrados en la expresión de diversos fenotipos como patogénesis, maduración de *biofilms*, producción de antibióticos y luminiscencia entre otros. Las moléculas de señalización celular cumplen un papel fundamental en la organización de una comunidad

bacteriana, dependiendo de los gradientes de difusión se da la expresión diferencial de genes y de esta manera se logra la creación de grupos funcionales dentro de la comunidad. Además de regular la expresión diferencial de fenotipos en la comunidad, las moléculas de señalización permiten también seleccionar el tipo de individuos que se asocian a ella dando lugar a la estructura de la comunidad, como sucede con muchos macroorganismos que se asientan a una superficie dada dependiendo del tipo de AHLs que detectan en ella (Valle et al., 2004). Vale la pena mencionar que el QS ha sido ampliamente estudiado bajo condiciones de laboratorio principalmente en el marco de la regulación de la expresión de factores de virulencia y que a pesar de que este mecanismo cumple un papel ecológico muy importante en el ensamblaje de comunidades biológicas, muy poco ha sido explorado en este aspecto.

En este trabajo se llevó a cabo la caracterización de la estructura de comunidades bacterianas que pertenecen corales *Siderastrea siderea* y *Diploria strigosa*, por medio de técnicas dependientes e independientes de cultivo como la pirosecuenciación. Se evaluó también el potencial de virulencia de las comunidades bacterianas aisladas del coral sano y del enfermo por medio de la búsqueda de algunos factores de virulencia como proteasas, lipasas y hemolisinas. Finalmente se determinó la presencia de genes involucrados en circuitos de QS de las bacterias cultivables y se relacionó tanto su posible papel en el ensamble de comunidades bacterianas como su papel en la regulación de factores de virulencia.

## 2. ESTADO DEL ARTE

### 2.1 Arrecifes coralinos

Los arrecifes coralinos son llamados usualmente “las selvas del mar” debido a su gran diversidad biológica y debido a que mantienen un cuarto de todas las especies marinas existentes, las cuales se han estimado en un millón de especies aproximadamente. A pesar de que solo ocupan el 1% del piso oceánico podrían competir en diversidad biológica con las selvas amazónicas que ocupan 20 veces más área que los arrecifes de coral (Mulhall, 2009).

La base estructural de los arrecifes de coral son los corales escleractinios, ya que estos son capaces de tomar el calcio disuelto en el mar y secretar carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) para formar esqueletos duros y así construir las estructuras naturales conocidas como arrecifes coralinos (Castro and Huber, 2003). Los corales son organismos marinos que pertenecen al phylum Cnidaria en donde se agrupan también las anémonas y medusas. Allí se ubica la Clase Anthozoa, caracterizada por presentar forma de pólipo solitario o colonial que no tiene la forma medusa como si lo tienen las otras clases del phylum Cnidaria.

Debido a la gran diversidad biológica que sustentan los arrecifes coralinos, son una importante fuente de ingresos por turismo, pesca y obtención de moléculas bioactivas usadas en la industria farmacéutica entre otras. Lamentablemente estos ecosistemas son muy frágiles y son vulnerables a actividades humanas como la sobrepesca, la contaminación, el desarrollo de costas y por supuesto a la aceleración del cambio climático (Moore and Best, 2009). Por consiguiente, la pérdida de estos ecosistemas causaría daños ecológicos severos debido a la desaparición de una gran cantidad de organismos que mantienen asociaciones mutualistas como peces, moluscos, crustáceos, entre muchos otros que incluyen también bacterias, virus, hongos y la bien documentada simbiosis obligada entre los dinoflagelados (zooxanthellae) y los corales. Estas numerosas asociaciones han llevado a la incorporación del término holobionte (Bourne et al., 2009), en estudios de estos ecosistemas, que hace referencia al hospedero y a todos sus simbioses representantes de los tres dominios: Eukarya, Bacteria, Archaea y a las relaciones dinámicas entre ellos (Rosenberg et al., 2007). De manera que cada uno constituye papeles

importantes en la homeóstasis de este sistema y si ocurre la pérdida de alguno de los miembros que compone este sistema, puede comprometer la salud del holobionte. Cabe resaltar aquí que los microorganismos son fundamentales en la supervivencia de este holobionte, de ahí que la microbiología coralina ha empezado a incorporarse fuertemente como un nuevo campo de investigación en el que se promueve el estudio del holobionte frente a la problemática actual de pérdida de arrecifes coralinos.

## **2.2 Siderastrea siderea**

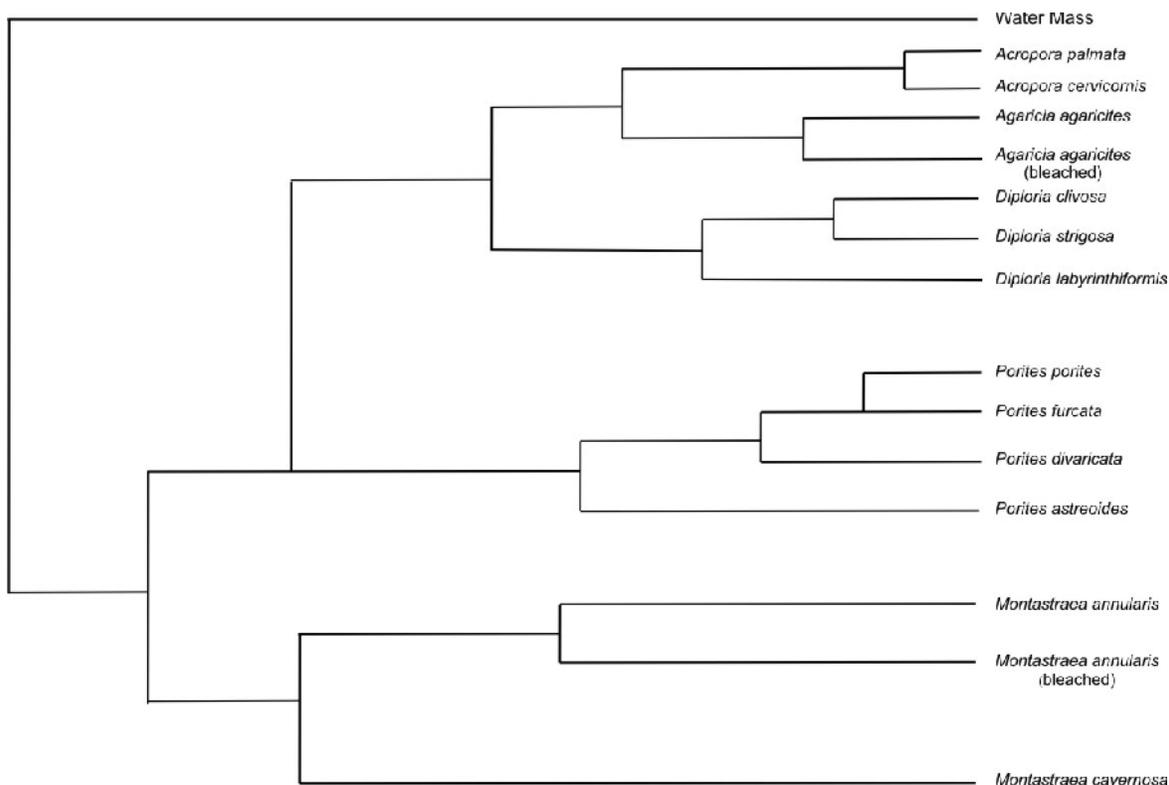
El género *Siderastrea* hace parte de la familia Siderastreidae y tiene 4 especies representantes: *Siderastrea glynnii*, *S. radians*, *S. savignyana* y *S. siderea*. Esta última fue reportada en 1786 por Ellis y Solander (ITIS, 2011). Forma colonias incrustantes a masivas, de más de 2 m de diámetro y habita en áreas arrecifales someras y protegidas (Reyes et al., 2010). Los *coralites* tienen de 44 a 55 septos, compactos y estrechos de 3 a 5 mm de diámetro. Se distribuye en Florida, el Caribe y las costas de Brazil entre 0.5 y 70 m de profundidad (Neves et al., 2010). La coloración es gris claro o entre amarillo y café ocre. En Colombia esta especie se encuentra ampliamente distribuida a lo largo de la costa del Caribe y la zona insular entre 2.5 y 18 m de profundidad (Reyes et al., 2010). Es una especie dominante que presenta densidades superiores a cuatro colonias por metro cuadrado y altos valores de cobertura. Puede formar 2 tipos de unidades ecológicas, una con el coral *Millepora complanata*, que es característica de aguas con altos niveles de sedimentación y la otra unidad es mixta con corales *Diploria* sp. y *Colpophylia* sp (Salazar, 2007). *Siderastrea siderea* tiene reproducción asexual y sexual. En la sexual hay liberación de gametos al medio para la fertilización externa durante el periodo de Julio a Septiembre (Soong, 1993). En este coral solo se encuentran reportes de la composición de comunidades bacterianas durante la enfermedad de la Banda Negra y aun no existen estudios sobre la diversidad de sus microsimbiontes.

### 2.3 *Diploria strigosa*

El género *Diploria* hace parte de la Familia Faviidae y se compone de las 3 especies: *Diploria strigosa*, *D. labyrinthiformis* y *D. clivosa*. *D. strigosa* fue reportada por Dana en 1846 (ITIS, 2011). Es un coral cerebro con colonias meandroides, masivas o incrustantes, de crecimiento hemisférico o placoide que alcanzan diámetros superiores a los 2 m. Los *coralites* tienen de 12 a 24 septos por centímetro formando 3 ciclos completos. Hay una columna continua entre los diferentes centros de los *coralites*. La coloración de las colonias es amarillo a verde café con tonalidades azulosas a púrpuras (Reyes et al., 2010). Se distribuye en el Caribe, las Bahamas y la Florida; En el Caribe colombiano se encuentra ampliamente distribuido tanto en la zona insular como continental, entre 1 y 20 m de profundidad (Reyes et al., 2010) Hace parte de las especies con mayor cobertura en las formaciones arrecifales de la bahía de Santa Marta (Vega-Sequeda et al., 2008). En esta especie de coral se han realizado estudios que evalúan la adquisición de células bacterianas durante el desove, pero hasta el momento solo se han realizado análisis acerca de la composición de sus microsimbiontes en durante la enfermedad de la Banda Negra.

### 2.4 Microbiología de corales

La microbiología es un aspecto fundamental en la biología de los corales ya que una gran diversidad de microorganismos distribuidos en numerosos taxones han co-evolucionado con su hospedero estableciendo relaciones muy específicas con estos. Por ejemplo, se sabe que el mantenimiento de relaciones específicas ha hecho que las comunidades microbianas presentes en la columna de agua, las de los epibiontes y las de los endosimbiontes coralinos sean muy diferentes (Ritchie and Smith, 2004). Como ejemplo de ello, en la figura 1 se muestra un dendograma que ilustra las relaciones entre diferentes especies de corales basadas en la composición de la comunidad microbiana y las características metabólicas de esta. El dendograma muestra como la composición taxonómica y las propiedades metabólicas de comunidades bacterianas asociadas con corales son específicas y difieren de la composición bacteriana de la columna de agua. Las agrupaciones reflejan las relaciones filogenéticas de los corales ya que las especies de cada género de corales (*Acropora*, *Agaricia*, *Porites*, *Montastrea* y *Diploria*) se agrupan en clados definidos y consistentes con la filogenia de estos corales a este nivel taxonómico.



**Figura 1. Dendrograma de especies coralinas basado en la composición de las comunidades microbianas y sus características metabólicas.** Tomado y modificado de (Ritchie and Smith, 2004)

Muy poco se sabe de la capacidad metabólica de la gran diversidad de microorganismos asociados con los corales y de los mecanismos de interacción entre ellos. Por ejemplo en el caso de las bacterias la función que desempeñan para beneficiar tanto a los corales como a otros simbioses asociados como zooxantelas está muy poco explorada (Ritchie, 2006). Sin embargo, se sabe que la colonización bacteriana en la superficie del coral se da en etapas tempranas de su desarrollo, como se mostró en un estudio realizado en el 2010 (Sharp et al., 2010). En dicho estudio se usaron sondas fluorescentes dirigidas a la región del gen ribosomal 16S específicas para Eubacteria sobre gametos, larvas y pólipos con el fin de evidenciar la densidad y localización de bacterias en cada caso. Los resultados de esta investigación evidenciaron que durante el estado nadador de larva, antes del asentamiento, los corales adquieren escasas poblaciones bacterianas que influyen en la posterior colonización después del asentamiento (Sharp et al., 2010). A partir de este punto

y durante todo el desarrollo ontogénico del coral, la composición de las comunidades bacterianas varía en respuesta a los cambios en ciclo de vida y a factores ambientales. De estos últimos se sabe que tienen fuerte influencia en la modulación de la estructura de comunidades bacterianas como lo evidencian diversos estudios. El más reciente de ellos, realizado en el 2009 en *Porites compressa*, evaluó variaciones en la estructura de las comunidades bacterianas como respuesta a cambios en la temperatura, el pH, el carbono orgánico disuelto y la concentración de nutrientes. Los resultados de este estudio revelaron cambios significativos en la composición taxonómica de las comunidades bacterianas después de variaciones en cada uno de estos 4 factores ambientales, resaltando la influencia de las condiciones ambientales en el ensamblaje de una comunidad bacteriana desde el momento de la colonización (Thurber et al., 2009).

Un punto importante en el estudio de composición bacteriana de corales y otras especies animales y vegetales ha sido el desarrollo de técnicas independientes de cultivo, en particular el uso de técnicas moleculares clásicas basadas en la secuencia del gen 16S rADN como las librerías de clonación, métodos de bandeo por huella digital (*fingerprinting*) e hibridación fluorescente *in situ* (FISH), así como las técnicas de secuenciación de última generación como la pirosecuenciación. Gracias a estas metodologías hay un mejor acercamiento y una descripción más detallada de la composición de la microbiota asociada con diversas especies coralinas. Por ejemplo en el estudio de Olson y colaboradores (2010), por técnicas independientes de cultivo como librerías de clonación de 16S rADN y FISH se logró establecer que el phylum bacteriano más dominante en corales es Proteobacteria en donde las clases más abundantes son Gammaproteobacteria y Alphaproteobacteria. Otros phyla como Firmicutes, Bacteroidetes, Planctomycetes, Actinomycetes, y Cyanobacteria están presentes en frecuencias más bajas (Olson and Kellogg, 2010).

De forma independiente y a pesar de que aún no existen metodologías que permitan recuperar más del 2% de diversidad bacteriana total de la muestra en el laboratorio, se han logrado caracterizar las comunidades bacterianas cultivables de corales y se han encontrado frecuentemente miembros pertenecientes a las familias Vibrionaceae y Alteromonadaceae.

La presencia de determinados taxones es un producto de las relaciones de coevolución entre el coral y sus simbioses, no obstante, poco se sabe de los procesos de selección que favorecen un taxón determinado. Sin embargo, algunos estudios han dado a conocer que

la composición del mucus coralino, que es secretado por las células epidermales y depositado en la superficie del coral, está estrechamente relacionada con las comunidades que se asientan en él y que esta varía de una especie a otra (Ritchie and Smith, 2004). Esta secreción está compuesta mayoritariamente por glicoproteínas que forman un gel elástico, convirtiéndose en una fuente rica de nutrientes que incluyen fuentes de nitrógeno y fósforo para episimbiontes bacterianos (Ducklow and Mitchell, 1979). En contraprestación, algunos de los beneficios conocidos que brindan las bacterias son la transformación de  $N_2$  atmosférico a otros estados disponibles para el coral, la transformación de nutrientes y la defensa contra potenciales patógenos (Knowlton and Rohwer, 2003). Por ejemplo de este último beneficio se han propuesto hipótesis complementarias en donde se plantea que el mucus coralino es el espacio en donde se efectúan constantemente relaciones de competencia por espacio y nutrientes, basadas en la producción de moléculas como antibióticos (Shnit-Orland and Kushmaro, 2009). Otra forma de defensa que ejercen las bacterias es la de regulación del asentamiento de organismos marinos como larvas de invertebrados, esporas de algas y hongos sobre la superficie de su hospedero, un ejemplo de ello es el caso del alga *Ulva australis* que está libre de macroorganismos asociados a su superficie. Se ha postulado que esta propiedad recae principalmente en dos bacterias presentes en su superficie: *Pseudoalteromonas tunicata* y *Roseobacter gallaeciensis*, ya que en ensayos *in vitro* demostraron inhibir el asentamiento de diferentes organismos cuando se encontraba densidades poblacionales bajas (Rao et al., 2007).

Además, en el 2008, el genoma de *P. tunicata* fue secuenciado mostrando una variedad de genes homólogos a aquellos que codifican para factores de virulencia como quitinasas, adhesinas, pilis, y lipoproteínas involucradas en la toma de ADN foráneo, que pueden establecer papeles fundamentales en la colonización, adhesión y transferencia horizontal de genes (Thomas et al., 2008). Esto sugiere que esta especie además del control poblacional que ejerce hacia otros organismos, tienen la posibilidad de establecer relaciones antagonistas con estos y/o con su hospedero, bajo un escenario aún desconocido.

## 2.5 Enfermedades coralinas

En los últimos 30 años los arrecifes coralinos han sufrido un deterioro considerable por diferentes causas, entre ellas la actividad humana como la sobre pesca y la polución y por

cambios en las condiciones ambientales como se mencionó anteriormente. De acuerdo con Reshef y colaboradores (2006) las poblaciones de corales han disminuido en un 30% como resultado del incremento de enfermedades infecciosas (Reshef et al., 2006). Entre estas, se han descrito más de 20 enfermedades coralinas que están causando un dramático declive poblacional que no había sido reportado anteriormente (Gil-Agudelo et al., 2009). La primera enfermedad en ser descrita fue el blanqueamiento coralino, sin embargo, a pesar de ser la más estudiada hasta el momento es aún la enfermedad más destructiva. Sucede por el desplazamiento del endosimbionte dinoflagelado *Symbiodinium*, causando la pérdida del color, no obstante, cuando el coral supera las condiciones adversas puede volver a ser colonizado por los dinoflagelados y retomar su color (Douglas, 2003). Se ha demostrado que el desplazamiento del dinoflagelado puede ocurrir por diferentes vías. La primera de ellas es debido a la bacteria *Vibrio shiloi*, esta se une a receptores presentes en el mucus coralino que son ricos en -galactósidos, una vez se adhiere, penetra en las células epiteliales y allí se multiplica y produce un péptido rico en prolina que actúa como toxina inhibiendo la fotosíntesis de los dinoflagelados (Rosenberg and Falkovitz, 2004). *Vibrio coralliilyticus* también fue reportado como agente capaz de desencadenar la enfermedad, pero solo a temperaturas superiores a 26°C (Ben-Haim et al., 2003) sin embargo, se sabe que existen factores ambientales capaces de desarrollar la enfermedad como la salinidad, la temperatura, la radiación UV (Rosenberg et al., 2009). Lo anterior sugiere que ciertos factores ambientales pueden estar potenciando el crecimiento de ciertos microorganismos, activando la expresión de factores de virulencia y/o llevando al coral a estrés fisiológico lo que puede conducir rápidamente al blanqueamiento coralino. Así mismo Bourne y colaboradores en el 2008 detectaron mediante un perfil de bandeo de genes de 16S a través de una electroforesis en gel de gradiente denaturalizante (DGGE) un cambio en la estructura de comunidades bacterianas después de un evento de blanqueamiento, que era caracterizado por un aumento de clones pertenecientes al género *Vibrio* (Bourne et al., 2008)

Otras enfermedades se han relacionado directamente con un agente específico como el hongo *Aspergillus sydowii* para la aspergilosis (Geiser et al., 1998), la enterobacteria *Serratia marcescens* para la enfermedad de los lunares blancos (Patterson et al., 2002) y *Vibrio alginolyticus* para la enfermedad de los parches amarillos (Cervino et al., 2004). No obstante hay incertidumbre acerca de los experimentos por los cuales han demostrado el cumplimiento de los postulados de Koch para estos agentes etiológicos, debido a que en los ensayos *in vitro* usan inóculos de cuestionable relevancia ecológica (más de 10<sup>8</sup>

UFC/ml) que corresponden a órdenes de magnitud 2 o 3 veces mayores que los estimados para las bacterias totales en el mucus coralino ( $10^5$  -  $10^6$  células/ml) (Lesser et al., 2007; Rosenberg et al., 2007; Sweet et al., 2011). En cambio hay otras enfermedades en las que no han podido comprobar los postulados de Koch completamente, como es el caso de la enfermedad de la Banda Negra, la Banda Blanca, los Lunares Oscuros, la Banda Amarilla, la Banda Café, la Línea Rosa, manchas ulcerativas amarillas y tumores entre otras. Esto es debido probablemente a su origen polimicrobial, a la imposibilidad de cultivar el agente causal en el laboratorio o a un desequilibrio que cause comportamientos atípicos de la microbiota normal del coral. Además, para la gran mayoría de estas enfermedades no se conocen tampoco los mecanismos de virulencia, ni los co-factores ambientales que favorecen su aparición, sin embargo, hay un creciente número de publicaciones (para revisión: (Koren and Rosenberg, 2008; Littman et al., 2010; Mao-Jones et al., 2010; Sato et al., 2010; Voss et al., 2007)) en los últimos 10 años enfocadas al estudio de las comunidades bacterianas asociadas a corales enfermos, con el fin de establecer patrones generales para las enfermedades y postular consorcios de bacterias involucrados en la patogénesis. Incluso hay autores que proponen que las enfermedades coralinas son una consecuencia de un estado de estrés que enfrenta el coral, en el cual se reduce su resistencia y desaparecen los controles inmunológicos que regulan el crecimiento incontrolado de ciertas poblaciones bacterianas (Lesser et al., 2007). En resumen, hay incertidumbre sobre la etiología de las enfermedades y la interacción de los múltiples factores que están influyendo en el desarrollo de estas, por eso se requiere una mirada desde diferentes escalas que integre el estudio de la estructura de comunidades bacterianas, el potencial de virulencia, la inmunidad, la resistencia, las interacciones microbianas, los factores ambientales, entre muchos otros.

### **2.5.1 La enfermedad de la Plaga Blanca (EPB)**

El primer reporte de la enfermedad fue realizado durante un brote de la misma en los cayos de Florida (Estados Unidos) (Dustan, 1977) 10 años más tarde en 1987 le asignaron el nombre de Plaga Blanca diferenciándola del blanqueamiento coralino (Dustan and Halas, 1987). En 1997 se realizó la primera descripción sintomática de la enfermedad caracterizada por el desprendimiento del tejido coralino que expone el esqueleto del cnidario, dejando una línea de tejido marcada entre el tejido sano y el esqueleto expuesto (Santavy and Peters, 1997). En 1998 a partir de especímenes recolectados en un brote que

ocurrió en el 1995, se establecieron 3 tipos de Plaga Blanca basados en la tasa de crecimiento del tejido afectado. Para la Plaga Blanca tipo I se reportaron velocidades máximas de crecimiento de 3,1 mm/día, para la Plaga Blanca tipo II tasas de aproximadamente 2 cm por día y para la Plaga Blanca tipo III, velocidades mucho mayores a los otros dos tipos (Gil-Agudelo et al., 2009). Sin embargo, existen estudios anteriores en regiones diferentes al Caribe que reportan la aparición de brotes muy similares al de la Plaga Blanca pero referida como la enfermedad de la Banda Blanca, estas inconsistencias están relacionadas con la dificultad que existe aún para diagnosticar o diferenciar a tiempo ambas enfermedades dadas las descripciones inespecíficas de signos y síntomas que existen para cada una, lo cual es común en enfermedades coralinas (Antonius, 1981; Coles, 1994; Riegl, 2002). El primer reporte acerca de un posible agente causal se realizó utilizando aislamientos bacterianos del coral *Dichocoenia stokesi*, recolectados durante el brote de la Florida en 1995 (Richardson et al., 1998). Una bacteria que estaba presente solo en el coral enfermo fue identificada como una especie nueva perteneciente al género *Sphingomonas*. En el 2003, se reclasificó taxonómicamente y se propuso un nuevo género llamado *Aurantimonas* dentro de la familia Aurantimonadaceae (Rhizobiales) nombrando la nueva especie como *Aurantimonas coralicida*, un bacilo Gram negativo, aerobio estricto, halófilo de colonias naranjas (Denner et al., 2003). Esta bacteria fue encontrada también en la microbiota normal del alga *Halimeda opuntia*, acusándola de ser el reservorio natural del agente causal de la enfermedad de la Plaga Blanca (Nugues et al., 2004) sin embargo, en el 2005 hubo un reporte postulando un nuevo agente causal de esta enfermedad en el arrecife coralino Eilat en Israel. En esta oportunidad a partir de experimentos en acuarios con condiciones controladas, se logró identificar un bacilo Gram negativo que era capaz de desencadenar rápidamente los síntomas de la enfermedad de la Plaga Blanca en un coral sano, pero solo hasta el 2006 fue posible hacer el aislamiento de esta bacteria para realizar su caracterización molecular que permitió identificarla como *Thalassomonas loyana*, un bacilo Gram negativo, con división asimétrica y de colonias color crema (Barash et al., 2005; Thompson et al., 2006). Una vez identificaron esta cepa, se desarrolló una terapia para el control de la enfermedad basada en el fago BA-3, capaz de lisar selectivamente las células de *Thalassomonas loyana* y evitar la propagación y desarrollo de la enfermedad. Para su comprobación inocularon corales de la especie *Favia fava* con la bacteria y realizaron tratamientos adicionando el fago a diferentes tiempos a partir de la infección. De esta manera, los corales que fueron tratados con el fago inmediatamente o 1 día después de la

infección no desarrollaron la enfermedad en contraste con los que fueron tratados después de 24 horas de haber sido infectados (Efrony et al., 2009).

El primer estudio basado en la composición de la comunidad bacteriana de un coral con la enfermedad de la Plaga Blanca, se realizó en *Montastrea annularis* utilizando librerías del gen 16S rADN (Pantos et al., 2003). En este estudio no detectaron ninguno de los agentes causales reportados anteriormente pero fue posible establecer cambios en la composición de especies de la microbiota del coral. Los resultados mostraron principalmente un aumento en secuencias que tenían alto grado de similaridad con aquellas secuencias que habían sido reportadas anteriormente por pertenecer al consorcio causante de la enfermedad de la Banda Negra. Con base en estos resultados, se propuso que la presencia de estas especies podría servir como un bioindicador de condiciones de estrés y enfermedad. En el 2008 se diseñó una metodología para llevar a cabo la detección de las especies bacterianas que han sido catalogadas como agentes etiológicos de diferentes enfermedades, por medio de una amplificación de regiones específicas del gen ribosomal 16S rADN de dichas especies, a partir de la muestra total del coral. Los resultados mostraron que no en todas las muestras de corales enfermos con Plaga Blanca se podía detectar *A. coralicida* y además que esta especie se encontraba en algunas de las muestras sanas de corales como *Acropora palmata* y *Acropora cervicornis* (Polson et al., 2008). Con este estudio se demostró que no es necesaria la presencia de *A. coralicida* para el desarrollo de la enfermedad debido a que muchos corales enfermos carecían de esta cepa y tampoco es suficiente su presencia para desarrollar dicha enfermedad en los casos de corales sanos estudiados.

El estudio más reciente en el tema de la microbiología de la Plaga Blanca fue realizado en el 2009 por Sunagawa y colaboradores (2009) (Sunagawa et al., 2009), en el cuál se compararon comunidades bacterianas asociadas con *Montastraea faveolata* sano y con Plaga Blanca. En el estudio se encontraron patrones de desestabilización de la microbiota en corales enfermos similares a los reportados por Pantos y colaboradores (2003), que incluían un aumento en individuos de las familias Rhodobacteraceae y Alteromonadaceae (Pantos et al., 2003)

Todos estos argumentos nos llevaron a comparar la composición de la bacteriobiota asociada con dos especies de corales pertenecientes a géneros diferentes a *Montastrea*: *Siderastrea siderea* y *Diploria strigosa* del Caribe colombiano sanos y con la enfermedad de la Plaga Blanca. La caracterización de la estructura se realizó a diferentes niveles

taxonómicos y se establecieron patrones comunes con los reportes de los estudios basados en la composición de OTUs (Del inglés: *Operational Taxomic Unit*).

## 2.6 *Quorum Sensing*

Cómo se mencionó anteriormente las comunidades de microorganismos presentes en el mucus juegan un papel indiscutible en la salud y resistencia de los holobiontes coralinos. El mucus además de albergar numerosas fuentes de carbono para permitir el asentamiento de microorganismos, también tiene un papel en el reservorio de señales químicas que modulan la expresión genética tanto de los microsimbiontes como del coral (Alagely et al., 2011). Por esta razón el mucus es considerado el principal microhábitat en donde se establecen diferentes tipos de relaciones ecológicas importantes en la dinámica poblacional, por ejemplo, es el principal reservorio de antibióticos producidos por diversos grupos bacterianos para antagonizar con potenciales patógenos (Shnit-Orland and Kushmaro, 2009). Sin embargo existen otros mecanismos que también regulan la dinámica poblacional y que son un factor importante en la selección y evolución de las relaciones simbióticas en el sistema del holobionte, como es el caso de la maduración del sistema inmune y la comunicación celular bacteriana o *Quorum Sensing* (QS). Este último cumple un papel fundamental en la regulación de la dinámica de las poblacionales durante el establecimiento de la estructura de comunidades bacterianas, sin embargo, ha sido muy poco estudiado en este contexto.

El QS es la regulación de la expresión genética que depende de la densidad celular bacteriana y de la difusión de la molécula señal. Este mecanismo ha permitido que las bacterias adopten un comportamiento social por medio de la detección de otras bacterias (otras especies en el caso de comunidades multiespecie) presentes en el entorno. Se conocen a profundidad los mecanismos por los cuales las bacterias aumentan su adaptación o *fitness* (habilidad de sobrevivir y reproducirse) a través de la sincronización de la expresión de diversos fenotipos como factores de virulencia, bioluminiscencia, motilidad, pigmentos, maduración de *biofilms* etc, por medio de moléculas autoinductoras (por lo general N-acil homoserín lactonas en Gram negativas y péptidos en Gram positivas) (Ng and Bassler, 2009). En bacterias Gram negativas el primer circuito de QS en ser reportado fue el de *Vibrio fischeri* para la producción de bioluminiscencia (Sitnikov et al., 1995). *V. fischeri* mantiene una relación simbiótica con el calamar gigante *Euprymna*

*scolopes*. Este calamar desarrolla un órgano de luz en su estado juvenil al ser colonizado por la bacteria. En este órgano *V. fischeri* tiene los nutrientes necesarios para vivir y multiplicarse hasta alcanzar altas densidades poblacionales y de esta manera activar la bioluminiscencia con un mecanismo dependiente de la densidad celular como se explicará más adelante. El calamar aprovecha la producción de luz para repeler a sus depredadores y para el cortejo. Cuando no es necesaria la producción de luz, el calamar libera células de *V. fischeri* al medio lo que disminuye su densidad celular al interior del órgano de luz (Ruby and Lee, 1998).

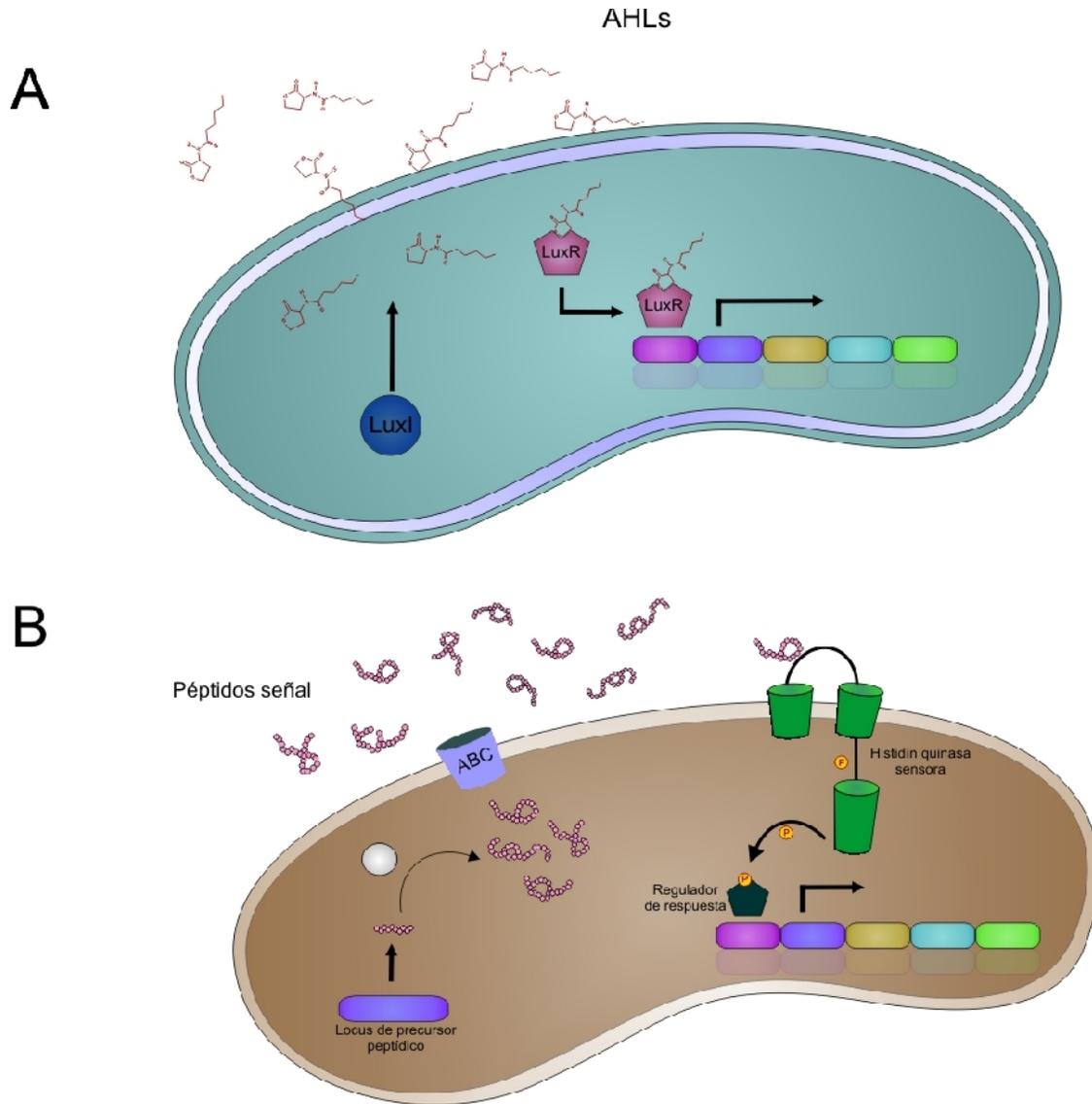
El circuito para la producción de la bioluminiscencia se compone del gen *luxI* que es el encargado de codificar proteínas llamadas sintetasas de acil homoserín lactonas. Las Acil homoserin lactonas (AHLs) se difunden libremente al espacio extracelular a través de las membranas, acumulándose en el medio hasta alcanzar la concentración necesaria para su unión con el factor de transcripción LuxR de células adyacentes, de esta manera la unión estable de LuxR con las AHLs permite la transcripción de los genes de bioluminiscencia. Homólogos de *luxI* y *luxR* han sido encontrados en numerosos organismos pertenecientes al phylum Proteobacteria regulando una gran cantidad de fenotipos como los mencionados anteriormente (Case et al., 2008; Gray and Garey, 2001). A diferencia de las bacterias Gram negativas, en las Gram positivas los péptidos de señalización son transportados extracelularmente por transportadores tipo ABC y son reconocidos en la membrana externa de las células bacterianas por moléculas receptoras tipo histidín quinasa que se autofosforilan desencadenando una cascada de fosforilación para activar a los factores de transcripción de tipo LuxR, regulando así la expresión de diversos fenotipos como la esporulación y competencia en *Bacillus subtilis* (Schultz et al., 2009) la secreción de toxinas y proteasas de *Staphylococcus aureus* (Novick, 2003) y la toxina citolítica de *Enterococcus faecalis* (Haas et al., 2002) , entre otras. Los circuitos generales de QS en Gram negativas y Gram positivas están representados en la figura 2.

Un ejemplo de la relación entre la consolidación de las comunidades bacterianas y el QS es el control que este mecanismo ejerce en la formación de *biofilms* bacterianos; gracias a la detección de moléculas autoinductoras propias y no propias se genera la diferenciación celular bacteriana y la distribución de funciones metabólicas. A pesar de su importancia solo algunos estudios han buscado entender el efecto que tienen las moléculas señalizadoras con la estructura de la comunidad bacteriana. Un ejemplo de esto es de un estudio realizado en el 2005 en donde los investigadores sumergieron tubos de diálisis con diferentes AHLs

(C8-AHL y 3-O-AHL) y sin AHL a un lago y posteriormente analizaron la composición de las comunidades bacterianas en cada tubo. Los resultados de este estudio mostraron que la composición de las bacterias que se asentaron en cada tubo variaban drásticamente dependiendo de la presencia o ausencia de AHLs. También encontraron que la estructura de la comunidad cambiaba considerablemente debido al tipo de molécula usada (McLean et al., 2005). Lo anterior sugiere que las bacterias se asientan en una superficie dependiendo del tipo de AHLs presentes y esto a su vez depende de la composición de la comunidad bacteriana de dicha superficie. Otro ejemplo lo reportan Valle y colaboradores (2004) en el que mostraron que al adicionar extractos de AHLs se dan cambios en la estructura de las comunidades bacterianas ya establecidas en diferentes lodos activados. El resultado más destacado de esta investigación fue la desaparición de miembros del género *Thaurea* y su reemplazo por miembros del género *Comamonas* en respuesta a la adición de AHL de aislamientos pertenecientes al phylum Proteobacteria (Valle et al., 2004). El concepto de QS se podría extender en muchos casos a la regulación de la expresión genética en diferentes reinos, ya que existen numerosos reportes en los que se reconoce la comunicación entre bacterias y eucariotas mediada por AHLs (Davis et al., 2010; Hughes and Sperandio, 2008). Algunos ejemplos de estos reportes son la inducción de la producción de interleucina 8 en células epiteliales bronquiales y monocitos debido a la 3-O-C12-AHL producida por *Pseudomonas aeruginosa* (DiMango et al., 1995). El asentamiento de zoosporas de algas y larvas de cnidarios, debido a las AHLs presentes en la superficie como el caso del alga verde *Ulva* sp., y su atracción por los biofilms de *Vibrio anguillarum* dada la producción de C6-AHL (Joint et al., 2007; Tait et al., 2009) y la expresión de más de 150 proteínas diferencialmente expresadas por la legumbre *Medicago trunculata* debido a la presencia de 3-O-C12-AHL y 3-O-C16:1-AHL producidas por *Sinorhizobium melliloti*, las cuales están en su mayoría involucradas en el proceso de nodulación (Mathesius et al., 2003) A pesar de que son numerosos los estudios que han determinado la importancia de la producción de AHLs en la estructura de una comunidad y en la interacción con su hospedero, aún hace falta conocimiento acerca de los mecanismos por los cuales las bacterias censan otras especies bacterianas y regulan la expresión de células eucariotas dada la producción de AHLs en la dinámica y ensamblaje de las comunidades bacterianas asociadas con organismos superiores.

En este estudio se plantea realizar una búsqueda de componentes involucrados en circuitos QS en la comunidad cultivable, con el fin de comparar la presencia de estos en corales sanos y enfermos. Se pretende relacionar lo anterior con la frecuencia de algunos factores

de virulencia también asociados a las comunidades cultivables tanto de bacterias procedentes de corales enfermos como sanos para así poder establecer alguna relación entre el potencial de virulencia y posibles mecanismos de regulación de la expresión de factores de virulencia que tiene cada comunidad.



**Figura 2. Esquema generalizado de circuitos de QS en bacterias Gram negativas y Gram positivas.** A) Sistema de QS en bacterias Gram negativas: LuxI es una sintetasa de acil homoserín lactonas (triángulos amarillos) las cuales son capaces de difundirse libremente por la membrana. Cuando se alcanza una alta densidad poblacional, estos autoinductores se acumulan y son capaces de unirse establemente a LuxR que es el factor de transcripción, permitiendo la expresión de diversos fenotipos. B) Sistema de QS en bacterias Gram positivas: La molécula autoinductora no es una acil homoserín lactona sino un péptido (círculos rosados) que es transportado al exterior generalmente por un sistema de transporte tipo ABC. Cuando se alcanza una alta densidad poblacional, los péptidos se acumulan en el medio y son censados por un sistema de dos componentes que desencadena la activación de un factor de transcripción para permitir la expresión de diversos fenotipos.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

A pesar del incremento en el estudio de las enfermedades coralinas en los últimos 10 años, el conocimiento que se tiene de su origen y desarrollo e incluso la información existente para su diagnóstico preciso aún son insuficientes. Para poder entender el deterioro de los arrecifes coralinos es necesario estudiar las causas que están favoreciendo la aparición de enfermedades y entender cuál es el papel de los microorganismos en la salud del coral. Para la enfermedad de la Plaga Blanca tipo II, una de las enfermedades más prevalentes en Colombia, aún está en debate si la etiología es el efecto de la presencia de un microorganismo en particular, ya que se presume la participación de múltiples agentes involucrados en esta enfermedad. Sin embargo, las causas por las cuales se desarrolla la misma todavía son desconocidas. Es por esta razón que surge la necesidad de hacer estudios microbiológicos que tengan en cuenta la caracterización del microbioma de corales enfermos y sanos para entender la dinámica de las poblaciones en ambos estados, los mecanismos de virulencia por los cuales se desarrolla la enfermedad, factores ambientales que podrían estar potenciando la patogénesis, respuestas fisiológicas e inmunológicas del coral frente a la infección, entre otros aspectos aun poco explorados para la Plaga Blanca.

Por esta razón se planteó analizar la estructura de la comunidad bacteriana en dos especies de corales de diferentes géneros, *Siderastrea siderea* y *Diploria strigosa*, enfermos y sanos para poder establecer patrones comunes y diferenciales en la enfermedad y comparar así también esta estructura con reportes previos para otras partes del mundo. Se planteó también relacionar el cambio en la estructura de la comunidad con el QS para establecer una hipótesis sobre la influencia de este mecanismo en la estructura taxonómica y la virulencia durante la enfermedad.

Todo lo mencionado anteriormente nos llevó a la siguiente pregunta de investigación:

¿Existen cambios estructurales en las comunidades bacterianas, en sus mecanismos de comunicación y en su potencial de virulencia entre corales sanos y enfermos en dos especies (*Siderastrea siderea* y *Diploria strigosa*) del mar Caribe colombiano afectadas con Plaga Blanca tipo II?

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 General

Comparar la estructura de la comunidad bacteriana, los mecanismos de comunicación y la presencia de algunos factores de virulencia en comunidades bacterianas presentes en corales *Siderastrea siderea* y *Diploria strigosa* sanos y con la enfermedad de La Plaga Blanca, aislados del mar Caribe colombiano

### 4.2 Específicos

- Caracterizar la estructura de la comunidad bacteriana perteneciente a individuos de corales *Siderastrea siderea* y *Diploria strigosa* sanos y enfermos con Plaga Blanca tipo II por medio de técnicas independientes de cultivo.
- Caracterizar la estructura de la comunidad bacteriana perteneciente a individuos de corales *Siderastrea siderea* y *Diploria strigosa* sanos y enfermos con Plaga Blanca tipo II por medio de técnicas dependientes de cultivo.
- Evaluar patrones de presencia de genes relacionados con circuitos de *Quorum Sensing* en las poblaciones de bacterias cultivables procedentes de corales enfermos y sanos
- Determinar la presencia de algunos factores de virulencia en cepas aislables de corales sanos y enfermos.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Toma de muestras

La profesora Valeria Pizarro de la Universidad Jorge Tadeo Lozano, fue la persona que llevó a cabo el muestreo en la isla Punta Aguja (11°18'57"N, 74°11'41"W) del Parque Nacional Natural Tayrona en octubre de 2009 durante un brote de la enfermedad. Las condiciones ambientales durante la colecta fueron típicas de temporada de lluvia con baja concentración de nutrientes, baja salinidad y baja visibilidad. La temperatura en el momento de recolección fue de 28°C, sin embargo, para esta temporada puede variar de 21 a 31°C. Para la recolección se utilizó un martillo y un sacabocados para remover los fragmentos que fueron rellenados con cemento especial después de la extracción, con el fin de evitar daños en los tejidos del coral. Se recolectaron fragmentos pertenecientes a 5 colonias diferentes tanto de corales con síntomas de la enfermedad como de corales asintomáticos (3 fragmentos para extracción de DNA y 2 para obtención de aislamientos por cada muestra para un total de 20 fragmentos) de corales *Siderastrea siderea* y *Diploria strigosa*. Los fragmentos tenían dimensiones aproximadas de 2x2 cm, fueron tomados de la interface entre el tejido sano y el esqueleto expuesto; el área de la específica de la interface se observa en la figura 3, e inmediatamente fueron transportados en bolsas estériles al laboratorio de la Universidad Jorge Tadeo Lozano en El Rodadero, Magdalena. Una vez en el laboratorio, los fragmentos fueron lavados sucesivamente 3 veces con agua estéril para eliminar la contaminación proveniente de la columna de agua. El agua utilizada en el último lavado fue sembrada en agar LB y agar marino para corroborar que las bacterias de la columna de agua había sido removidas.



**Figura 3. Fotografía *Siderastrea siderea* afectada con la enfermedad de la Plaga Blanca tipo II durante un brote en octubre de 2009.** Foto tomada por la profesora Valeria Pizarro de la Universidad Jorge Tadeo Lozano

## **5.2 Extracción de ADN, PCR y secuenciación.**

### **5.2.1 Extracción del ADN total a partir de muestras de corales**

Inmediatamente después de la recolección, se maceraron 3 fragmentos de coral provenientes de cada muestra por separado en buffer PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM y un pH de 7.4) y se conservaron en fenol hasta la extracción de ADN. El protocolo utilizado en este trabajo fue modificado de diferentes protocolos de extracción de ADN de corales escleractinios (Banaszak, 2007; Guthrie et al., 2000; Sunagawa et al., 2009). Se tomaron 8 ml del homogenizado de coral en PBS y fenol y se agregaron 2 ml de buffer TE (10 mM Tris-HCL pH 8,0 y 1mM EDTA) y 500 µl de SDS 10%. Las muestras se calentaron a 75°C por 10 minutos y después se incubaron en hielo por 5 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 5000 rpm por 5 minutos y se realizaron extracciones sucesivas con fenol cloroformo isoamílico (25:24:1). Para precipitar el ADN se añadió Acetato de Amonio a una concentración final de 1M y dos volúmenes de etanol absoluto, se dejó precipitando toda la noche a -20°C y al día siguiente se centrifugó por 15 minutos a 14000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 700 µl de etanol al 70% al precipitado para volver a centrifugar en las mismas condiciones. Finalmente se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 50 µl de buffer TE.

### **5.2.2. Extracción del ADN de colonia**

Para este procedimiento se utilizaron cultivos que habían crecido durante toda la noche en cajas de petri con agar LB y agar marino. Se tomó una colonia y se lavó con agua estéril para remover exopolisacaridos extracelulares. Posteriormente se resuspendió en SDS al 1% y se indujo un choque térmico de 100°C por 10 minutos seguido de un enfriamiento en hielo por 5 minutos para lograr la lisis celular. Se retiraron los residuos celulares por medio de una centrifugación a 15000 rpm durante 10 minutos. Del sobrenadante se extrajo el ADN usando fenol. Finalmente se precipitó con etanol absoluto y el precipitado se resuspendió en buffer TE.

### 5.2.3. PCR 16S rADN a partir de ADN de coral

La reacción final para la amplificación se componía de 2,5 µl de MgSO<sub>4</sub> (50 mM) 0,3 µl de dNTPs (50 mM), 1 µl de cada *primer* (10mM), 0,2 µl de taq polimerasa *Platinum Pfx* (Invitrogen) (5U/µl) y 1,0 µl de ADN molde que correspondía a el producto de la extracción del ADN de coral (metodología 5.2.1) y 17,5 µl de H<sub>2</sub>O MilliQ para un total de 25µl. Los *primers* usados fueron los universales para la amplificación del gen 16S rADN: 27F (5´ AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3´) y 1492R (5´ TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3´) (Lane, 1991). Las condiciones de amplificación tenían un paso de denaturación inicial a 94°C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de 94°C por un minuto, 56°C por un minuto y 72°C por un minuto, y un paso final de extensión por 10 minutos. Los productos de PCR fueron enviados a Macrogen Inc para su secuenciación.

### 5.2.4. PCR de 16S rADN de colonias

Para la caracterización molecular de 31 de los aislamientos, se extrajo el ADN de cada colonia resuspendiéndola en 100µl de agua destilada estéril en tubos de 0,5 ml, cada tubo se agitó vigorosamente en vortex y se sometió a un choque térmico que consistía en 10 minutos a 100°C, seguido de hielo por 5 minutos. Posteriormente se centrifugó durante 5 minutos a 10000 rpm y se tomaron 10 µl del sobrenadante en 90 µl de agua destilada. Se tomaron 5 µl de esta dilución como ADN molde para la PCR. Las condiciones de amplificación fueron las mismas usadas para la amplificación del gen 16S rADN a partir de ADN de coral (Metodología 5.2.3). Los productos de PCR fueron enviados a Macrogen Inc para su secuenciación.

### 5.2.5. Amplificación del 16S rADN de *Aurantimonas coralicida*

Se llevó a cabo una amplificación por PCR usando *primers* C-995F (TCGACGGTATCCGGAGACGGAT) y UB-1492R (TACGGYTACCTTGTTACGACTT) reportados en el 2008 por Polson y colaboradores (Polson et al., 2008) que se unen específicamente al gen ribosomal 16S de la cepa *Aurantimonas coralicida* WP1 reportada

como agente causal de la enfermedad (Denner et al., 2003). Se usó el protocolo de amplificación reportado para la detección de la especie, el cual consistía en un paso inicial de denaturación a 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos y 72°C por un minuto, y un paso final de extensión por 10 minutos. Se utilizó como ADN molde tanto el ADN total (extraído mediante el la metodología 5.2.1) como amplificadas de 16S de la misma fuente (metodología 5.2.3).

#### **5.2.6. PCR de genes tipo *luxI***

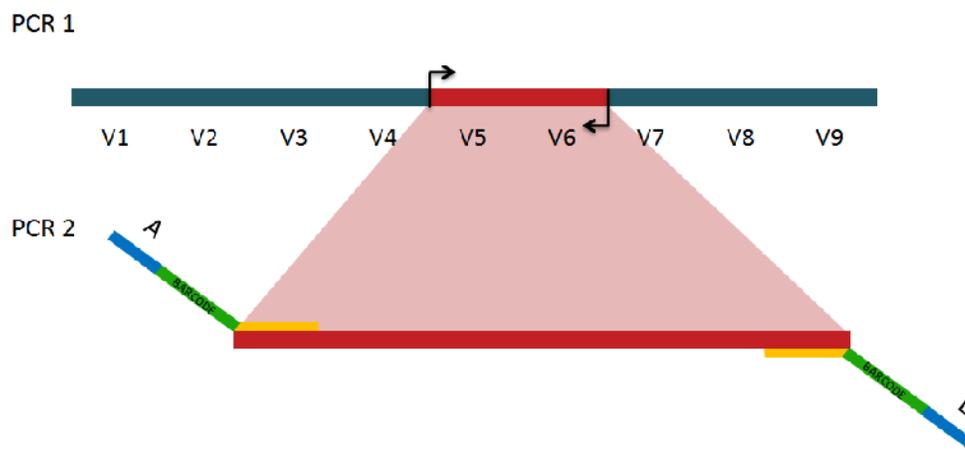
Para establecer el protocolo de amplificación se partió de las condiciones reportadas por Kambam y colaboradores (2008) en donde amplificaban genes *luxI* de *vibrio fischeri* (Kambam et al., 2008). A partir de estas condiciones se realizó la estandarización para la amplificación de los diversos genes usando un *touch down* de 60°C a 55°C para mejorar el anillamiento de los *primers*. Los ciclos de amplificación consistían en un paso inicial de denaturación a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 60 segundos, 60°C por 60 segundos y 72°C por 120 segundos, y un paso final de extensión por 10 minutos a 72°C.

Las bandas obtenidas fueron purificadas usando el kit de purificación PureLink PCR purification de Invitrogen y finalmente fueron enviadas a secuenciar en MacroGen Inc.

#### **5.2.7. Pirosecuenciación**

El producto de 16S rADN, obtenido según el numeral 5.2.3, fue enviado a Corpogen S.A. quienes prestaron el servicio de marcaje necesario para posterior reacción de pirosecuencia. El marcaje consistía en dos pasos: 1) una reacción de PCR para la amplificación de la región hipervariable V5-V6 del gen ribosomal 16S usando *primers* degenerados (diseñados por Corpogen S.A.) derivados de las posiciones 807 a 1050 pb del gen 16S de *Escherichia coli*, 2) una nueva PCR para adicionar oligonucleótidos de aproximadamente 30 pb que contenían los adaptadores necesarios para llevar a cabo la pirosecuenciación y una secuencia única para la identificación de cada muestra (código de barras). En el extremo 5' se adicionó el adaptador A (5' CGTATCGCCTCCCTCGGCCA

3') y en el extremo 3' el adaptador B (5' CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC 3') los códigos de barras se escogieron entre los propuestos por el boletín técnico de secuenciación de 454 (Roche, 2009). En la figura 4 se explica en un esquema el procedimiento para el marcaje de las muestras. El marcaje fue verificado en una electroforesis a 80V por 40 minutos y fue enviado por medio de Corpogen S.A. a Engenecore en la Universidad de Carolina del Sur para realizar la pirosecuenciación.



**Figura 4. Primera y segunda amplificación para el marcaje de las regiones V5-V6 antes de la pirosecuenciación.** Las barras rojas corresponden al producto de la primera amplificación (región V5-V6 de gen ribosomal 16S). En azul, los adaptadores A y B en los extremos 5' y 3' respectivamente, las barras verdes son el código de barras para la diferenciación de muestras y las barras naranjas representan la región del oligonucleótido utilizado en la segunda amplificación que va a ser utilizada como iniciador.

## 5.3 Análisis computacionales

### 5.3.1. Pirosecuenciación

Como resultado de la pirosecuenciación se obtuvieron archivos multifasta para cada muestra de coral. El primer paso fue el de limpieza, para el cual primero se removieron las secuencias con menos de 50 nucleótidos y aquellas con valores de calidad menores a 20. Posteriormente se eliminaron las secuencias quimera por medio de la herramienta Desipher (<http://decipher.cee.wisc.edu/FindChimeras.html>) (Wright, 2011). Debido a que no se obtuvo el mismo número de secuencias en todas las muestras, todos los análisis fueron realizados con el mismo número de secuencias que correspondía al menor número

obtenido por muestra, que equivalía a 800 secuencias correspondiente a *Siderastrea siderea* enfermo. De esta manera se usó un *script* diseñado por Luis Miguel Rodríguez del LAMFU (Laboratorio de Micología y Fitopatología de la Universidad de los Andes) que fue ejecutado en el programa estadístico R (R development, 2008). Este *script* permitía realizar 3 sub-muestreos, cada uno de 800 secuencias escogidas aleatoriamente sin remplazo, a partir de cada grupo de secuencias totales obtenidas para cada coral. Con cada submuestra se realizaron análisis de diversidad usando el programa DOTUR (Schloss and Handelsman, 2005) para obtener las curvas de rarefacción y los índices de Shannon para estimar la diversidad y Chao1 para estimar la riqueza. El cálculo total de OTUs se realizó a diferentes porcentajes de similitud de secuencias (100%, 97% y 95%). Para la asignación taxonómica se utilizó la herramienta Classifier del Ribosomal Database Project (disponible en: <http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>) (Wang et al., 2007) con un 80% de confianza. A partir de estos datos se obtuvieron las abundancias relativas a diferentes niveles taxonómicos y se compararon calculando el error estándar y por medio de un ANOVA a un factor. Por medio del protocolo *pyrosequencing pipeline* (disponible en: <http://pyro.cme.msu.edu/>) para el análisis de datos metagenómicos del RDP se realizó un análisis de Jaccard para la comparación entre librerías metagenómicas, que en este caso representaban cada set de 800 secuencias provenientes de las diferentes muestras de corales.

### 5.3.2. Secuenciación del gen ribosomal 16S rADN

Para el análisis de secuencias procedentes del protocolo 5.2.4 primero se construyó el *contig* de las secuencias obtenidas de cada iniciador usando el programa DNA Baser (Heracle BioSoft, 2011). Con este se realizó una búsqueda de secuencias similares por medio de 3 herramientas: la primera fue Blast contra la colección de nucleótidos completa del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) utilizando los parámetros por defecto del algoritmo. La segunda fue una búsqueda en la base de datos de genes de 16S rADN "ProkMSA" de *Green Genes* (DeSantis et al., 2006) y la tercera la herramienta Classifier del Ribosomal Database Project (RDP) (Wang et al., 2007). Se obtuvo la secuencia del gen 16S rADN de las 10 especies más similares obtenidas para cada aislamiento con estas tres herramientas por medio de la base de datos de taxonomía

bacteriana LPSN (*List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*) (Euzebey, 1997). Con estas se construyeron archivos multifasta que fueron editados en el programa Bioedit (Tippmann, 2004). Para el alineamiento se utilizó el algoritmo ClustalW (Thompson et al., 1997) dentro de la interface del Bioedit. Los parámetros de alineamiento dependían de la similaridad de las secuencias, en donde, para especies del mismo género tanto la apertura de gaps como la extensión de estos tenían valores de 50 puntos. Mientras que para bacterias del mismo phylum pero de diferente género la penalidad fue de 30 puntos tanto de apertura como de extensión y para especies de diferente phylum la penalidad fue de 20 para ambos parámetros. Los alineamientos fueron exportados al programa Mega 4 (Tamura et al., 2007) para calcular la matriz de distancias basada en el modelo de evolución “Distancia p” y finalmente construir un dendrograma utilizando el método de agrupamiento *Neighbor Joining* que fue validado estadísticamente por el método de *Bootstrap* con 1000 réplicas.

### 5.3.3. Diseño de *primers* para amplificar genes tipo *luxI*

Se realizó una búsqueda de genes tipo *luxI* en la base de nucleótidos del GenBank de las especies cercanas a las identificadas para cada uno de los aislamientos obtenidos en este estudio. Los parámetros de búsqueda fueron las palabras “*autoinducer synthase*” seguido del género que se estuviera buscando. Con todas las secuencias encontradas se realizó una base de datos de genes tipo *luxI* que se encuentra resumida en el anexo 6. Basado en los alineamientos de estas secuencias, se diseñaron *primers* en regiones conservadas del gen tipo *luxI*. Cuando el alineamiento de un grupo de secuencias no mostraba regiones suficientemente conservadas, se procedía a diseñar *primers* con base en la secuencia del gen tipo *luxI* de la especie más similar que tuviera reporte de este gen. Las secuencias fueron analizadas en el programa Primer3 V.0.4.0 (Rozen and Skaletsky, 2000) por medio del cual se obtuvo una lista de oligonucleótidos candidatos que eran capaces de amplificar regiones entre 300 y 600 nucleótidos. Cada uno de esos posibles nucleótidos fue analizado en el programa NetPrimer, en donde se corroboró que la energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) tanto del primer completo como del extremo 3' fuera lo más negativa posible lo cual es un indicativo de la estabilidad de unión al ADN. Se confirmó también que los *primers* no generaran horquillas ni dímeros con su propia secuencia ni con el *primer* de la hebra complementaria, para esto se escogieron aquellos que tenían un  $\Delta G$  menor a -6 Kcal/mol. Finalmente se tuvo en cuenta que la diferencia en la temperatura de fusión de los *primers*

no tuviera una diferencia de más de 5°C y que la temperatura de cada uno estuviera en un rango de 52 a 60°C.

#### **5.3.4. Análisis de secuencia de productos amplificados usando primers diseñados para genes tipo *luxI***

A cada una de las secuencias resultantes por secuenciación de las bandas obtenidas se le removió los fragmentos de baja calidad (aquellos con valores menores a 20). Estas secuencias fueron comparadas con la colección de nucleótidos (nr/nt) de la base de datos del NCBI por medio de un Blastn usando el resto de parámetros por defecto. Para la comparación de secuencias similares se tuvo en cuenta el valor E, la cobertura del *query*, el valor máximo total y la máxima identidad.

### **5.4 Obtención y caracterización fenotípica de aislamientos bacterianos**

La obtención de aislamientos bacterianos de cada muestra se realizó a partir de 2 fragmentos de coral cada uno proveniente de diferentes colonias con el fin de suprimir la variación inter-colonia. Estos fragmentos de coral fueron obtenidos y lavados como se describe en la metodología 5.1. El primer paso para la obtención de aislamientos fue macerar utilizando buffer PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2mM y un pH de 7.4) hasta la homogenización completa de los tejidos. Se realizaron diluciones seriadas en solución salina estéril hasta alcanzar un factor de dilución de de 10<sup>-8</sup>. Se sembraron en superficie 100 ul de las diluciones 10<sup>-6</sup> a 10<sup>-8</sup> en cajas con agar marino (NaCl 20.8g, KCl 0.6g, MgCl<sub>2</sub> 4.0g, MgSO<sub>4</sub> 4.8g, sales de Rila 1.5g, Tris-Base 0.4g, Peptona 3.0g, extracto de levadura 1.5g por cada 1000ml de agua destilada) y agar LB (10 g de peptona, 5g de NaCl y 5 g de extracto de levadura por cada 1000ml de H<sub>2</sub>O destilada). Los cultivos fueron incubados a temperatura ambiente (18°C aproximadamente) en condiciones aerobias.

#### **5.4.1. Caracterización morfológica y bioquímica**

Para la caracterización morfológica se observaron colonias de cultivos de 48h utilizando un estereoscopio Zeiss con un aumento de 16X, se describieron los caracteres morfológicos que están listados en la figura 5. Todas las colonias fueron fotografiadas. Como parte de la caracterización morfológica se realizó tinción de Gram a cada uno de los aislamientos.



**Figura 5. Caracteres morfológicos para la descripción macroscópica de una colonia**

Para la caracterización bioquímica se tomaron los cultivos crecidos por 24h a 28°C en agar LB de cada una de los aislamientos a probar y se inoculó una colonia de cada uno en los siguiente sustratos: citrato, lactosa, sacarosa, manitol, glucosa, fructosa, triple azúcar hierro (TSI) y reducción de nitratos. Para ciertos grupos bacterianos fue necesario probar sustratos adicionales para corroborar la identificación molecular, por ejemplo el uso de agar TCBS para especies del género y crecimiento en caldo LB suplementado con NaCl al 8%, manitol y melobiosa para la identificación de especies de vibrios. Todas las pruebas se hicieron por duplicado y fueron inoculadas a 28°C durante 24h hasta su lectura final. Los controles positivos y negativos usados están listados en la tabla 1.

**Tabla 1. Cepas control usadas para la caracterización bioquímica de los aislamientos procedentes de corales.**

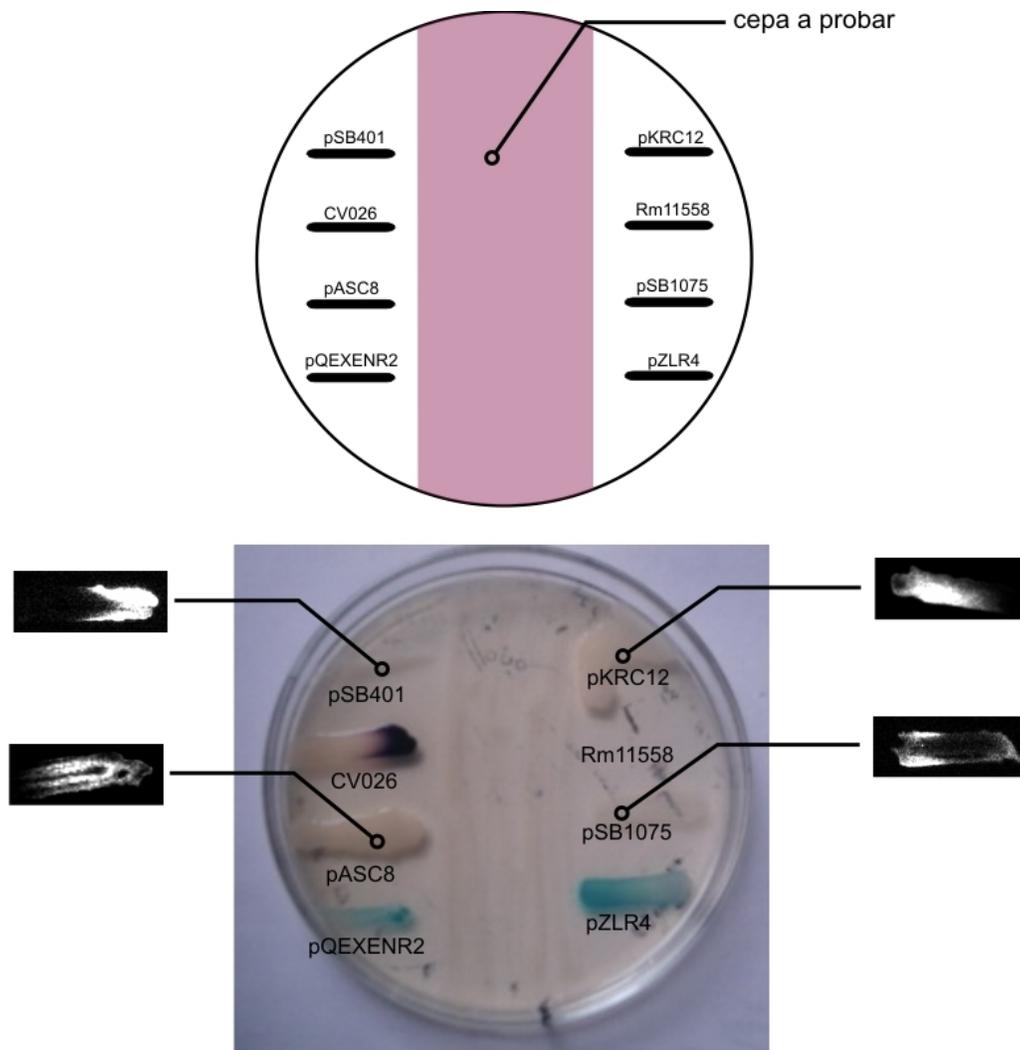
Prueba	control positivo	control negativo
Citratos	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Escherichia coli</i>
Lactosa	<i>Escherichia coli</i>	<i>Chromobacterium violaceum</i>
Glucosa	<i>Escherichia coli</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i>

Nitratos	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
Motilidad	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Chromobacterium violaceum</i>
Sacarosa	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Vibrio fischeri</i>
Manitol	<i>Vibrio fischeri</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i>
Fructosa	<i>Escherichia coli</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i>

---

#### 5.4.2. Detección de la producción de AHLs en aislamientos bacterianos

Para evaluar la producción de AHLs en los aislamientos bacterianos se realizó una siembra masiva de cada aislamiento en un tercio de una caja de petri con agar LB y en la fracción restante de la placa se sembraron las cepas biosensoras como lo muestra la figura 6. Estas cepas biosensoras son bacterias mutantes incapaces de producir AHLs y que expresan un fenotipo determinado al detectarlas. De esta manera las cepas biosensoras eran capaces de detectar la presencia de AHLs producidas por el aislamiento sembrado en la misma placa. Las cepas biosensoras que fueron usadas en este estudio se listan en la tabla 2. Los biosensores fueron donados por los doctores Vittorio Venturi del ICGEB en Trieste, Italia; Juan González de la Universidad de Texas en Dallas, Estados Unidos; Stephen Lindow de la Universidad de California en Berkeley, Estados Unidos y Katharina Riedel del Helmholtz Center for Infectious diseases en la Universidad Técnica de Braunschweig, Alemania. Los ensayos se realizaron en agar LB suplementado con 60ug/ml de X-gal para poder observar la actividad de la betagalactosidasa de los biosensores que la requerían y sin la adición de ningún antibiótico. Fueron incubados durante 24 horas a 28°C.



**Figura 6. Diagrama del ensayo para la detección de AHLs producidas por los aislamientos procedentes de muestras de corales.** Arriba: La zona morada corresponde a una siembra masiva del aislamiento a probado. Las líneas negras corresponden a cada uno de los biosensores probados en este estudio. Abajo: En el centro se realizó una siembra masiva uno de los controles positivos de cepas productoras de AHLs, *Pseudomonas putida* ISO F. Las fotos de la bioluminiscencia producida por *Escherichia coli* pSB403 y *Escherichia coli* pSB1075 fueron tomadas usando un digitalizador de imagenes Biorad en la oscuridad. La producción de proteína verde fluorescente de las cepas *Pseudomonas putida* pASC8 y *Pseudomonas putida* pKRC12 fue observada en un digitalizador de imagenes Biorad con filtros 530/30 BP. La producción de violaceína por *Chromobacterium violaceum* CV026 y degradación de X-gal de la cepas biosensoras *Escherichia coli* pQEXENRE, *Agrobacterium tumefaciens* pZLR4 y *Sinorhizobium meliloti* Rm11558 fueron observadas con luz blanca. El ensayo se realizó en agar LB suplementado con 60 ug/ml de X-gal para la detección de la actividad B-galactosidasa.

**Tabla 2. Cepas biosensoras de AHLs usadas en este trabajo.**

Especie	Fenotipo	Resistencia	AHLs detectadas	Control positivo usado	REF.
<i>Chromobacterium violaceum</i> CV026	producción de violaceína cvil/cviR	kan 100ug/ml	<b>C6, 3-oxo-C6</b> , C8, 3-oxo-C8, y C4-AHLs,	<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 31532	(McClellan et al., 1997)
<i>Escherichia coli</i> MT102 pSB403	bioluminiscencia luxI/luxR	Tet 15ug/ml	<b>3-oxo-C6</b> , C6, 3-oxo- C8- y C8-AHLs,	<i>P. putida</i> ISOF	(Winson et al., 1998)
<i>Escherichia coli</i> MT102 pSB1075	bioluminiscencia lasI/lasR	Amp 100ug/ml	<b>3-oxo-C12</b> , 3-oxo-C10 C12-AHLs	<i>Pseudomonas areuginosa</i> PAO1	(Winson et al., 1998)
<i>Pseudomonas putida</i> F117 pASC8	Proteína verde fluorescente cepI/cepR	Gent 25ug /ml	<b>C8</b> y C10 AHLs	<i>P. putida</i> ISOF	(Riedel et al., 2001)
<i>Pseudomonas putida</i> F117 pKRC12	Proteína verde fluorescente lasI/lasR	Gent 25ug /ml	<b>3-oxo-C10</b> y 3-oxo-C12-AHL	<i>Pseudomonas areuginosa</i> PAO1	(Riedel et al., 2001)
<i>Escherichia coli</i> M15 pQEXENR2	B-galactosidasa braI/braR	Gent 30 ug/ml	<b>3-OH-C8</b> , 3-OH-C6 y 3-OH-C10-HSLs	<i>E. coli</i> pQEXENI2	(Suarez-Moreno et al., 2010)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NTL4 pZLR4	B-galactosidasa traI/traR	Gent 30 ug/ml	<b>3-oxo-C8</b> , todas las 3-oxo, C6, C8, C10, C12, C14, 3-OH-C6, 3-OH- C8 y 3-OH-C10-AHLs	<i>P. putida</i> ISOF	(Farrand et al., 2002)
<i>Sinorhizobium meliloti</i> Rm11558	B-galactosidasa sinI/sinR	Gent 30 ug/ml	<b>3-oxo-C14</b> , 1-3 oxo-C16, C16 y C14-AHLs	n/d	(Llamas et al., 2004)

En negrita se indica la AHL mejor detectada por la cada cepa biosensora seguida de otras moléculas que pueden ser detectadas en orden de sensibilidad. **Modificado de (Steindler and Venturi, 2007)**

### 5.4.3. Ensayos de virulencia

Para la búsqueda de factores de virulencia se probaron 50 aislamientos procedentes de corales *Siderastrea siderea* y *Diploria strigosa* enfermos y sanos. Cada aislamiento fue inoculado en un medio de cultivo específico para la detección de la actividad. Se llevaron a cabo diferentes tratamientos en donde se variaba la temperatura, la salinidad y el pH para aumentar la detección de la actividad proteolítica y lipolítica de los aislamientos, para la actividad hemolítica solo se tuvieron en cuenta cambios en la temperatura debido a que cambios en el pH y la salinidad podían afectar la integridad del medio de cultivo. En la tabla 3 se muestran los tratamientos realizados para la detección de cada uno de los factores de virulencia. Para la siembra se usaron cultivos de 24h y fueron inoculados usando un asa microbiológica recta en forma de punción sobre el agar. Se sembraron 5 colonias por caja de petri y cada ensayo se realizó por duplicado.

**Tabla 3 Diferentes tratamientos para la detección de factores de virulencia de aislamientos provenientes de muestras de corales.**

	Temperatura		NaCl		pH	
	30°C	20°C	0,5%	2%	7	8,3
<b>control</b>						
<b>1</b>						
<b>2</b>						
<b>3</b>						

El tratamiento control se incubó a 20°C con una salinidad de 0,5% y un pH aproximado de 7. En el tratamiento 1 se incubó a 30°C y se mantienen las condiciones de salinidad y pH. En el tratamiento 2 se mantiene la temperatura de incubación y el pH del control, pero se varía la salinidad y en el tratamiento 3 se varía únicamente el pH.

#### 5.4.3.1. Proteasas

Se realizó una estandarización previa para calcular la concentración necesaria de proteína (caseína) que permitiera la óptima visualización de la actividad proteolítica. Con base en esto se preparó agar leche mezclando los componentes de agar LB en un tercio del volumen total de medio. Se preparó por aparte una mezcla equivalente a los dos tercios del volumen restantes, la cual se componía de agua destilada y leche Alpina descremada líquida

ultrapasteurizada que tenía un contenido proteico total de 28g/L, de tal manera que la concentración final de la proteína fuera de 6,8 gramos por litro. Cada parte se esterilizó por separado, se mezclaron al alcanzar una temperatura aproximada de 50°C y se sirvieron en cajas de petri. Pasado el tiempo de incubación, se detectó la actividad positiva por la presencia de halos transparentes alrededor de la colonia. El control positivo usado fue la cepa *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 donada por el laboratorio de Epidemiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia.

#### **5.4.3.2. Lipasas**

El agar para lipasas se preparó mezclando y autoclavando 10g de peptona, 5g de NaCl, 1g de CaCl<sub>2</sub>, 15g de agar por cada 1000ml de H<sub>2</sub>O. En un recipiente aparte se esterizaron 5ml de tween 80 y cuando ambas soluciones alcanzaron una temperatura de 50°C fueron mezcladas y después servidas en cajas de petri estériles. La actividad positiva para lipasas se evidencia por un precipitado debajo o alrededor de la colonia. El control positivo usado fue la cepa *Pasteurella multocida* donada por el Laboratorio de Patobiología Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia.

#### **5.4.3.3. Hemolisinas**

Para detectar la actividad hemolítica se preparó agar tripticasa de soya (ATS) que después de ser autoclavado y enfriado a 50°C, fue suplementado con 5% de sangre desfibrinada de cordero. La presencia de hemólisis fue detectada por halos claros alrededor de la colonia. El control positivo usado fue la cepa *Streptococcus equi* donado por el laboratorio de Microbiología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia.

#### **5.4.3.4 Inhibición de la virulencia mediada por lactonasas**

Para este ensayo se utilizó la cepa W79 de *Escherichia coli* que bajo la presencia de IPTG es capaz de producir la lactonasa AiiB de *Agrobacterium tumefaciens* construida por el estudiante Miguel Ángel Fernández del grupo Comunicación y Comunidades Bacterianas. Se tomó un cultivo de esta cepa con 12h de crecimiento y se agregó IPTG a una concentración final de 1mM y se incubó a 37°C. Pasadas 10 horas de incubación el cultivo fue centrifugado 3 veces a 15000 rpm durante 5 minutos con el fin de remover el mayor

número de células posible del sobrenadante que contenía la lactonasa. Se agregaron 800ul de este sobrenadante en la superficie de los diferentes medios para la detección de proteasas, lipasas y hemolisinas y finalmente se inocularon 5 de los aislamientos que habían presentado actividad positiva algunos de estos factores de virulencia. Se comparó la actividad con respecto al medio sin el sobrenadante que contenía la lactonasa.

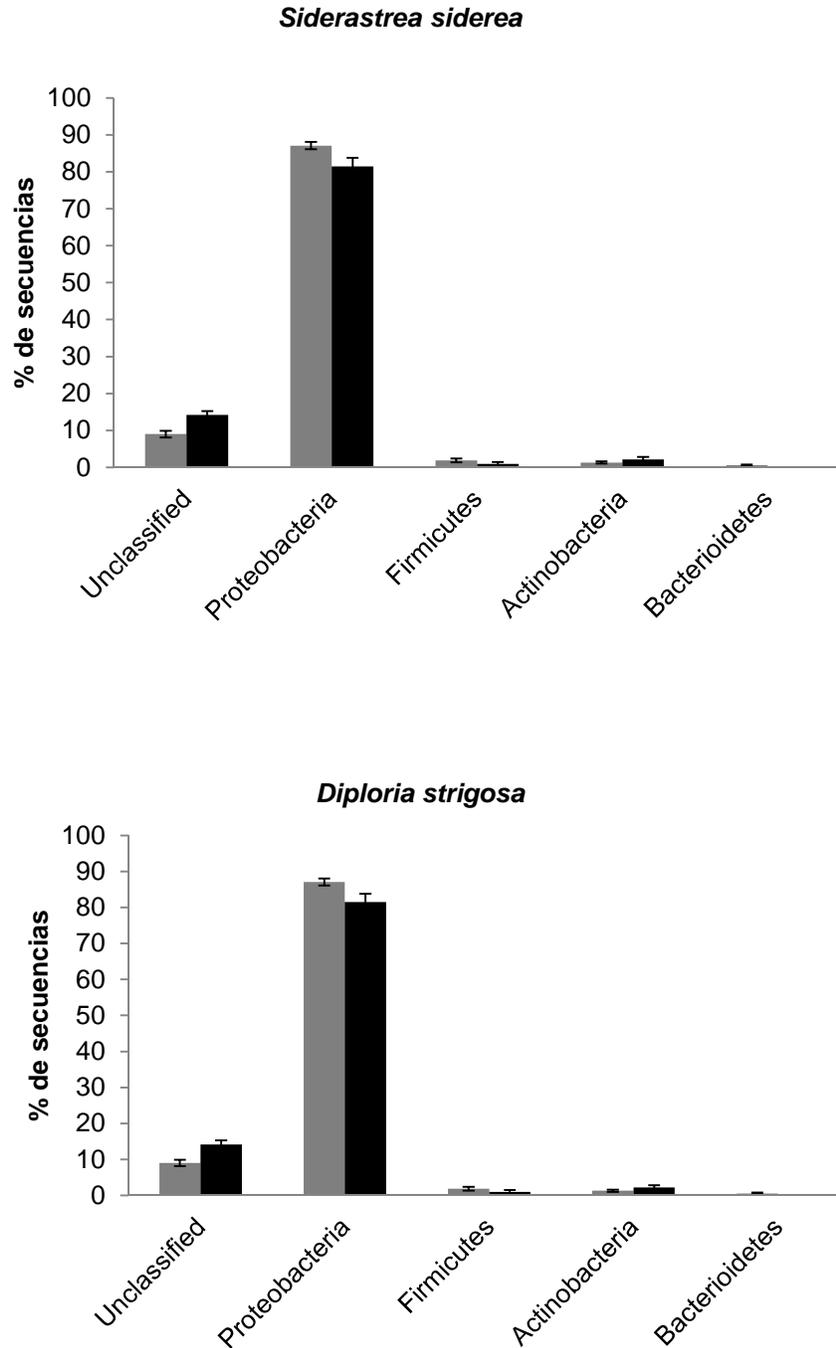
## 6.RESULTADOS

### 6.1. Caracterización de la estructura de la comunidad bacteriana no cultivable asociada a corales *Siderastrea siderea* y *Diploria strigosa*

La caracterización de la estructura de las comunidades bacterianas no cultivables asociadas a cada una de las muestras se realizó por medio de pirosecuenciación en donde se obtuvieron 32054 secuencias. Después de haber removido las secuencias de baja calidad y aquellas que tenían un tamaño menor a 50 nucleótidos (metodología 5.3.1.) se obtuvieron 26560 de secuencias de 16S rADN entre todas las muestras; 6151 provenientes de *Siderastrea siderea* sano (SSS), 857 de *Siderastrea siderea* enfermo (SSE), 14968 de *Diploria strigosa* sano (DSS) y 4584 de *Diploria strigosa* enfermo (DSE). El promedio de número de nucleótidos de las secuencias fue de 188 en un rango que variaba de 52 a 304 nt.

El 99% de las secuencias se clasificó dentro del dominio Bacteria, el 0,08% dentro del dominio Achaea y 0,07% de las secuencias no pudieron ser clasificadas en ninguno de los dos. Dentro del dominio bacteria las secuencias se clasificaron en 9 phyla, 18 clases y 39 órdenes de bacterias. En promedio entre las muestras el 84,27% pudo ser clasificado a nivel de phylum y el 66,8% pudo ser clasificado a nivel de orden. La abundancia relativa de secuencias muestra que el phylum más abundante en todas las muestras de corales es Proteobacteria: con  $75.5 \pm 1.8\%$  en SSS,  $76.3 \pm 2.5\%$  en SSE  $88.7 \pm 1.0\%$  en DSS y  $83.9 \pm 2.3\%$  en DSE (Figura 7) seguido de Firmicutes, Actinobacteria y Bacteroidetes.

No se realizaron análisis más detallados dentro del los phyla Actinobacteria, Bacteroidetes y Firmicutes debido a la baja cantidad de secuencias clasificadas de cada uno de estos. Un análisis más detallado dentro del phylum Proteobacteria mostró cambios en la abundancia de las principales clases del phylum (Figura 8). Se observaron aumentos significativos ( $P < 0.05$ ) en la abundancia relativa de secuencias clasificadas como Alphaproteobacteria en las dos especies de corales durante la enfermedad. Así mismo se observaron reducciones significativas ( $P < 0.05$ ) en la abundancia de individuos pertenecientes a las clases Gammaproteobacteria y Betaproteobacteria.



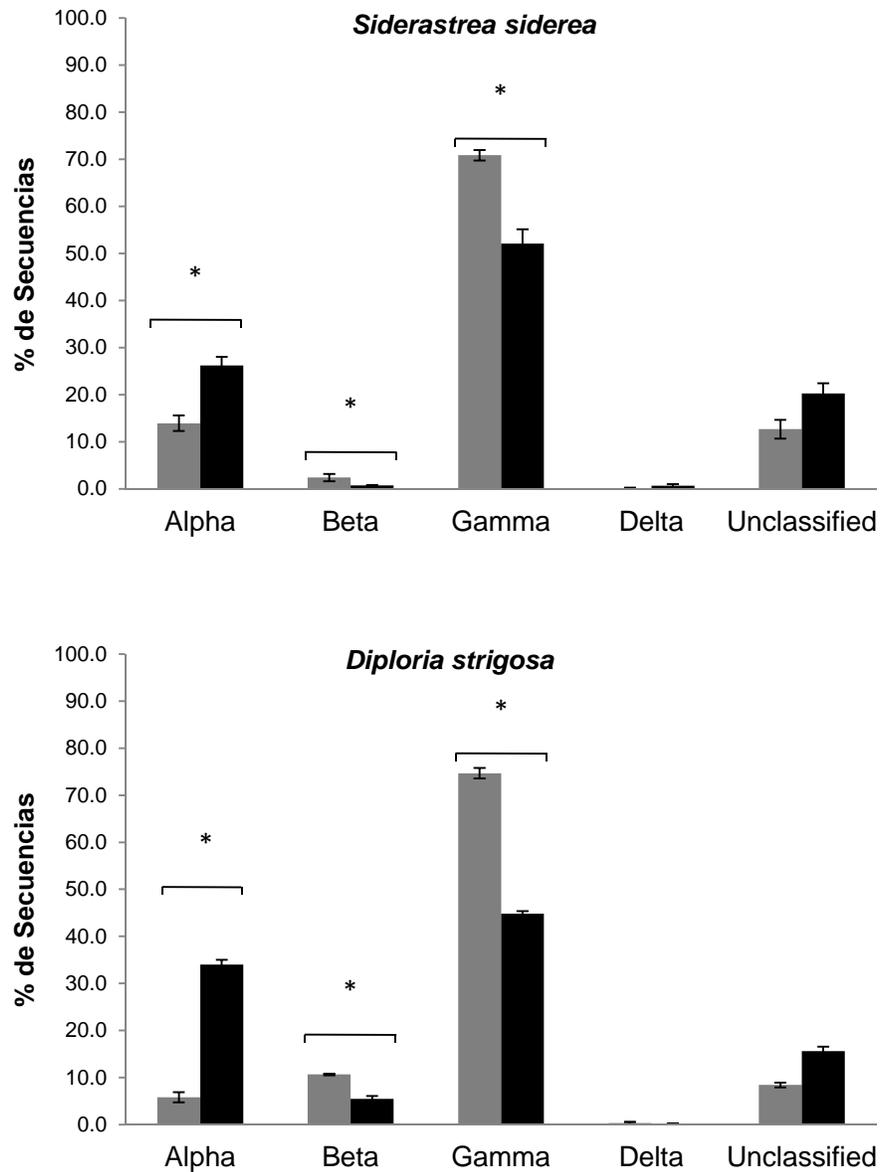
**Figura 7. Abundancias relativas de secuencias designadas taxonómicamente a nivel de phylum.** Corales sanos (barras claras), corales enfermos (barras oscuras). Cada barra muestra la desviación estándar de la muestra basada en las réplicas del sub-muestreo. La asignación taxonómica fue realizada con la herramienta Classifier del RDP con un 80% de confianza. (Esta figura hace parte del anexo 1).

En las muestras de *S. siderea*, las Alphaproteobacteria aumentan en promedio del 14% ( $\pm 1,6\%$ ) al 26% ( $\pm 1,9\%$ ) durante la enfermedad y en *D. strigosa* aumentan del 6% ( $\pm 1,1\%$ ) al 34% ( $\pm 1\%$ ) durante la enfermedad. Las Betaproteobacteria disminuyen en *S. siderea* del 2 ( $\pm 0,8\%$ ) al 1% ( $\pm 0,1\%$ ) y en *D. strigosa* del 11% ( $\pm 1,1\%$ ) al 5% ( $\pm 0,6\%$ ) durante la enfermedad y las Gammaproteobacteria del 71% ( $\pm 1,1\%$ ) al 52% ( $\pm 3\%$ ) y del 75% ( $\pm 1,1\%$ ) al 45% ( $\pm 0,5\%$ ) en *S. siderea* y *D. strigosa* respectivamente durante la enfermedad. En promedio un 85,74% de las secuencias pudo ser clasificado a nivel de clase.

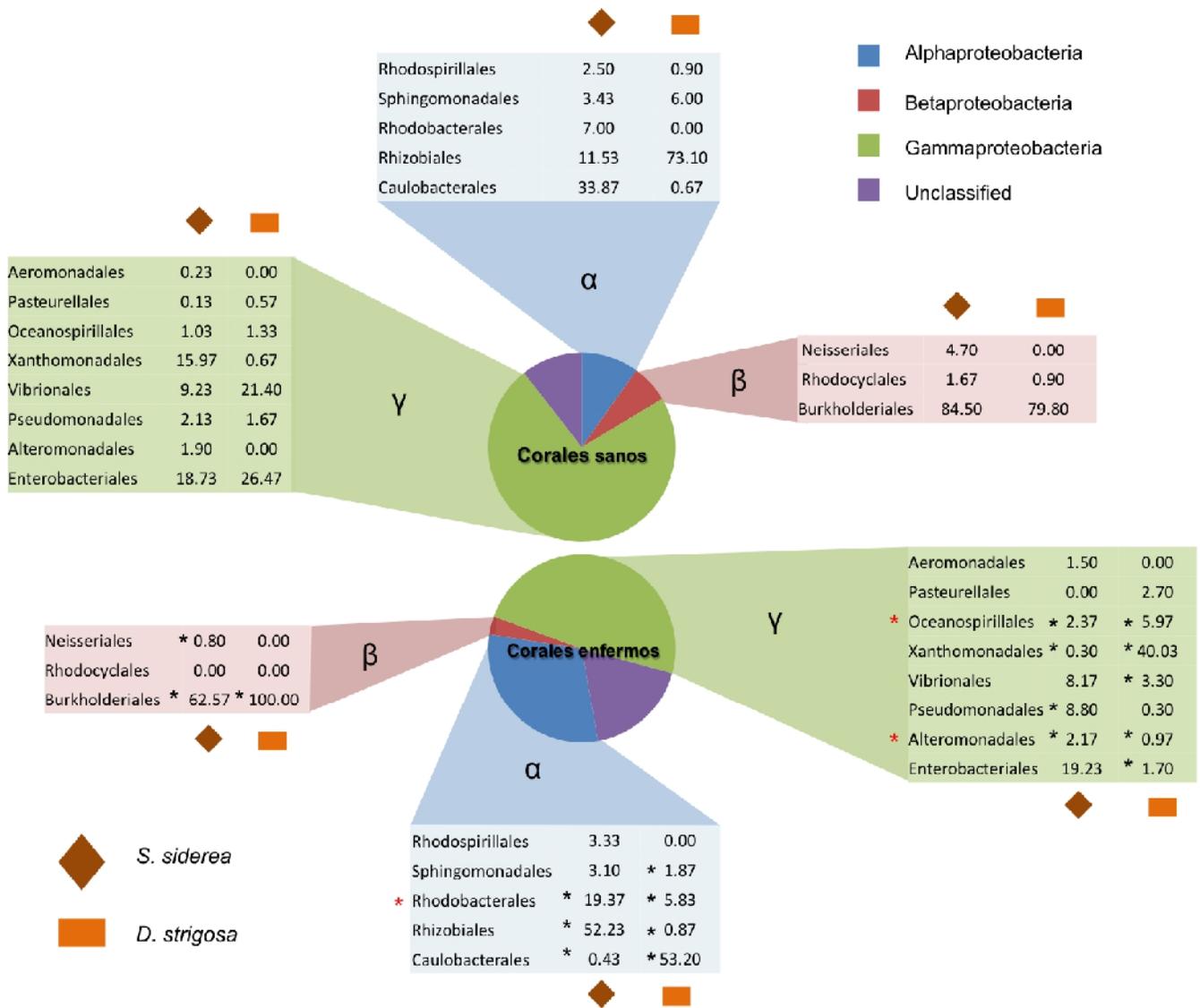
Cada una de las secuencias pertenecientes a Proteobacteria también fue analizada a nivel de orden en donde se obtuvo un promedio de 235 secuencias de SSS, 220 de SSE, 336 de DSS y 272 de DSE clasificables. A este nivel taxonómico se observaron cambios en las abundancias relativas en las secuencias de alguno de los dos corales o en ambos. En Alphaproteobacteria: Sphingomonadales, Rhodobacterales, Rhizobiales y Caulobacterales. Betaproteobacteria: Neisseriales y Burkholderiales. En Gammaproteobacteria: Oceanospirillales, Xanthomonadales, Vibrionales, Pseudomonadales, Alteromonadales y Enterobacteriales. De los anteriores, solo 3 órdenes mostraron un el mismo patrón de cambio entre las dos especies: durante la enfermedad había un aumento en los Rhodobacterales y Alteromonadales y una disminución en los Oceanospirillales y Vibrionales como se ve en la figura 9.

No se realizaron análisis de abundancias a nivel de familia ni género debido al bajo porcentaje de secuencias clasificadas a estos niveles taxonómicos. No obstante, en los anexos 2 y 3 se muestra la lista de géneros y familias respectivamente, encontrados en cada una de las muestras y su porcentaje de abundancia con respecto al total de secuencias obtenidas y no con respecto a los submuestreos de 800 secuencias.

La variación de cada una de las comunidades en términos de diversidad y riqueza dados por los índices de Shannon y Chao1 respectivamente se muestra en la tabla 4. En *S. siderea* los valores tanto de diversidad como de riqueza bacteriana fueron mayores para los corales sanos, mientras que en *D. strigosa* fueron mayores en corales afectados. No obstante se cree que la diversidad de la muestra puede estar subestimada ya que el muestreo no llegó a la saturación, como muestran las curvas de rarefacción en la figura 10.



**Figura 8. Abundancias relativas de secuencias designadas taxonómicamente a nivel de clase dentro del Proteobacteria.** Corales sanos (barras claras), corales enfermos (barras oscuras). Las abundancias relativas fueron calculadas a partir de 3 réplicas de submuestras de 800 secuencias. Cada barra muestra la desviación estándar de la muestra basada en las réplicas del sub-muestreo. La asignación taxonómica fue realizada con la herramienta Classifier del RDP con un 80% de confianza. La comparación de las comunidades se realizó por medio de un ANOVA un factor, los asteriscos sobre las barras indican cambios significativos en las abundancias dados por ( $P < 0.05$ ). (Esta figura hace parte del anexo 1).

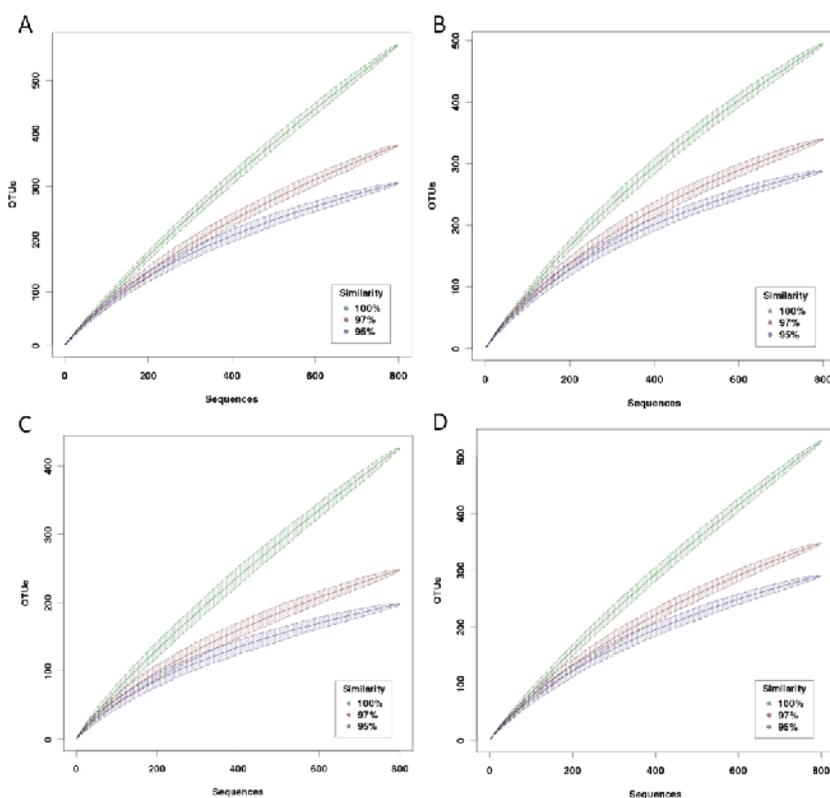


**Figura 9. Abundancias relativas de órdenes pertenecientes a las clases Alpha-Beta y Gammaproteobacteria.** Los asteriscos negros indican cambios significativos en la abundancia de sanos comparada con enfermos, los asteriscos rojos significan cambios significativos comunes en las abundancias de sanos y enfermos en ambos corales. Las abundancias relativas fueron calculadas a partir de 3 réplicas de submuestrados de 800 secuencias. La asignación taxonómica fue realizada con la herramienta Classifier del RDP con un 80% de confianza. La comparación de las comunidades se realizó por medio de un ANOVA un factor. (Esta figura hace parte del anexo 1).

**Tabla 4. Número de OTUs obtenidos para cada muestra de coral, índices de riqueza y diversidad.**

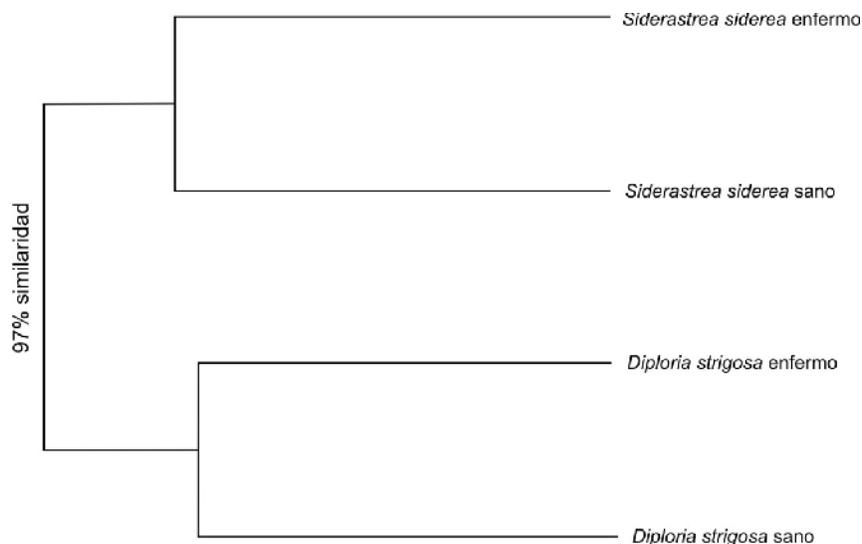
	Número de secuencias analizadas	Número de OTUs	Chao1	Shannonr
<i>S.siderea</i> sano	800	378 (12.5)	800 (674.2 - 979.4)	5.4 (5.4 - 5.5)
<i>S.siderea</i> enfermo	800	319 (17.9)	523 (448.0 - 609.2)	5.3 (5.2 - 5.4)
<i>D.strigosa</i> sano	800	256 (6.8)	512 (427.2 - 672.5)	4.5 (4.40- 4.6)
<i>D.strigosa</i> enfermo	800	372 (24.5)	828 (690.3- 1025.9)	5.4 (5.3 - 5.5)

Los parámetros fueron obtenidos a partir de 3 réplicas de submuestreos de 800 secuencias. Los análisis de diversidad fueron realizados usando DOTUR a 97% de similitud. Entre paréntesis se denota la desviación estándar en el caso del número de OTUs observado y el intervalo de confianza para los índices de riqueza y abundancia. (Esta figura hace parte del anexo 1).



**Figura 10. Análisis de rarefacción basado en el número de OTUs encontrados en cada una de las muestras.** El análisis fue realizado en DOTUR a partir del promedio de 3 réplicas de submuestreos de 800 secuencias. Cada línea representa el número de OTUs observados a diferentes similitudes (líneas verdes 100%, líneas rojas 97% y líneas azules 95%) de secuencias con el intervalo de confianza representado por las líneas punteadas. A) *Siderastrea siderea* sano, B) *Siderastrea siderea* enfermo, C) *Diploria strigosa* sano, D) *Diploria strigosa* enfermo. (Esta figura hace parte del anexo 1).

Con el fin de comparar la similaridad entre comunidades de las diferentes muestras se realizó un análisis de de Jaccard al 97% de similaridad de secuencias, en el cual resultaron dos agrupaciones correspondientes a las dos especies coralinas y no al estado de salud como se esperaba. En la figura 11 se muestra el dendograma que agrupa a corales sanos y enfermos de *D.strigosa* y por otro lado corales sanos y enfermos de *S. siderea*.



**Figura 11. Análisis de similaridad de comunidades de Jaccard.** El análisis fue realizado con el protocolo “*Pyrosequencing pipeline*” a partir del promedio de 3 réplicas de submuestrados de 800 secuencias a 97% de similaridad de secuencias.

Finalmente para determinar la presencia de la cepa de *Aurantimonas coralicida* reconocida como agente causal de la Plaga Blanca tipo II en los cayos de la Florida, se realizó una PCR usando *primers* específicos para dicha cepa. Sin embargo no hubo ningún amplificado con ninguna de las muestras, a pesar de haber utilizado ADN total y amplificados de 16S rADN total de este, provenientes de cada una de las muestras de corales enfermos y sanos.

## **6.2 Caracterización de la estructura de la comunidad bacteriana cultivable asociada a corales *Siderastrea siderea* y *Diploria strigosa***

Se obtuvo un cepario total de 71 aislamientos bacterianos, que se encuentran listados con sus características morfológicas y bioquímicas en el anexo 4. De *S. siderea* enfermo se obtuvieron un total de 22 aislamientos, 14 de *S. siderea* sano, 23 de *D. strigosa* enfermo y 12 de *D. strigosa* sano (Los aislamientos de *Diploria strigosa* fueron purificados por David Nivia en su trabajo de grado pero no identificados taxonómicamente). En este trabajo los 71 aislamientos fueron caracterizados morfológica y bioquímicamente y con base en esta caracterización se escogieron solamente 60 morfotipos diferentes que correspondían a 20 de *S. siderea* enfermo, 14 de *S. siderea* sano, 15 de *D. strigosa* enfermo y 11 de *D. strigosa* sano. La morfología predominante fueron los bacilos Gram negativos que correspondían a un 72% de los aislamientos. Los caracteres morfológicos predominantes fueron colonias de tamaño mediano (2 a 3 mm) con superficie brillante, de textura cremosa, colores beige o blanco, con elevación plana. En la figura 12 se ven algunos ejemplos de fotografías de colonias y de la micromorfología.

La caracterización bioquímica de estos aislamientos reveló que aquellos provenientes de corales sanos son capaces de utilizar más fuentes de carbono que los provenientes de corales enfermos. El 82% de los aislamientos provenientes de corales sanos utiliza citratos como única fuente de carbono, mientras que de los enfermos solo el 45%, glucosa 56 vs 29%, lactosa 22 vs 14%, sacarosa 22 vs 10%. Mayor número de aislamientos provenientes de corales enfermos fueron capaces de utilizar manitol (70 vs 62,5%), mientras que el mismo porcentaje de aislamientos provenientes de corales sanos y enfermos fueron capaces de utilizar fructosa (44,4%). El 90% de los aislamientos provenientes de corales sanos son capaces de realizar desnitrificación, mientras que los provenientes de enfermos solo un 40%. En la tabla 5 se muestran los porcentajes de utilización de fuentes de carbono y nitrógeno por parte de los aislamientos coralinos.

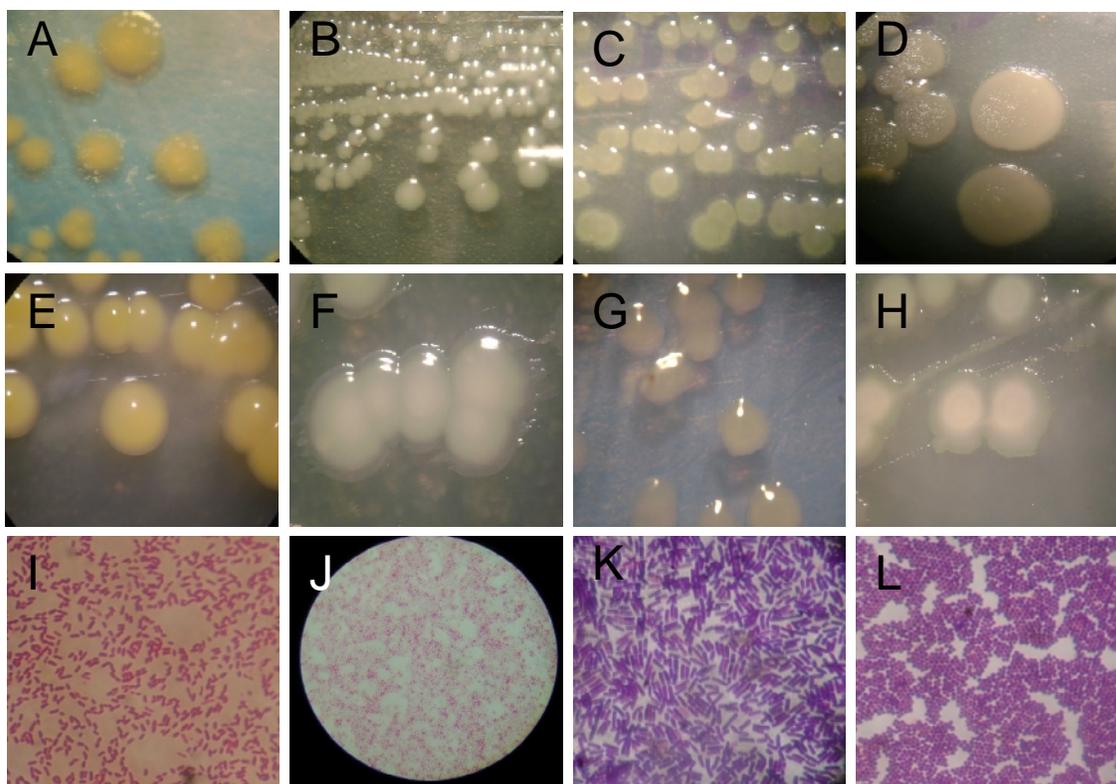


Figura 12. Fotografías de algunas colonias procedentes de muestras de corales y su tinción de Gram.

	SE	SS	DE	DS
CIT	20 (9)	11 (9)	0	0
NIT	18 (11)	10 (9)	0	0
GLU	18 (2)	10 (4)	10 (6)	8 (6)
LAC	19 (2)	10 (1)	10 (2)	8 (3)
SAC	19 (2)	10 (1)	10 (1)	8 (3)
MAN	10 (7)	8 (5)	0	0
FRU	18 (8)	9 (4)	0	0

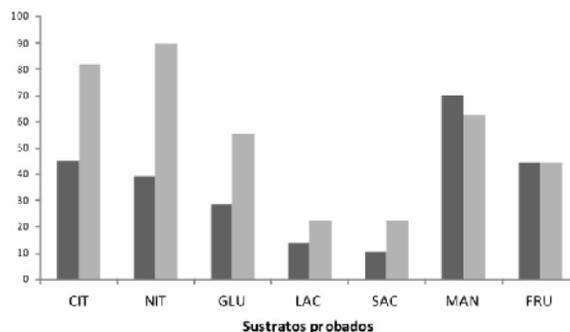


Figura 13 y Tabla 5. Actividad bioquímica de algunos aislamientos procedentes a corales enfermos y sanos. Izquierda (tabla 5): Número de aislamientos utilizados para determinar la actividad, entre paréntesis está el número de aislamientos que fueron positivos. Derecha (Figura 13): Porcentaje total de aislamientos con actividad positiva para cada uno de los sustratos. Barras claras: proveniente de corales sanos, barras oscuras: proveniente de corales enfermos. *Siderastrea siderea* enfermo (SSE), *Siderastrea siderea* sano (SSS), *Diploria strigosa* enfermo (DSE) y *Diploria strigosa* sano. Simmons citrato agar (CIT), reducción de nitratos (NIT), utilización de glucosa (GLU), lactosa (LAC), sacarosa (SAC), manitol (MAN) y fructosa (FRU).

Las colonias que fueron aisladas únicamente del coral sano o únicamente del enfermo fueron escogidas para identificarlas molecularmente. En la figura 14 se muestran algunos ejemplos de los análisis taxonómicos a nivel de género. De estos análisis se obtuvieron los porcentajes de similaridad y la distancia p (número de sitios que difieren entre las dos secuencias sobre el número de sitios comparados) obtenida para cada uno de los aislamientos con la especie más similar que se muestran en la tabla 6. Para las especies de vibrios se realizó un análisis bioquímico adicional debido a la incongruencia entre los caracteres morfológicos y el resultado por secuenciación de 16S rADN. Las pruebas adicionales que se realizaron fueron el crecimiento en medio con NaCl al 8%, utilización de manitol y crecimiento en agar TCBS, estos resultados se confrontaron con los reportes en la bibliografía para algunas de las especies vibrios con las que se presentaba la incongruencia. Como resultado de la identificación, las especies encontradas en corales sanos fueron *Vibrio rotiferianus*, *Pseudomonas azotoformans*, *Pseudomonas putida*, *Paracoccus alcaliphilu*, *Micrococcus yunnanensis*, *Vibrio natriegens* y *Alcaligenes faecalis*. En corales enfermos se encontraron las especies *Microbacterium oxydans*, *Pseudomonas azotoformans*, *Stenotrophomonas rhizophila*, *Delftia lacustris*, *Pseudomonas putida*, *Vibrio natriegens*, *Microbacterium arabinogalactanolyticum*, *Vibrio harveyi*, *Brevibacterium linens*, *Leucobacter komagatae*, *Alcaligenes faecalis*, *Nocardiosis alba*, *Brevundimonas nasdeae*, *Bacillus megaterium*, *Micrococcus yunnanensis* y *Pantoea eucalypti*; la única especie que fue encontrada en las dos especies de corales enfermos fue *Brevibacterium linens*, como se muestra en la figura 15 más adelante. La mayor cantidad de los aislamientos pertenecen a la clase Gammaproteobacteria del phylum Proteobacteria, seguidos de aislamientos pertenecientes al phylum Actinobacteria, y en menor proporción aislamientos pertenecientes a las clases Beta y Alphaproteobacteria del phylum Proteobacteria como se ve en la figura 16 y 17.

Algunos de los resultados presentados hasta el momento se encuentran publicados en un artículo científico que se muestra en el anexo 1.

Búsqueda de relaciones entre la comunicación celular bacteriana, el potencial de virulencia y la estructura de la comunidad bacteriana en la enfermedad de la Plaga Blanca tipo II

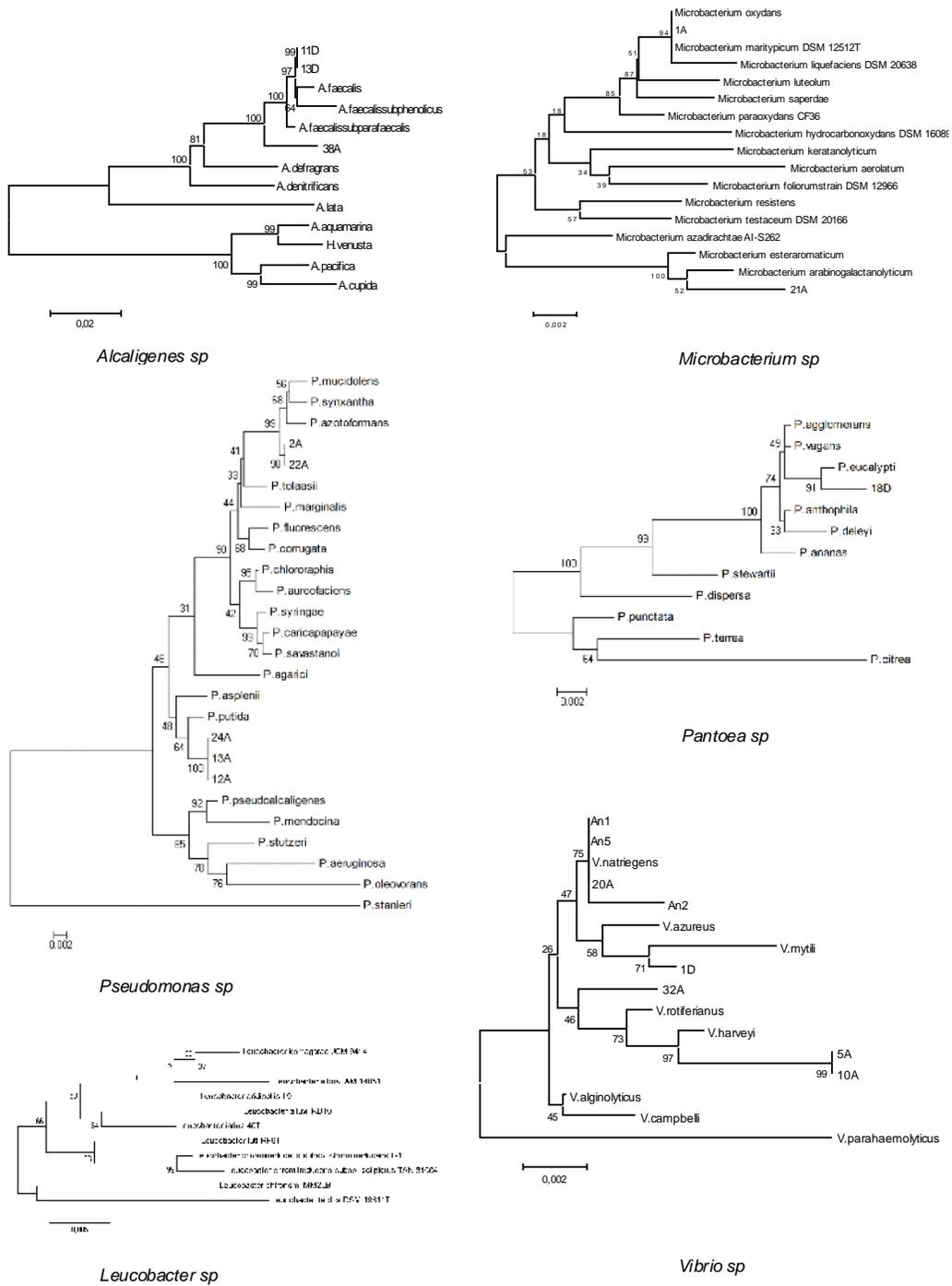
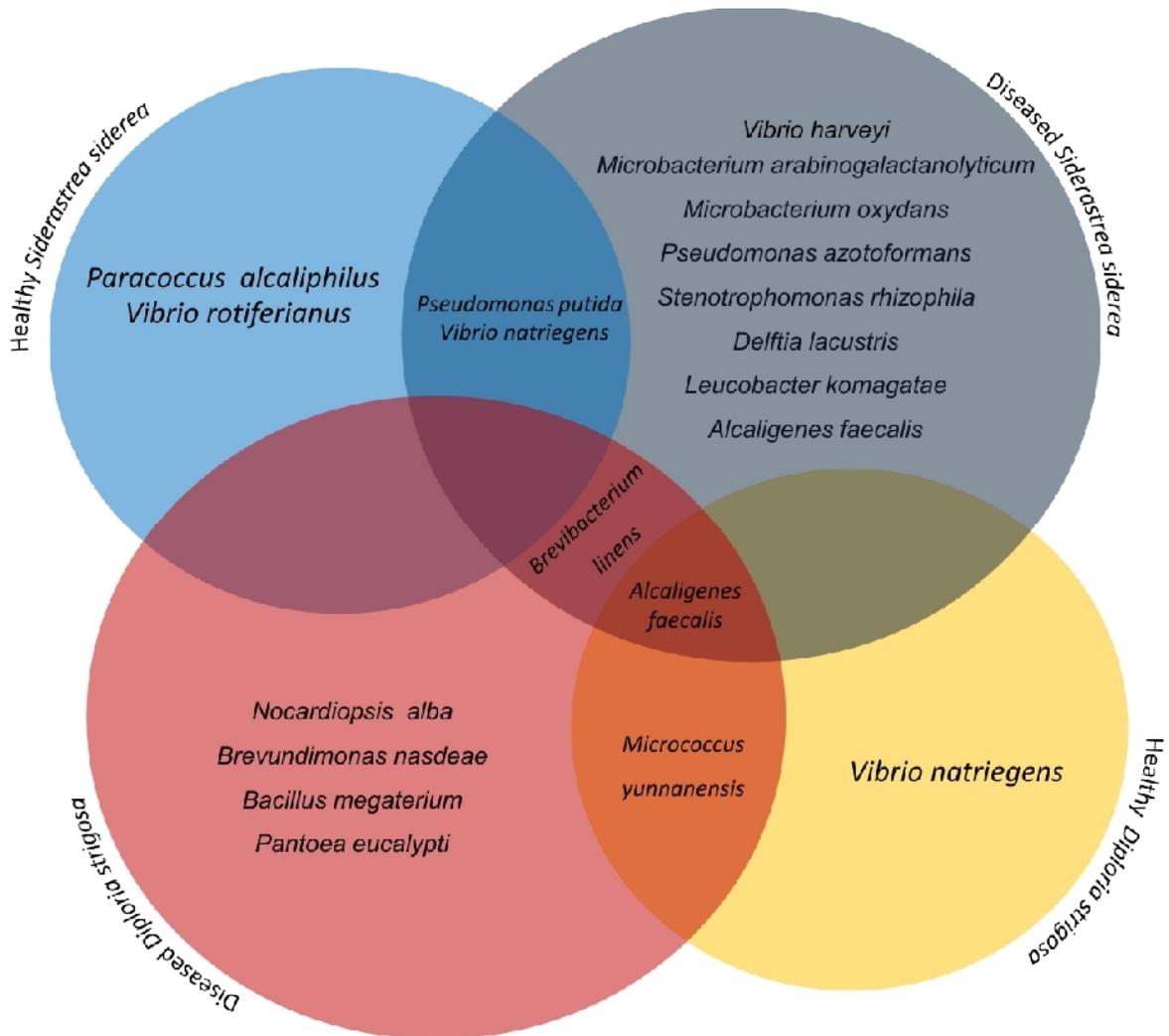


Figura 14. Ejemplo de algunos dendogramas a nivel de género. Los dendogramas fueron realizados utilizando el programa MEGA 4. Usando el algoritmo de agrupamiento *Neighbor Joining* a partir de una matriz de distancias calculada con la distancia p.

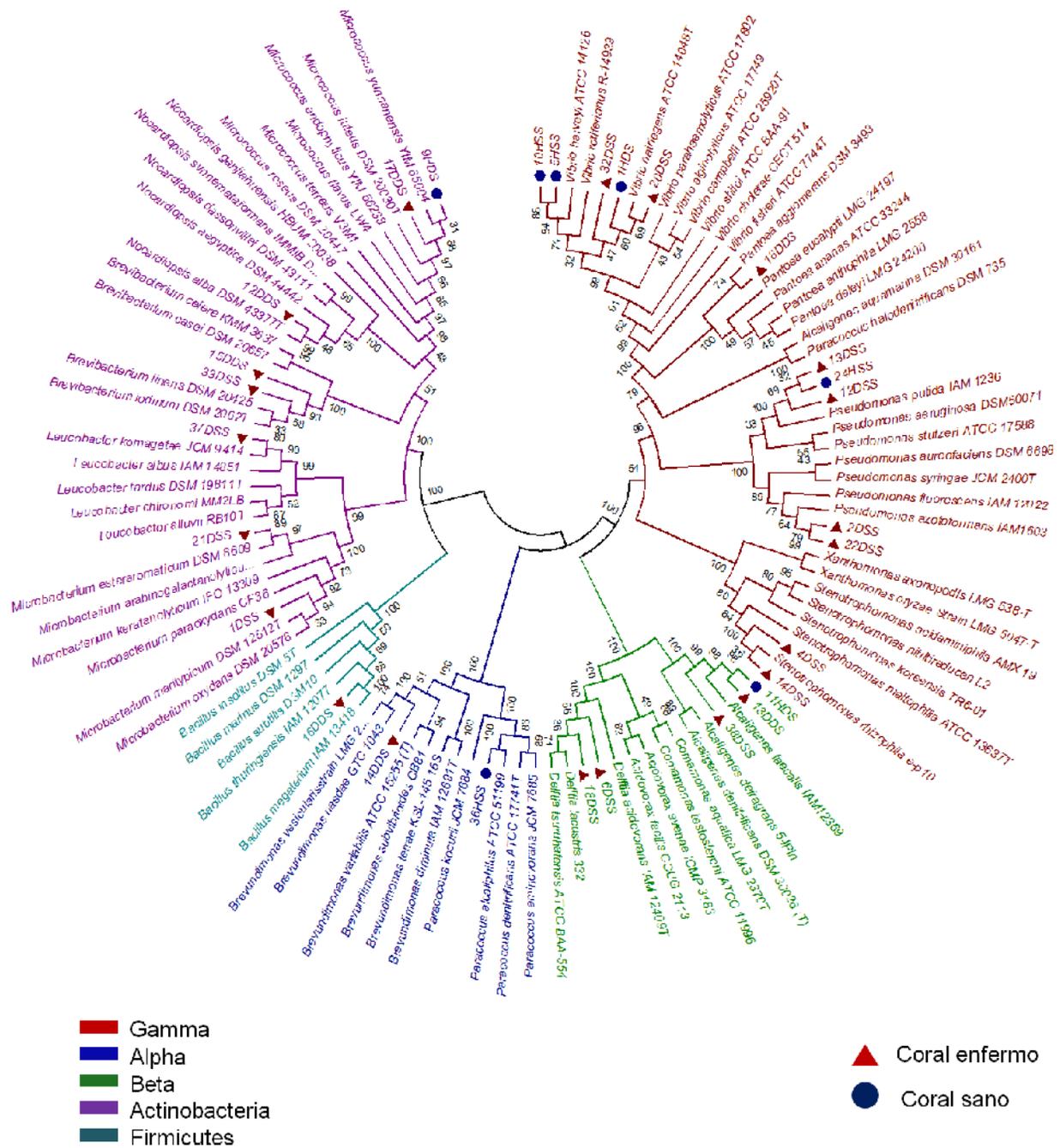
**Tabla 6. Identificación taxonómica de 31 aislamientos procedentes de diferentes muestras de corales utilizando análisis de secuencias del gen ribosomal 16S rADN.**

Designación de la cepa	Muestra	Especie más similar	Distancia p	% similaridad
1SE	SSE	<i>Microbacterium oxydans</i>	0,0000	100,00
2SE	SSE	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	0,0001	99,99
4SE	SSE	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	0,0007	99,93
5SS	SSS	<i>Vibrio rotiferianus</i>	0,0062	99,38
6SE	SSE	<i>Delftia lacustris</i>	0,0046	99,54
8SS	SSS	<i>Vibrio natriegens</i>	0,0039	99,61
10SS	SSS	<i>Vibrio rotiferianus</i>	0,0062	99,38
12SE	SSE	<i>Pseudomonas putida</i>	0,0054	99,46
13SE	SSE	<i>Pseudomonas putida</i>	0,0054	99,46
14SE	SSE	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	0,0001	99,99
18SE	SSE	<i>Delftia lacustris</i>	0,0046	99,54
20SE	SSE	<i>Vibrio natriegens</i>	0,0039	99,61
21SE	SSE	<i>Microbacterium arabinogalactanolyticum</i>	0,0077	99,23
22SE	SSE	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	0,0046	99,54
24SS	SSS	<i>Pseudomonas putida</i>	0,0054	99,46
27SE	SSE	<i>Vibrio natriegens</i>	0,0039	99,61
32SE	SSE	<i>Vibrio harveyi</i>	0,0047	99,53
33SE	SSE	<i>Brevibacterium linens</i>	0,0030	99,70
36SS	SSS	<i>Paracoccus alcaliphilus</i>	0,0000	100,00
37SE	SSE	<i>Leucobacter komagatae</i>	0,0040	99,60
38SE	SSE	<i>Alcaligenes faecalis</i>	0,0253	97,47
1DS	DSS	<i>Vibrio natriegens</i>	0,0118	98,82
9DS	DSS	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	0,0015	99,85
8DE	DSE	<i>Pantoea eucalypti</i>	0,0040	99,60
11DS	DSS	<i>Alcaligenes faecalis</i>	0,0051	99,49
11DE	DSE	<i>Nocardiopsis alba</i>	0,0000	100,00
13DE	DSE	<i>Alcaligenes faecalis</i>	0,0051	99,49
14DE	DSE	<i>Brevundimonas nasdeae</i>	0,0010	99,90
15DE	DSE	<i>Brevibacterium linens</i>	0,0040	99,60
16DE	DSE	<i>Bacillus megaterium</i>	0,0020	99,80
17DE	DSE	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	0,0015	99,85

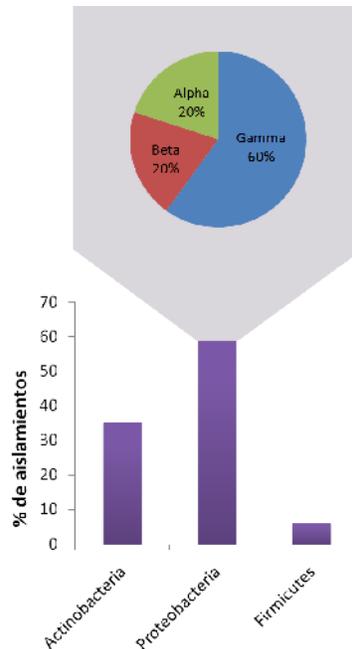
*Siderastrea siderea* enfermo (SSE), *Siderastrea siderea* sano (SSS) *Diploria strigosa* enfermo (DSE) y *Diploria strigosa* sano (DSS).



**Figura 15. Diagramas de Venn de la comunidad cultivable.** *Siderastrea siderea* sano (azul claro), *Siderastrea siderea* enfermo (gris) *Diploria strigosa* sano (naranja) y *Diploria strigosa* enfermo (rojo). (Esta figura hace parte del anexo 1).



**Figura 16. Relaciones taxonómicas de los aislamientos obtenidos a partir de las muestras de corales.** Los aislamientos están marcados con un círculo azul si provienen de muestras del coral sano o con triángulos rojos si provienen de muestras de coral enfermo. Cada color de las ramas corresponde a un grupo taxonómico como muestran las convenciones. El dendograma fue realizado usando el método de agrupamiento *Neighbor Joining* a partir de una matriz de distancias calculada con el modelo distancia p. La validación estadística se realizó por *Bootstrap* de 1000 réplicas. (Esta figura hace parte del anexo 1).



**Figura 17. Porcentaje de aislamientos pertenecientes a los phyla Actinobacteria, Proteobacteria y Firmicutes.** Porcentaje de aislamientos pertenecientes a las diferentes clases de Proteobacteria

### 6.3 Detección de factores de virulencia en aislamientos bacterianos

Para evaluar el potencial de virulencia de los aislamientos que componían cada comunidad, se realizó la detección de 3 factores de virulencia: proteasas, lipasas y hemolisinas. De las 50 cepas probadas para la actividad de estas proteínas, 46 cepas fueron positivas por lo menos para una. El factor de virulencia más abundante fue la actividad lipolítica con 42 positivos, seguido de la actividad proteolítica con 24 positivos y el menos abundante fue la actividad hemolítica con solo 17 positivos. La expresión de factores de virulencia fue equitativa en ambas comunidades (sanos y enfermos) como lo muestran las tablas 7 y 8.

**Tabla 7. Actividad positiva de Hemolisinas, proteasas y lipasas en los aislamientos probados.**

Cepas probadas				Cepas probadas			
	Hemolisinas	Lipasas	Proteasas		Hemolisinas	Lipasas	Proteasas
1SE	+	+	-	33SE	-	+	+
2SE	+	+	+	36SS	+	+	-
3SE	+	+	-	37SE	-	-	-
4SE	-	-	+	38SE	-	-	-
5SS	-	+	+	39SE	-	-	-
6SE	-	-	+	2DS	-	+	-
7SE	-	+	+	3DS	+	+	+
8SS	-	+	+	4DS	-	+	-
9SS	+	+	+	5DS	+	+	-
10SS	-	+	+	6DS	+	+	-
11SS	-	+	+	7DS	+	+	+
12SS	-	+	+	8DS	+	+	-
13SE	-	+	-	9DS	+	+	-
14SE	-	+	+	10DS	+	+	-
15SS	-	+	-	11DS	-	+	+
16SS	-	+	+	7DE	+	-	-
17SS	-	+	+	8DE	-	-	-
18SE	-	+	+	9DE	-	+	+
19SS	-	+	+	10DE	+	+	-
20SE	-	+	+	11DE	+	+	-
22SE	+	+	+	13DE	-	+	-
23SE	-	+	+	14DE	-	+	-
25SE	-	+	-	15DE	-	+	-
27SE	+	+	+	16DE	-	+	-
31SS	-	+	-	17DE	+	-	-

Los signos (+) significan que la cepa fue positiva en alguna de las condiciones fisicoquímicas probadas.

**Tabla 8. Número de aislamientos con actividad positiva para cada factor de virulencia.**

	<b>Enfermos</b>	<b>Sanos</b>
<b>Hemolisinas</b>	9	9
<b>Lipasas</b>	20	22
<b>Proteasas</b>	12	12

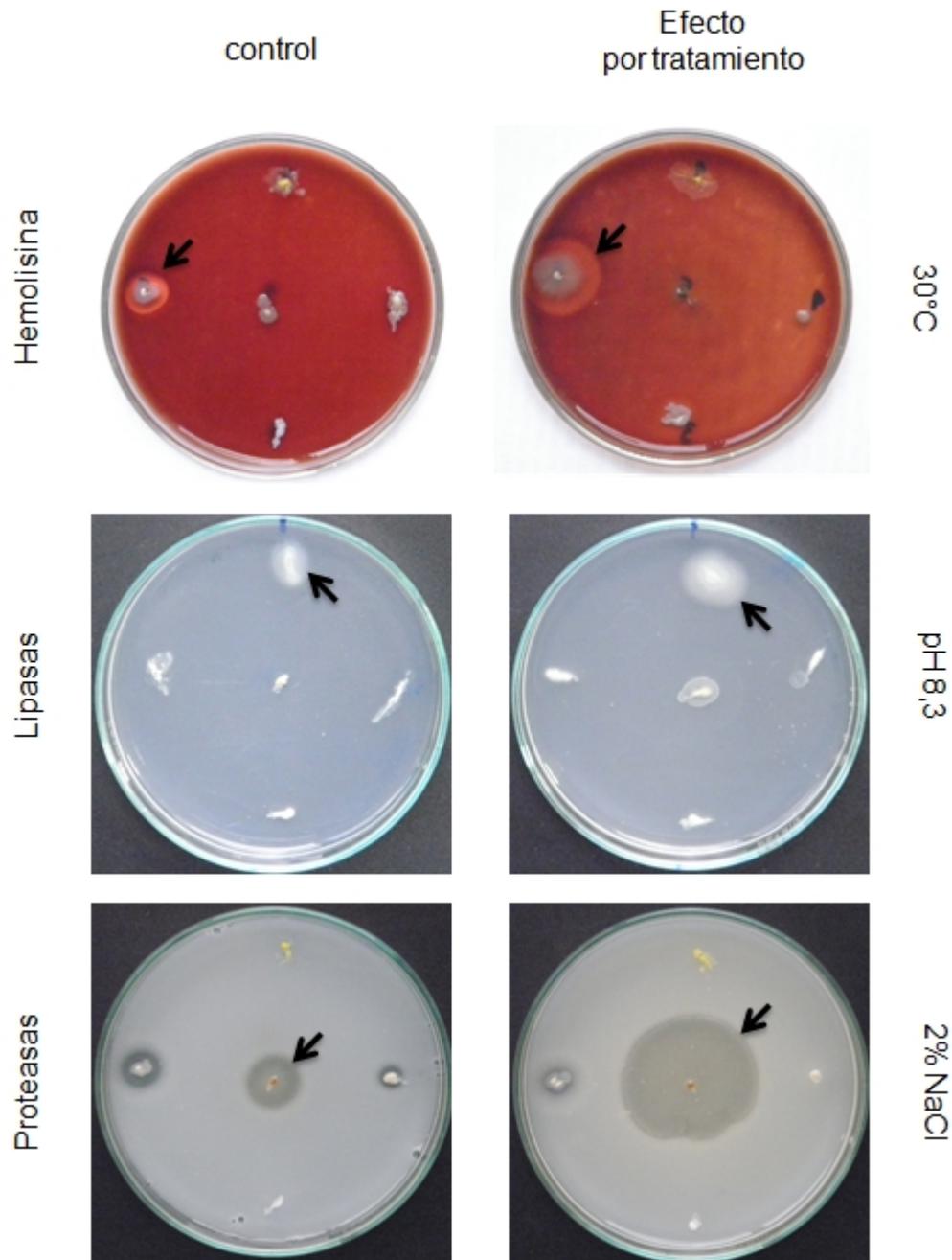
Se contaron las cepas que fueron positivas en alguna de las condiciones fisicoquímicas probadas.

La influencia de variables fisicoquímicas en la expresión de los factores de virulencia fue clara como muestra la figura 18. El factor fisicoquímico que más efecto tuvo en la expresión de la virulencia fue la temperatura. Variaciones en esta, llevaron al aumento en la expresión de 18 hemolisinas, 14 lipasas y 14 proteasas. Sin embargo, tuvo mayor efecto el incremento en la temperatura que su disminución. La expresión de lipasas y proteasas también estuvo influenciada con variaciones en la salinidad y pH. No obstante, disminuciones en la salinidad tuvieron mayor influencia en la expresión de estos dos factores de virulencia. Por otro lado, tanto el aumento como la disminución en el pH presentaron el mismo efecto en potenciar la expresión de lipasas y proteasas. En la tabla 9 se muestran los resultados del número de cepas en las cuales hubo incidencia de cada uno de los factores fisicoquímicos en la expresión de proteasas, hemolisinas y lipasas.

**Tabla 9. Número de cepas en las cuales hubo incidencia de la temperatura, la salinidad y el pH con la expresión de factores de virulencia.**

	<b>Aumento en T°</b>	<b>Disminución de T°</b>	<b>Aumento NaCl</b>	<b>Disminución n NaCl</b>	<b>Aumento pH</b>	<b>disminución pH</b>
<b>Hemolisinas</b>	16	2	-	-	-	-
<b>Lipasas</b>	11	3	4	14	6	8
<b>Proteasas</b>	14	0	2	16	7	6

Las variaciones de NaCl y pH solo fueron evaluadas para lipasas y proteasas



**Figura 18. Efecto de temperatura, pH y salinidad en la expresión de factores de virulencia.**

Izquierda: factores de virulencia expresados con condiciones control (20°C, 0,5% NaCl y pH 7)

Derecha: expresión de factores de virulencia con variación en temperatura (30°C), pH (8,3) y NaCl (2%)

#### 6.4.1 Detección de AHLs en aislamientos bacterianos

La producción de AHLs fue detectada por la producción de violaceína (*Chromobacterium violaceum* CV026), bioluminiscencia (*Escherichia coli* PSB403 y *Escherichia coli* PSB1075), fluorescencia (*Pseudomonas putida* PASC8 y *Pseudomonas putida* pKRC12) y degradación de X-gal *Agrobacterium tumefaciens* pZLR4, *Escherichia coli* pQEXENR2 y *Sinorhizobium meliloti* Rm11558). Por medio de estas cepas biosensoras fue posible detectar la presencia de AHLs con estructura de 4 a 16 carbonos y muchas de ellas con sustituciones de grupos carbonilos e hidroxilos, con lo cual se puede concluir que hay presencia de genes relacionados con circuitos de QS en estos aislamientos. Todas las cepas biosensoras detectaron actividad positiva aunque sea con alguno de los 50 aislamientos probados. En corales sanos las cepas 16SS, 3DS, 5DS y en corales enfermos las cepas 20SE, 22SE, 24SE, 37SE, 39SE, 1DE, 8DE fueron productoras de AHLs, como se muestra en la tabla 10. Muchas de las cepas encontradas pertenecientes a la misma especie mostraron variación en la producción de AHLs. Un ejemplo de lo anterior son los aislamientos 13SE, 12SE y 24SE que fueron identificados como *Pseudomonas putida* y entre ellos, el único aislamiento que produjo AHLs fue el 24SE. De la misma manera sucedió con las cepas identificadas como *Vibrio natriengens*, siendo la cepa productora de AHLs la 20SE y las no productoras las cepas 8SS y 27SE.

Las cepas biosensoras detectaron AHLs en un número mayor de aislamientos procedentes de corales enfermos que de corales sanos en la siguientes proporciones: la cepa *C. violaceum* CV026 detectó 4 vs 1, la cepa *A. tumefaciens* pZLR4 detectó 7 vs 3, la cepa *E. coli* pQEXENR2 detectó 6 vs 0, la cepa *S. meliloti* Rm11558 detectó 3 vs 0, la cepa *P. putida* pASC8 detectó 5 vs 1, la cepa *P. putida* pKRC12 detectó 3 vs 1 y la cepa *E. coli* pSB1075 detectó 5 vs 1 en aislamientos procedentes de corales enfermos vs sanos respectivamente. En contraste la cepa *E. coli* pSB403 detectó 2 positivos en la comunidad sana y 1 en la enferma.

A partir de la comparación de rangos de AHLs detectados por cada uno de los biosensores (tabla 2), se podría inferir que tipo de moléculas están presentes en alguna de las comunidades. Una vez realizadas estas comparaciones podemos decir que en corales sanos se encuentran C4-AHL y C10 y/o C12-AHLs. La cepa 16SS produce probablemente una C4-AHL ya que fue detectada únicamente por la cepa *C. violaceum* CV026 y por *A. tumefaciens* pZLR4. Hay reportes que sustentan que está última cepa puede detectar muy

levemente esta homoserín lactona. La cepa 3DS produjo moléculas que fueron detectadas por *A. tumefaciens* pZLR4, *P. putida* pKRC12 y *E. coli* PSB403. Debido a que esta última cepa biosensora comparte un rango de detección con *C. violaceum* CV026, la cual no detectó ninguna señal producida por 3DS, se podría decir que este aislamiento está produciendo AHLs similares o que no hayan sido reportadas como activadores de respuesta en las cepas biosensoras usadas. La producción de AHLs de la cepa 5DS fue detectada por las cepas biosensoras *A. tumefaciens* pZLR4, *P. putida* PASC8, *E. coli* PSB403 y *E. coli* PSB1075, por lo tanto podría tratarse de C10-AHL y/o C12-AHL ya que estas son las moléculas comunes que pueden detectar las cuatro cepas biosensoras.

Como se mencionó anteriormente, los biosensores fueron capaces de detectar AHLs en un mayor número de aislamientos procedentes de corales enfermos. La producción de AHLs del aislamiento 20SE fue detectada por los biosensores *C. violaceum* CV026, *P. putida* PASC8, *A. tumefaciens* pZLR4, *E. coli* QEXENR2 y *S. meliloti* Rm11558, esto indica puede producir por lo menos tres AHLs entre las siguientes C4-AHL, C10-AHL, C12-AHL, 3O-C14, 3O-C16, 3OH-C6 AHL, 3OH-C8 AHL y 3OH-C10 AHL o similares a estas. La producción de AHLs de la cepa 22SE fue detectada por las cepas biosensoras *A. tumefaciens* pZLR4, *E. coli* pQEXENR2, *P. putida* pKRC12 y *E. coli* pSB1075, de esta manera, las posibles AHLs producidas por esta cepa son C12-AHL, 3O-C10-AHL y 3O-C12-AHL. Las cepas 37SE y 39SE tuvieron el mismo perfil de detección de AHLs que correspondía a la detección con *C. violaceum* CV026, *A. tumefaciens* pZLR4, *E. coli* pQEXENR2, *P. putida* pASC8 y *E. coli* pSB1075. Así, las posibles AHLs producidas son C4-AHL, C10-AHL, C12-AHL, 3-OH-C6-AHL, 3-OH-C8-AHL y 3-OH-C10-AHL. Es importante resaltar que el aislamiento 37SE corresponde a *Leucobacter komagatae*, una bacteria Gram positiva con lo cual se muestra evidencia de la comunicación interespecies.

De esta manera para la comunidad sana de *Siderastrea siderea* la potencial AHLs predominante es la C4-AHL, mientras que para la comunidad enferma en dicho coral puede haber un rango mucho más variables que abarca AHLs de 4 a 16 carbonos que pueden estar sustituidas con grupos carboxilo e hidroxilo. Así mismo en la comunidad sana de *Diploria strigosa* hubo menor diversidad de posibles AHLs detectadas, C10-AHL y/o C12-AHL. En la comunidad enferma de este coral encontramos un rango de AHLs que abarca igualmente moléculas de 4 a 16C con grupos carboxilo e hidroxilo.

**Tabla 10. AHLs producidas por los aislamientos coralinos y detectadas por diferentes cepas biosensoras.**

Cepas probadas								
	CV026	pZLR4	pQEXENR2	Rm11558	pASC8	pKRC12	pSB403	pSB1075
1SE	-	-	-	-	-	-	-	-
2SE	-	-	-	-	-	-	-	-
3SE	-	-	-	-	-	-	-	-
4SE	-	-	-	-	-	-	-	-
5SS	-	-	-	-	-	-	-	-
6SE	-	-	-	-	-	-	-	-
7SE	-	-	-	-	-	-	-	-
8SS	-	-	-	-	-	-	-	-
9SS	-	-	-	-	-	-	-	-
10SS	-	-	-	-	-	-	-	-
11SS	-	-	-	-	-	-	-	-
12SS	-	-	-	-	-	-	-	-
13SE	-	-	-	-	-	-	-	-
14SE	-	-	-	-	-	-	-	-
15SS	-	-	-	-	-	-	-	-
16SS	+	+	-	-	-	-	-	-
17SS	-	-	-	-	-	-	-	-
18SE	-	-	-	-	-	-	-	-
19SS	-	-	-	-	-	-	-	-
20SE	+	+	+	+	+	-	-	-
22SE	-	+	+	-	-	+	-	+
23SE	-	-	-	-	-	-	-	-
24SE	-	+	-	+	+	-	-	-
25SE	-	-	-	-	-	-	-	-
27SE	-	-	-	-	-	-	-	-
31SS	-	-	-	-	-	-	-	-

Las fotos de la bioluminiscencia producida por *E. coli* pSB403 y *E. coli* pSB1075 fueron tomadas usando el digitalizador de imagenes Biorad ChemiDoc™ XRS+ System en la oscuridad. La producción de proteína verde fluorescente de las cepas *P. putida* pASC8 y *P. putida* pKRC12 fue observada en un digitalizador de imagenes Biorad con filtros 530/30 BP. La producción de violaceína por *C. violaceum* CV026 y degradación de X-gal de la cepas biosensoras *E. coli* pQEXENRE, *A. tumefaciens* pZLR4 y *S. meliloti* Rm11558 fueron observadas con luz blanca. El ensayo se realizó en agar LB suplementado con 60 ug/ml de X-gal para la detección de la actividad B-galactosidasa.

Continuación de la tabla 10. AHLs producidas por los aislamientos coralinos y detectadas por diferentes cepas biosensoras.

Cepas probadas								
	CV026	pZLR4	pQEXENR2	Rm11558	pASC8	pKRC12	pSB403	pSB1075
33SE	-	-	-	-	-	-	-	-
36SS	-	-	-	-	-	-	-	-
37SE	+	+	+	-	+	-	-	+
38SE	-	-	-	-	-	-	-	-
39SE	+	+	+	-	+	-	-	+
2DS	-	-	-	-	-	-	-	-
3DS	-	+	-	-	-	+	+	-
4DS	-	-	-	-	-	-	-	-
5DS	-	+	-	-	+	-	+	+
6DS	-	-	-	-	-	-	-	-
7DS	-	-	-	-	-	-	-	-
8DS	-	-	-	-	-	-	-	-
9DS	-	-	-	-	-	-	-	-
10DS	-	-	-	-	-	-	-	-
11DS	-	-	-	-	-	-	-	-
1DE	+	+	+	-	-	+	-	+
7DE	-	-	-	-	-	-	-	-
8DE	-	+	+	+	+	+	+	+
9DE	-	-	-	-	-	-	-	-
10DE	-	-	-	-	-	-	-	-
11DE	-	-	-	-	-	-	-	-
13DE	-	-	-	-	-	-	-	-
14DE	-	-	-	-	-	-	-	-
15DE	-	-	-	-	-	-	-	-
16DE	-	-	-	-	-	-	-	-
17DE	-	-	-	-	-	-	-	-

Las fotos de la bioluminiscencia producida por *E. coli* pSB403 y *E. coli* pSB1075 fueron tomadas usando el digitalizador de imagenes Biorad ChemiDoc™ XRS+ System en la oscuridad. La producción de proteína verde fluorescente de las cepas *P. putida* pASC8 y *P. putida* pKRC12 fue observada en un digitalizador de imagenes Biorad con filtros 530/30 BP. La producción de violaceína por *C. violaceum* CV026 y degradación de X-gal de la cepas biosensoras *E. coli* pQEXENRE, *A. tumefaciens* pZLR4 y *S. meliloti* Rm11558 fueron observadas con luz blanca. El ensayo se realizó en agar LB suplementado con 60 ug/ml de X-gal para la detección de la actividad B-galactosidasa.

#### 6.4.2 Detección de genes tipo *luxI* en aislamientos bacterianos

Los *primers* diseñados que fueron escogidos para llevar a cabo la amplificación de cada uno de los aislamientos se listan en la tabla 11 y 12. Después de estandarizar las condiciones de PCR, hubo productos de amplificación en las cepas 5SS (*Vibrio rotiferianus*), 8SS (*Vibrio natriegens*), 18SE (*Delftia lacustris*), 20SE (*Vibrio natriegens*), 22SE (*Pseudomonas azotoformans*) 27SE (*Vibrio natriegens*), 13SE (*Pseudomonas putida*), 24SE (*Pseudomonas putida*), 36SE (*Paracoccus alcaliphilus*), 8DE (*Pantoea Eucalypti*) y 14DE (*Brevundimonas nasdeae*) como muestra la tabla 13. De la misma manera que se obtuvo usando biosensores para la detección de AHLs, los perfiles de bandeo mostraron también diferencias intraespecíficas para cepas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Vibrio*, como muestran las figuras 19 y 20 respectivamente. En la figura 19, se pueden observar los productos de amplificación de las cepas 13SE y 24SE e ISOF, identificadas como *Pseudomonas putida*, allí se pueden ver claramente productos de amplificación de diferente tamaño. Así mismo para las cepas 5SS y 10SE, ambas identificadas como *Vibrio rotiferianus*. Se escogieron 15 bandas para ser secuenciadas, los resultados de la búsqueda de similaridad por Blast de dichas secuencias obtenidas se muestran en la tabla 14. Muchas de las secuencias correspondían a proteínas hipotéticas de estos organismos, otras estaban relacionadas con reguladores de unión al ADN y proteínas involucradas en sistemas de dos componentes como histidín quinasa.

El amplificado obtenido para la cepa 20SE (*Vibrio natriegens*) usando los *primers* basados en el circuito de *luxM* de *V. harveyi* se pudo relacionar directamente con circuitos de QS. Esta secuencia mostró uno de los mejores puntajes usando Blast contra una fracción de la secuencia codificante del operon LuxLMN de *Vibrio parahaemoliticus*, como se muestra en la tabla 14.

**Tabla 11. Lista de primers diseñados para amplificar el gen tipo luxI de aislamientos bacterianos procedentes de corales.**

nombre	especies	F (5'--3')	R (5'--3')
Pseusy	<i>Pseudomonas syringe</i> y <i>P. savastaoni</i>	GCGGGTTTGAATTTTCAGGTA	TTCACAGGCATATCCAGCAA
Pseufl2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	GCTTTCGGCATGAACAATTC	CAGACGTGAAGCCTGAAGGT
Pseufl2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CTGTTTCGAGTGGGTTTCAGG	AAGTATTCGCCGATCGTTTG
Pseuchl	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	CTTCCACCTCAAGGTCATCC	GCAGGAAGTAACGCTCCAGT
Vibharv	<i>Vibrio Harveyi</i>	TGGTCTGTTCGCGATACTTG	CTAACGAACCGCGTTTTCTG
Vibpara	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	GTTCTTCGCTTCCTCACACC	CGTTGGTTCCAGTCTTGGAT
Delft1	<i>Delftia sp</i>	GAAACCTTGGGATGGGATCT	GATCCAGCAGGCGAAGAG
Acidov	<i>Acidovorax</i>	TCACCGGGTATTCGTAGAGC	CATAGGACCAGCCCATGC
Variov	<i>Variovorax</i>	AGAAACTGGGCTGGAAGCTC	CACCAGTTCTTGTCCACGTC
Panagg	<i>Pantoea agglomerans</i>	TGGCAGGCATGAAAATGTAG	ACCGGCTCAGAAGAAAACA
Panvag	<i>Pantoea vagans</i>	CGACTGACCACTGCGTACAT	ATCGGTTGAAGAAGCGAATG
Panann	<i>Pantoea annanatis</i>	GCATGGAGTCGGATGAGTTT	CAACAATATCCCCACCCAAC
Rhodo	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	GGCTGGGACGTTTCAGATTT	CTTCCGAGCAGTCCATCAG
Pseupu	<i>Pseudomonas putida</i>	CCGCTGTCGAGAATCTGGTA	AATACCGTCGTGACCCACAT

De la primera a la cuarta columna se muestra: el nombre del *primer*, el organismo de donde fue tomada la secuencia, la secuencia del *primer* sentido y la secuencia del *primer* antisentido

**Tabla 12. Aislamientos bacterianos en los cuales se probaron los *primers* diseñados.**

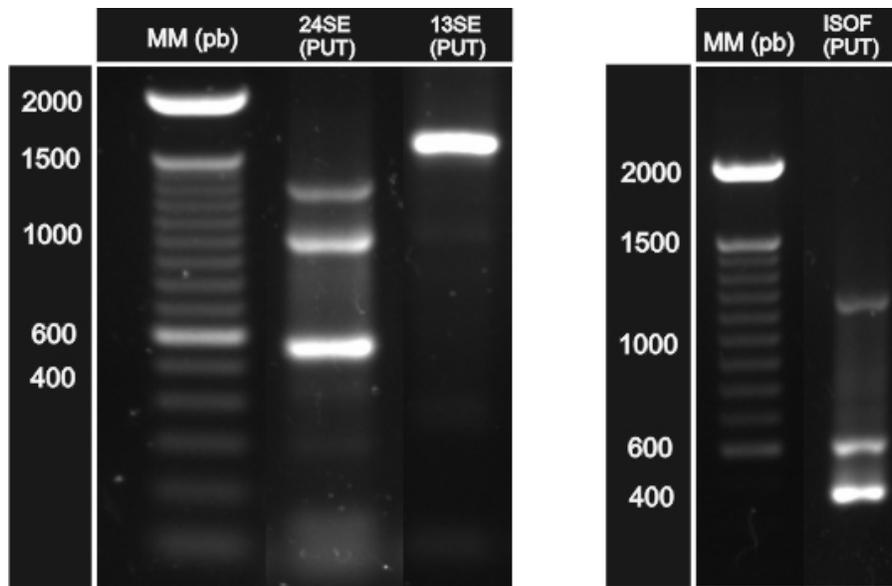
Par de <i>primers</i>	aislamientos bacterianos a probar
Pseusy	2SE, 22SE, 24SE y <i>Pseudomonas putida</i> ISOF
Pseufl2	
Pseufl2	
Pseupu	
Pseuchl	
Vibharv	5SS, 8SS, 10SS, 20SE y 27SE
Vibpara	
Delft1	6SE y 18SE
Acidov	38SE, 11DS y 13DE
Variov	
Panagg	8DE
Panvag	
Panann	
Rhodo	SS36, 14DE

Se muestran cada uno de los *primers* enfrentados a los aislamientos a probar.

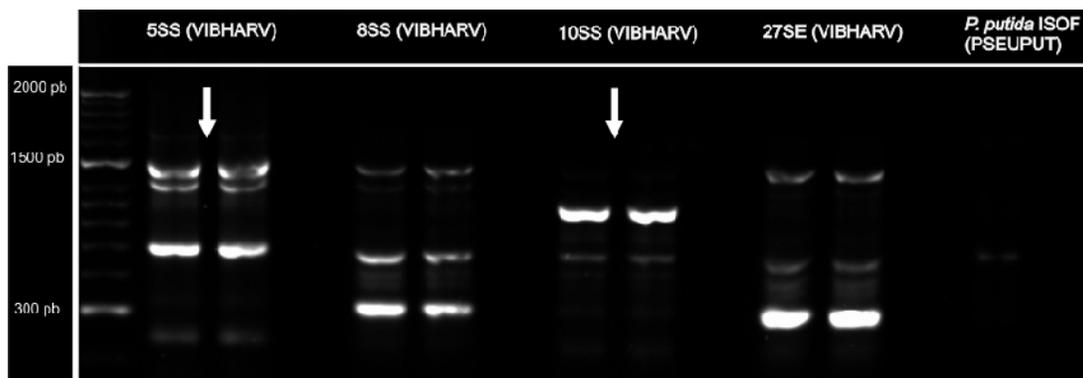
**Tabla 13. Aislamientos bacterianos que tuvieron productos de amplificación usando *primers* diseñados para el gen de la sintetasa de AHLs.**

Cepas		par de <i>Primers</i> usados	Temperatura de fusión de <i>Primers</i>			
			56 °C	60 °C	65°C	TD 62 - 56°C
<i>Vibrio</i>	5SS	VIBHARV	-	banda	-	-
	8SS	VIBHARV	-	banda	-	-
	10SS	VIBHARV	AI	AI	banda	-
		VIBPAR	-	AI	AI	AI
	20SE	VIBHARV	-	banda	-	-
27SE	VIBHARV	-	banda	-	-	
<i>Pseudomonas</i>	13SS	PSEUDOSY	banda	-	-	-
		PSEUDOCHL	-	-	-	bandas
		PSEUDOPUT	AI	-	-	-
	22SE	PSEUDOSY	AI	AI	-	AI C
		PSEUDOFL1	AI	AI	AI	AI
		PSEUDOFL2	AI	AI	AI	AI
		PSEUDOCHL	AI	AI	AI	AI
		PSEUDOPUT	AI	AI	AI	AI
	24SE	PSEUDOFL1	-	banda	-	-
		PSEUDOFL2	-	banda	-	-
PSEUDOCHL		banda	bandas	AI	-	
PSEUDOPUT		AI	banda	-	-	
control	PSEUDOPUT	banda	banda	-	-	
<i>Deftia</i>	18SE	DELFT	-	AI	AI	AI
Alphaproteobacteria	14DE	RHODO	AI	AI	AI	AI
<i>Pantoea</i>	8DE	PANVAG	-	AI	-	-
		PANANN	-	banda	-	-

En la tabla se muestran las condiciones de anillamiento (56°C, 60°C, 65°C y *touch-down* de 62 a 56°C) con las cuales se obtuvo algún producto de amplificación: bandas o “Amplificación inespecífica” (AI) La columna izquierda muestran los géneros a los que pertenece cada una de los aislamientos en los cuales hubo productos de amplificación.



**Figura 19. Perfiles de bandeo de las cepas 13SE, 24SE y *Pseudomonas putida* ISOF.** Izquierda. Patrón de bandeo de cepas 13SE y 24 SE. Derecha. Patrón de bandeo de *Pseudomonas putida* ISOF. Las bandas amplificadas fueron visualizadas en un gel de agarosa al 1%. El número de pares de bases de cada banda se muestra en rojo para las cepas y en azul para los marcadores de peso molecular.



**Figura 20. Perfiles de bandeo de las cepas 5SS, 8SS, 10SS, 27SE 24SE.** El patrón de bandeo muestra la variación interespecíficas entre las cepas 5SS y 10SS, ambas identificadas como *Vibrio rotiferianus*. Las bandas amplificadas fueron visualizadas en un gel de agarosa al 1%.

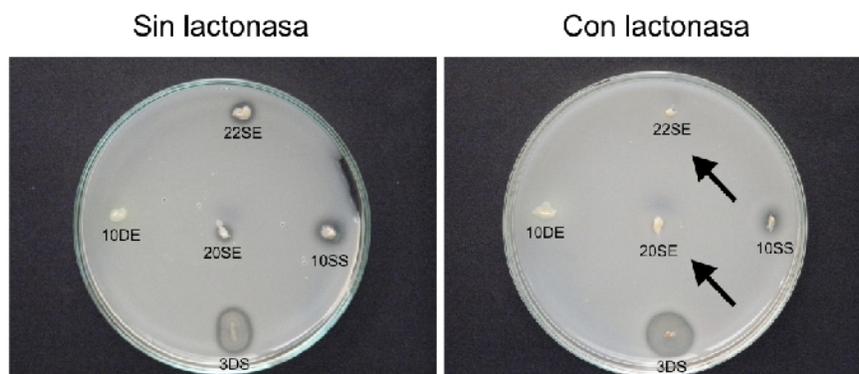
**Tabla 14. Resultados de búsqueda de genes por Blast de las secuencias obtenidas al amplificar con los primers diseñados para el gen tipo luxI.**

cepa (primers usados)	nucleótidos obtenidos	Resultado Blast	Valor E	Porcentaje de cobertura	máxima identidad
5SS (HARV)	204	Sistema de dos componentes de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	9,7	27%	77%
5SS (HARV)	511	Ubiquinol oxidasa de <i>Vibrio harveyi</i> ATCC BAA-1116	9x10 <sup>-83</sup>	53%	80%
8SS (HARV)	103	5' regulador de union a DNA 3' proteína hipotética de <i>Vibrio harveyi</i>	2x10 <sup>-10</sup>	57%	86%
20SE (HARV)	317	Operon LuxLMN de <i>Vibrio harveyi</i>	9,3	10%	100%
27SE (HARV)	680	Regulador de respuesta de union a DNA en el cromosoma II <i>Vibrio harveyi</i>	1x10 <sup>-4</sup>	20%	76%
27SE (HARV)	1000	Proteína hipotética del cromosoma II de <i>Vibrio harveyi</i>	1x10 <sup>-33</sup>	11%	90%
13SE(SYR)	203	Acetil-Coa Tioesterasa de <i>Pseudomonas putida</i> W619	4x10 <sup>-7</sup>	78%	74%
24SE (FL1)	201	Proteína hipotética de <i>Novosphingobium aromaticivorans</i> DSM 12444	0,78	18%	86%
24SE (FL2)	200	Metiltransferasa de <i>Streptomyces venezuelae</i> ATCC 10712	2,7	18%	83%
24SE (FL2)	1000	Lipasa "patatina" de <i>Pseudomonas putida</i>	6x10 <sup>-68</sup>	19%	91%
24SE (PUT)	915	Proteína hipotética de <i>Pseudomonas putida</i>	2x10 <sup>-9</sup>	45%	77%
ISOF(PUT)	200	Proteína hipotética de <i>Dichelobacter nodosus</i> VCS1703A	0,064	23%	83%
ISOF(PUT)	106	Proteína hipotética de <i>Rhodospseudomonas palustris</i> HaA2	1,2	19%	100%
ISOF(PUT)	200	5' histidine kinase reguladora y 3' proteína hipotética de <i>Rahnella aquatilis</i>	1x10 <sup>-5</sup>	72%	70%
36SE (ANN)	198	no hay similaridad	-	-	-

Se reportó el mejor *match* obtenido teniendo en cuenta el valor E, el porcentaje de cobertura el puntaje máximo y la máxima identidad.

## 6.5. Inhibición de la virulencia mediada por lactonasas

De los 5 aislamientos probados en el ensayo de expresión de factores de virulencia con la presencia de la lactonasa AiiB de *Agrobacterium tumefaciens*, solo 2 de ellos (20SE isentificada como *Vibrio natriegens* y 22SE identificada como *Pseudomonas azotoformans*) mostraron una reducción en la expresión de proteasas como lo muestra la figura 21. La expresión de lipasas y hemolisinas no se vio afectada por la presencia de la lactonasa.



**Figura 21. Efecto de la lactonasa AiiB de *Agrobacterium tumefaciens* en la expresión de proteasas de 5 aislamientos coralinos.** Ambos ensayos fueron realizados sobre agar leche. Al ensayo con lactonasa (Derecha) se le añadieron en superficie 800ul del sobrenadante de la cepa mutante W79 de *E. coli*, productora de dicha lactonasa. Al ensayo control (izquierda) no se le adicionó nada.

## 7. DISCUSION

Un punto importante en el campo de estudio de las enfermedades infecciosas, es la identificación de microorganismos causantes primarios de la enfermedad y con esto la comprobación de los postulados de Koch. Sin embargo, el cumplimiento de estos postulados es un tema controversial, ya que al parecer el escenario de la patogénesis infecciosa es increíblemente más amplio que cumplir con el requisito de la detección de un agente infeccioso en una muestra y re-infectar un organismo sano. La principal crítica actual a estos postulados, es que no involucran aspectos epidemiológicos, inmunológicos, estados asintomáticos, factores ambientales entre otros aspectos que pueden estar involucrados en el desarrollo de una enfermedad. En el caso de las enfermedades coralinas, el problema es aún más complejo, debido a que una gran cantidad de especies bacterianas no pueden ser aún cultivables en el laboratorio, por tanto sus actividades fisiológicas son completamente ignoradas y por ende su habilidad para causar enfermedad. De esta manera, los posibles mecanismos para el control y tratamiento todavía requieren de mucha investigación teniendo en cuenta que incluso el diagnóstico aún es un reto. No obstante, uno de los problemas que se presentan para este tipo de estudios es el de no poder cultivar la gran mayoría de las bacterias en el laboratorio, sin embargo, esta limitante está siendo superada gracias al desarrollo de herramientas que permiten el estudio de comunidades microbianas en diferentes ambientes sin necesidad de cultivo en el laboratorio.

La principal preocupación en el momento de estudiar una enfermedad siempre ha sido tratar de relacionar agentes causales o “patógenos”. Pero, ¿Qué tanto conocemos el término patogenicidad? las enfermedades coralinas al parecer nos están dando una lección que va un poco más allá de la microbiología de 1890 en donde difícilmente podemos explicar la aparición de una enfermedad por la presencia de un microorganismo dado. En este trabajo se muestra un claro ejemplo desde el campo de la microbiología coralina, en donde se resalta la importancia de relacionar la teoría del ensamblaje de comunidades ecológicas para explicar la salud de complejos sistemas vivos como el caso de los holobiontes coralinos.

Como se mencionó en el estado del arte, la salud de este sistema biológico esta cimentada principalmente en 3 componentes: La inmunidad del coral, la complejidad de las comunidades de micro-simbiontes y los factores ambientales. Una disrupción en cualquiera de estos componentes puede llevar fácilmente del estado de salud al de enfermedad. Los resultados de este trabajo muestran un claro ejemplo en el cual durante la enfermedad hay una la ruptura en el segundo componente, caracterizada por procesos sucesionales en las comunidades bacterianas. No obstante con estos resultados no es posible determinar aún si ésta es una causa o una consecuencia de la enfermedad

## **7.1. Estructura taxonómica de las comunidades bacterianas**

La estructura taxonómica de la bacteriobiota de *Siderastrea siderea* y *Diploria strigosa* sugiere que el phylum dominante en ambos corales es Proteobacteria y en menores proporciones se encuentran los phyla Firmicutes, Actinobacteria y Bacteroidetes (figura 7), como se ha descrito también en otros artículos para la gran mayoría de corales, esponjas y otros organismos marinos (Kvennefors et al., 2010; Li et al., 2007; Santiago-Vazquez LZ et al., 2007). Esto sugiere que microorganismos marinos pertenecientes a este phylum han desarrollado tropismo por los tejidos animales y han logrado establecer relaciones con ellos exitosamente. Así mismo, a este nivel taxonómico las microbiotas de muchos otros organismos terrestres como plantas y animales han sido muy bien descritas, entre estos últimos especialmente en humanos, de los cuales se sabe en detalle qué phyla predominan en cada parte del cuerpo. Por ejemplo se sabe que tanto el esófago, la vagina y el canal externo auditivo están dominados por Firmicutes, el pene y la boca por Proteobacteria, y la piel, el cabello y las fosas nasales están dominadas por Actinobacteria, lo que muestra un tropismo particular y la especificidad en las relaciones entre las células bacterianas y las eucariotas (Spor et al., 2011 ). No obstante, las comunidades bacterianas han sido estudiadas más profundamente a través de su estructura taxonómica pero los acercamientos funcionales de esos taxas aun son insuficientes para proponer generalidades. Por esto es frecuente encontrar qué phylum bacteriano es el más abundante en cada tejido, sin embargo, aun no es clara la distinción de procesos fisiológicos y de gremios tróficos entre los diferentes linajes bacterianos. Esta especificidad taxonómica que tienen las células procariotas al colonizar un tejido obliga a que emerja entre ellas un

riguroso control de la abundancia en la que se encuentra cada uno de los diferentes grupos. Esto ocurre en cualquier nivel taxonómico, por parte tanto de células procariotas como eucariotas. De esta manera es como se establecen las comunidades microbianas, denominadas microbiotas, que han emergido de procesos de co-evolución con el huésped, con otros microorganismos presentes y con factores ambientales, que aún desconocemos y que contribuyen en la homeóstasis de todos los organismos superiores (Arrieta and Finlay, 2012; Sekirov et al., 2010). Estas relaciones particulares entre huéspedes y hospederos llevan a que organismos relacionados tengan microbiotas similares y compartan los mismos phyla dominantes como muestra el estudio desarrollado por Swanson y colaboradores (2011), en donde caracterizan el microbioma de canes y al compararlo con otros grupos animales, hallan una gran similitud entre el microbioma de otros mamíferos caracterizados previamente como humanos y ratones (Swanson et al., 2011).

Se realizó un análisis en detalle para cada una de las clases que componen el phylum Proteobacteria debido a que fue el mayoritario. Aquí el principal resultado fue la comparación de las abundancias relativas de las diferentes clases de Proteobacteria en donde se observan cambios comunes para las dos especies que consisten en el aumento de Alphaproteobacterias y la disminución de las Gamma y las Betaproteobacteria en organismos enfermos. El incremento de bacterias pertenecientes a Alphaproteobacteria y de bacterias pertenecientes a la familia Rhodobacteriaceae, en especial las pertenecientes al género *Rhodobacter*, ya había sido reportado por Pantos y colaboradores en el 2003 y por Sunagawa y colaboradores en el 2009 para la Plaga Blanca en las especies *Montastrea annularis* y *Montastrea faveolata* respectivamente (Pantos et al., 2003; Sunagawa et al., 2009). Del mismo modo, el aumento de ciertos grupos de Alphaproteobacteria se ha reportado para otras enfermedades como es el caso de la Banda Negra, para la cual se sugiere una etiología polimicrobial que involucra bacterias reductoras y oxidantes del azufre (Barneah et al., 2007; Sato et al., 2010; Sekar et al., 2006), así mismo se reporta para la enfermedad de la Banda Blanca en el coral *Acropora palmata* (Pantos and Bythell, 2006).

El aumento de las Alphaproteobacteria no solo se ha relacionado en casos de enfermedad, se ha reportado también el incremento en sus abundancias durante otras situaciones que causan estrés al coral. En el 2009 se sometieron corales a diferentes tipos de estrés como aumentos en la temperatura, disminución en pH, aumento en el carbono orgánico disuelto (DOC) y de nutrientes. Los autores encontraron que con cada uno de estos tratamientos cambiaba drásticamente la abundancia de las Alphaproteobacteria (Thurber et al., 2009).

En otro estudio, algunos miembros de la clase Alphaproteobacteria fueron postulados como responsables de los cambios del DOC, los autores sugirieron que estas bacterias deben tener propiedades metabólicas características que facilitan la transformación de DOC (Nelson et al., 2011). Finalmente, en el 2011 se evaluaron gradientes de salinidad y su efecto en los cambios en la abundancia de ciertos grupos bacterianos y se encontró que tanto las Alpha como las Gammaproteobacteria aumentan sus densidades en respuesta al incremento en la salinidad (Herlemann et al., 2011).

Lo anterior sugiere que la clase Alphaproteobacteria puede tener un amplio repertorio de rutas metabólicas y mecanismos fisiológicos adaptativos los cuales favorecen su supervivencia en diferentes ambientes. Por esta razón se podría concebir a este grupo bacteriano como colonizadores oportunistas que se encuentran tanto en la columna de agua como en la microbiota normal del coral y que durante eventos de degradación del tejido coralino o en respuesta a cambios en las condiciones ambientales, pueden hacer uso de los nutrientes resultantes de la degradación del coral que están disponibles en el mucus o pueden estar contribuyendo a el deterioro del tejido.

Con el fin de entender la dinámica de las comunidades bacterianas durante la enfermedad se realizó un análisis más detallado a nivel de orden dentro de las tres diferentes clases de Proteobacteria. Estos resultados mostraron en su mayoría que los ordenes involucrados en la desestabilización de los grupos taxonómicos son independientes de la especie de coral. Los órdenes Caulobacterales y Xanthomonadales aumentan únicamente en *Diploria strigosa* y por el contrario disminuyen *Siderastrea siderea* durante la enfermedad. Mientras que el orden Rhizobiales al que pertenece *A. coralicida* aumenta en *Siderastrea siderea* y disminuye en *Diploria strigosa*. No obstante no hay ningún reporte de la dinámica de estos grupos en los dos estudios previos del 2003 y 2009. Por el contrario los ordenes Alteromonadales y Rhodobacterales aumentaron en las dos especies de corales de este estudio. El orden Alteromonadales aumentó también durante la enfermedad en el estudio de Sunagawa (2009) y el orden Rhodobacterales aumentó tanto en el estudio de Sunagawa (2009) como en el de Pantos (2003). Esto indica que especies pertenecientes a estos órdenes pueden tener un papel importante en el desequilibrio del holobionte y el consecuente desarrollo de la enfermedad. Otro resultado que cabe destacar fue la presencia de algunas secuencias pertenecientes a los géneros *Roseomonas* (Rhodospirillales) y *Alteromonas* (Alteromonadales) en las muestras de corales enfermos, los cuales son conocidos por mantener estrechas asociaciones con dinoflagelados tóxicos

y por tanto se cree que están involucrados en la inducción de la expresión de ciertas toxinas (Hold et al., 2001a; Hold et al., 2001b). Además, miembros del género *Roseomonas* están involucrados en el desarrollo de la enfermedad de las ostras juveniles (JOD) la cual causa una pérdida significativa en la producción de ostras mundialmente (Boettcher et al., 2000) y posiblemente este género podría tener también una función importante en el desarrollo de enfermedades en corales.

Otra manera de comparar las comunidades bacterianas entre las diferentes muestras fue por medio de análisis de diversidad y riqueza. La estimación de la riqueza se realizó mediante el número de OTUs observadas y el número teórico (Chao1). Como muestra la tabla 5, los valores teóricos tuvieron valores del doble de magnitud de los observados, probablemente debido a que submuestreo repetido de las 800 secuencias no representó toda la diversidad posible encontrada en la muestra. Esto también se observa en las curvas de rarefacción (figura 10) y su tendencia poco asintótica. Sin embargo, la cantidad de secuencias fue suficiente para observar cambios comunes importantes en la estructura de la composición taxonómica de la comunidad bacteriana. Es importante resaltar en este punto que los índices de diversidad y riqueza muestran tendencias completamente opuestas entre los dos corales: la bacteriobiota de *Siderastrea siderea* disminuye su riqueza y diversidad durante la enfermedad, mientras que la bacteriobiota de *Diploria strigosa* aumenta su riqueza y diversidad durante la enfermedad. Una tendencia similar se observó para *Montastrea annularis* y para *Montastrea faveolata*, como lo muestran los reportes anteriores (Pantos et al., 2003; Sunagawa et al., 2009), Ambas especies coralinas aumentan los valores de riqueza y diversidad microbiana al igual que lo encontrado para *Diploria strigosa* en este estudio. Es posible que la variación en la estructura taxonómica que refleja la microbiota de corales enfermos, esté determinada por la microbiota normal de cada uno de ellos, de lo cual se hablará más adelante teniendo en cuenta el análisis de Jaccard realizado en este estudio. La posible explicación que se da a esto es que corales más relacionados filogenéticamente tienen microbiotas con estructuras taxonómicas más similares como se mencionó en el ejemplo de los canes. Por esta razón, si se tiene en cuenta que la enfermedad puede ocurrir por la llegada de colonizadores oportunistas o por el aumento descontrolado de ciertos grupos taxonómicos que hacen parte de la bacteriobiota normalmente asociada al coral, las dinámicas poblacionales serán similares en organismos con comunidades bacterianas de composición taxonómica similar. Con el análisis de Jaccard se observó que los cambios en la estructura de la comunidad no son lo suficientemente comunes entre los corales enfermos para formar una agrupación separada

a la de los sanos, es decir, este análisis muestra que las similitudes en la microbiota propia de cada especie son más fuertes que los cambios sucesionales debido a la enfermedad en especies poco relacionadas, figura 11. Podría esperarse que un análisis con especies de corales más emparentadas filogenéticamente, por tanto con microbiotas más similares, se pudiera ver la agrupación de microbiotas enfermas y la agrupación de microbiotas sanas. En el caso de nuestro estudio, el agrupamiento de microbiotas sana y enferma según la especie de coral, muestra que la enfermedad no está caracterizada por una microbiota típica a este nivel taxonómico, sino que el desbalance en la microbiota nativa depende de la composición de esta.

Otro punto importante en este estudio es que al igual que en el de Polson en el 2008 y el de Sunagawa 2009, la cepa reportada como agente etiológico de la Plaga Blanca, *Aurantimonas coralicida*, no estaba presente en ninguna de las comunidades muestreadas, así como tampoco *Thalassomonas loyana*. Estos resultados reafirman la idea que se plantea en este trabajo y es que el inicio de la patología no está dada por un agente responsable, sino que ésta puede ser una consecuencia que trae la dinámica de las comunidades bacterianas o que por el contrario, existen factores externos que están involucrados en la patogénesis y esto lleva como consecuencia el desbalance en la microbiota nativa.

El conocimiento de la estructura taxonómica de las comunidades bacterianas de estos corales en su estado de salud y enfermedad fue enriquecido en este estudio con 71 aislamientos bacterianos que pudieron ser cultivados y purificados. Este es primer trabajo en donde se realizan ensayos funcionales con comunidades cultivables de la enfermedad de la Plaga Blanca, cabe resaltar la importancia de estos resultados ya que en muchos estudios se han dejado de lado, dado que la comunidad cultivable representa menos del 1% de la real. Su valor radica en que son el primer acercamiento que relaciona la capacidad fisiológica de los microorganismos que componen estas comunidades y la enfermedad. Este hallazgo podría responder preguntas de la enfermedad de la Plaga Blanca desde una aproximación metabólica.

De los diferentes aislamientos, 31 fueron identificados por secuenciación del gen ribosomal 16S rADN, mostrando gran correspondencia con los resultados por pirosecuencia en lo que respecta a los taxas dominantes (Gammaproteobacterias del phylum Proteobacteria). Muchas de las especies encontradas han sido reportadas antes como pertenecientes a la flora normal de otros organismos como por ejemplo *Vibrio rotiferianus* asociado a la

microbiota normal de rotíferos (Gomez-Gil et al., 2003), *Microbacterium oxydans* y *Norcardiopsis alba* asociadas a tejidos de insectos (Patil et al., 2010; Pidiyar et al., 2004). Otras involucradas han sido aisladas en infecciones nosocomiales como *Stenotrophomonas rhizophila* cuando normalmente se encuentran asociadas con plantas (Waters et al., 2007). El diagrama de Venn (figura 15) muestra claramente que la bacteriobiota de las dos especies coralinas es diferente y no hay especies que se encuentren en los dos organismos sanos. Por el contrario *Brevibacterium linens* aparece únicamente en las muestras de corales enfermos como un posible ejemplo de un colonizador oportunista de tejidos en descomposición.

La caracterización bioquímica de los aislamientos mostró un mayor número de bacterias procedentes de corales sanos son capaces de degradar mayor número de fuentes de carbono que las del enfermo. Sin embargo, un tejido en descomposición tiene una mayor cantidad de DOC y por lo tanto se esperaría que los microorganismos que habiten allí sean capaces de utilizar más fuentes de carbono en contraste con microorganismos que normalmente habitan el mucus coralino, donde tienen que valerse de proteasas para liberar las escasas fuentes de carbono que no están siempre disponibles. Por esta razón y por el hecho de que las bacterias de la clase Alphaproteobacteria aumenten en ambientes ricos en DOC, según diferentes autores (Nelson et al., 2011; Sun et al., 2011), se sugiere que este es un punto importante que debe tenerse en cuenta para posteriores estudios de la enfermedad.

## **7.2. Potencial de virulencia de las comunidades bacterianas asociadas a corales *S. siderea* y *D. strigosa***

La presencia de factores de virulencia en una cepa refleja el potencial de virulencia de la misma, de esta manera el inicio de una patología esta dado por la expresión de factores de virulencia entre los individuos que componen la comunidad. Los resultados claramente muestran que no hay diferencias entre el potencial de virulencia de aislamientos provenientes de corales enfermos en comparación con los provenientes de sanos, en ese

sentido ambas comunidades cultivables tendrían el mismo potencial para desencadenar dicha patología si esta dependiera de alguno de los tres factores de virulencia detectados. Por esta razón es necesario resaltar la importancia de la regulación de la expresión de dichos factores que pueden ser expresados bajo ciertas condiciones ambientales. La presencia de la actividad proteolítica y lipolítica no necesariamente está relacionada con un estado virulento de los microorganismos, ya que estas enzimas son usadas para la obtención de fuentes de nutrientes y adaptación al ambiente. Sin embargo una gran proporción de estas proteínas extracelulares son reconocidas por mediar papeles importantes durante la infección (Shinoda and Miyoshi, 2011).

Entre las cepas probadas, 19 de ellas (*Pseudomonas azotoformans* (2SE), *Vibrio rotiferianus* (5SS), *Vibrio natriegens* (8SE), *Vibrio rotiferianus* 10SS, *Pseudomonas putida* 12SS, *Delftia lacustris* (18SE), *Vibrio natriegens* (20SE), *Pseudomonas azotoformans* (22SE), *Vibrio natriegens* (27SE), *Brevibacterium linens* (33SE), *Alcaligenes faecalis* (11DS), *Micrococcus yunnanensis* (9DE) y los aislamientos 7SE, 11SS, 16SS, 17SS, 19SS, 3DS y 7DS) pueden representar microorganismos potencialmente virulentos para el coral, ya que tienen la capacidad de expresar lipasas y proteasas. Entre estas, las cepas 2SE, 9SS, 22SE, 27SE, 3SD, 7DS, 11DS, presentaron además hemolisinas.

Como se muestra en la tabla 8, los efectos del aumento en la temperatura en la expresión de factores de virulencia son indudables. Se detectaron 84 factores de virulencia de los cuales 41 aumentaron su expresión con incrementos en la temperatura y solo 5 aumentaban su expresión con disminuciones en esta. Esto es concordante con un gran número de reportes que relacionan la temperatura con la prevalencia de enfermedades en el Caribe, como por ejemplo la Banda Negra y el blanqueamiento (Kuehl et al., 2011; Rosenberg and Ben-Haim, 2002), ya que la temperatura puede ser un determinante en la expresión de factores de virulencia en la comunidad microbiana. Sin embargo, aún no se conocen los mecanismos por los cuales se desencadena el daño tisular en estas condiciones para el caso de las enfermedades coralinas. Desde finales del siglo 19 se ha reportado que un incremento en la temperatura oceánicas de 0,6°C en un periodo de 10 años (Houghton et al., 2001) ha desencadenado el blanqueamiento coralino. Aunque es el factor más contribuyente, cabe resaltar que no solo la temperatura puede llevar al estrés algal, animal o fisiológico, sino también la salinidad, el pH o la actividad fisiológica de ciertas bacterias en el tejido (Buddemeier et al., 2004). Es común que en cualquier tipo de estrés dentro del holobionte lleve al blanqueamiento debido a interrupciones en los procesos de

fotosíntesis y con ello, la pérdida directa de *Symbiodinium* (Douglas A 2003; Meehan and Ostrander, 1997). Otros estudios basados en la composición de microsimbiontes asociados con las superficies del coral, muestran como aumentos en la temperatura son suficientes para desestabilizar la estructura taxonómica de las comunidades de microorganismos epibiontes (Webster et al., 2011), sugiriendo que los cambios en la temperatura pueden promover el crecimiento de diferentes microorganismos que actúan como colonizadores oportunistas y en muchos casos estos ligeros cambios climáticos son activadores de diferentes respuestas de virulencia. Este es el caso de la expresión de ciertas proteínas en *Vibrio coralliilyticus*, únicamente cuando la temperatura es mayor a 27°C. Estas proteínas involucran hemolisinas, proteasas, resistencia a antibióticos y otras que componen los sistemas de motilidad, entre muchas otras (Kimes et al., 2011).

A pesar de que muchos reportes sugieren que el incremento en la temperatura está contribuyendo a la degradación de arrecifes, otros estudios han demostrado que ciertos corales son capaces de sobrevivir a estas condiciones ambientales debido a la presencia de determinados grupos del dinoflagelado que se encuentran en la superficie del coral. Esto ha permitido que ciertas especies de corales alcancen una mayor distribución a través de la columna vertical y se ha abierto el panorama al estudio de la resistencia relacionada con la temperatura (Berkelmans and van Oppen, 2006). Sin embargo la temperatura no solo favorece el aumento en la densidad de ciertos organismos y la expresión de factores de virulencia sino que también contribuye con la disminución del crecimiento normal del coral (Lough and Barnes, 2000; Nie et al., 1997 ). Bessat y Buiges en el 2001 mostraron como un cambio en 1°C aumentaba la calcificación del coral en un 4,5% (Bessat and Buiges, 2001). Muchas veces estos desbalances en la biomasa del coral están acompañados de blanqueamiento coralino por estrés animal debido a la incapacidad de sustentar microsimbiontes por falta de masa celular y por esta razón son más susceptibles a entablar relaciones de competencia con otras bacterias y algas llevando al desarrollo de diversas enfermedades.

Además de la influencia de la temperatura, se observó que las lipasas y proteasas estaban fuertemente influenciadas también por la disminución en la concentración de NaCl (tabla 9). Se ha visto en reportes anteriores que especies de los géneros *Vibrio* y *Photobacterium* aumentan su virulencia en medios con baja salinidad (Prayitnoa and Latchford, 1999; Sokolow, 2009), sin embargo, aún no se sabe cuáles son los factores de virulencia encargados de dicha respuesta. En los ecosistemas de arrecifes coralinos las fluctuaciones

de salinidad están dadas por entradas de agua dulce que llevan a descensos en la salinidad. En contraparte, se ha observado mayor salinidad debido al aumento en la evaporación, a causa del incremento en la temperatura (Smith et al., 2010). También se sabe que cambios en la salinidad pueden llevar al blanqueamiento y que a su vez esto puede desencadenar en la aparición de otras enfermedades (Meehan and Ostrander, 1997). Finalmente la expresión de proteasas y lipasas se vio afectada de igual manera con incrementos y con disminuciones en el pH. Se sabe que la superficie oceánica tiene un pH que oscila entre 7,9 a 8,3, el cual es más básico que la capa mucosa superficial del coral que es de 5,8. Sin embargo muchos microorganismos pueden ser susceptibles a ligeros cambios de pH aumentando su virulencia y desencadenando diferentes patologías.

Los resultados obtenidos y los reportes anteriores muestran como cambios en la salinidad, la temperatura y el pH pueden determinar la expresión de ciertos factores de virulencia y a su vez influenciar directamente la fisiología del coral. Como consecuencia, el coral se vuelve más vulnerable a la virulencia microbiana, lo que podría culminar en el blanqueamiento coralino, el cual en muchas ocasiones, como ha sido reportado (Bruno et al., 2007; Rosenberg et al., 2009), puede llevar a la aparición de diversas enfermedades.

### **7.3. Comunicación en la comunidad bacteriana**

A pesar de la evidencia sobre la implicación fisiológica e inmunológica del desequilibrio de las comunidades bacterianas durante la enfermedad, el estudio de QS que es el fenómeno principal involucrada en las mismas, ha sido muy poco explorado desde su impacto ecológico en ambientes marinos. Como se mencionó anteriormente, la evidencia demuestra cómo a partir de moléculas señalizadoras muchas especies bacterianas regulan sus poblaciones y de esta manera modelan la estructura de la comunidad bacteriana. La composición de esta a su vez puede llegar a determinar estados de salud o enfermedad en el hospedero. El mecanismo por el cual se puede regular la homeóstasis de un sistema es mediante la sincronización de la expresión de ciertos fenotipos a través del QS. La expresión de dichos fenotipos depende además de la distribución de las células y de las propiedades de difusión de las moléculas señalizadoras. Se podría decir en términos generales que estilos de vida planctónicos no adoptan fácilmente una vida social activa debido a que las moléculas señalizadoras se difunden sin acumularse entre las células a

causa de la baja densidad bacteriana que hay en la columna de agua. Mientras que grupos bacterianos que llevan a cabo relaciones simbióticas con animales y plantas e incluso aquellos capaces de formar biopelículas en superficies abióticas logran establecer microambientes que facilitan la difusión de moléculas dentro de una matriz, en la que alcanzan densidades bacterianas superiores y por lo tanto se crean espacios libres para la comunicación.

Se sabe que las AHLs, a pesar de no ser las únicas moléculas utilizadas para la comunicación celular bacteriana, son las más abundantes y estudiadas. Estas son producidas por bacterias pertenecientes al phylum Proteobacteria tanto en ambientes terrestres como en acuáticos, en estos últimos se sabe que hay gran diversidad de bacterias asociadas con animales y plantas capaces de producir AHLs. Sin embargo, la mayoría de reportes de QS en bacterias marinas están limitados al género *Vibrio*, y se enfocan en la explicación de la regulación de diversos factores de virulencia ó en el caso de la bioluminiscencia de algunas especies como *V. fischeri* como se mencionó anteriormente. Sin embargo, debido a la vasta diversidad de bacterias marinas existentes y teniendo en cuenta que aún falta mucha por descubrir, se cree que hay un gran potencial de circuitos de comunicación aún desconocidos, que pueden representar un reservorio de pistas para entender nuevos mecanismos de relaciones ecológicas en los que participa el QS.

En este estudio se inició la búsqueda de componentes de circuitos de QS, específicamente de la sintetasa de AHLs con el fin de comparar la posible presencia diferencial de AHLs en la comunidad sana y la enferma. Esta búsqueda se realizó de la manera clásica usando cepas biosensoras capaces de detectar AHLs como se explicó en la metodología 5.4.2. Los resultados mostraron que 42 de 52 aislamientos no producían las AHLs detectadas por los 8 biosensores usados. Solo en 10 cepas fue posible detectar la presencia de sintetasa dada la producción de moléculas de señalización. De esta manera fue posible establecer diferencias entre la comunidad sana y la enferma en términos del tipo de moléculas que probablemente estaban siendo detectadas y la frecuencia de estas en cada comunidad. Como se explicó anteriormente las cepas biosensoras detectaron AHLs en un mayor número de aislamientos de las muestras de corales enfermos. Esto permite concluir que la presencia de AHLs es diferente entre las comunidades. Desde el punto de vista de comunidades enfermas vs sanas, es importante resaltar que entre las cepas pertenecientes a la comunidad proveniente del coral enfermo fue posible detectar cualquiera de las AHLs que activan los genes reporteros de los biosensores utilizados, es decir, de la C4-AHL a la

C16-AHL con sustituciones oxo e hidroxilo o sin ellas. Por otro lado entre los aislamientos que conforman la comunidad proveniente del coral sano, no se detectaron AHLs por los biosensores *E. coli* pQREXENR2 y *A. tumefaciens* Rm11558. Esto indica que probablemente en las muestras de corales sanos no hay 3-oxo-C10, 3-oxo-C12, 3-oxo-C14, 3-oxo-C16, C14 y C16 AHLs, las cuales podrían estar involucradas en algún proceso durante la infección como por ejemplo activar la expresión de ciertos factores de virulencia que promuevan la degradación del tejido.

En este trabajo se realizó además de lo planteado en los objetivos, una aproximación con técnicas moleculares para la búsqueda de circuitos de QS en organismos cultivables, que podría tener potencial para ser aplicada en muestras ambientales sin la necesidad de aislar cepas en el laboratorio. Para esto se realizó una búsqueda exhaustiva de secuencias de genes tipo *luxI* mediante la cual se alinearon más de 200 secuencias depositadas en el GenBank que codifican para sintetisas de AHLs tanto en Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria y Gammaproteobacteria depositadas en el GenBank. Inicialmente se pretendía diseñar *primers* capaces de amplificar los genes tipo *luxI* de la manera más global posible, es decir buscar el menor número de parejas de *primers* que fueran capaces de amplificar la mayor cantidad de secuencias reportadas. Sin embargo, los alineamientos mostraron que las secuencias no compartían fragmentos conservados de una longitud suficiente para el diseño de *primers* que lograsen amplificar un grupo de secuencias. Es por esto que se diseñaron *primers* específicos para cada uno de los aislamientos obtenidos en este estudio, basados en secuencias de *luxI* de las especies más relacionadas. A través de esta metodología fue posible amplificar múltiples bandas para muchos de los aislamientos probados, al secuenciarlas mostraron correspondencia con proteínas hipotéticas que aún no han sido caracterizadas y podrían estar involucradas en circuitos de comunicación bacteriana aún desconocidos. Se encontraron además secuencias que compartían similitud con reguladores de unión a DNA e histidin quinasa. Este puede ser un ejemplo de circuitos que se encuentran agrupados en operones en donde el gen encargado de la síntesis de la molécula de señalización está seguido del gen receptor de dicha molécula como sucede en la mayoría de bacterias que se comunican con AHLs (Khrul'nova et al., 2011). Además se ha reportado en circuitos de Quorum Sensing de bacterias Gram negativas la presencia de sistemas de dos componentes involucrados en la detección de moléculas de señalización, como el caso de *Vibrio harveyi*, *Vibrio cholerae* y *Pseudomonas aureofaciens* (Chancey et al., 1999; Freeman and Bassler, 1999; Wong et al., 1998). Es importante mencionar que la secuencia de una de las bandas corresponde a una fracción

que compone el operon LuxLMN de *Vibrio parahaemoliticus*. Esta secuencia fue amplificada del aislamiento 20SE, identificado como *Vibrio natriegens*, especie para la cual aún no existen reportes de circuitos de QS y este sería el primer reporte de la existencia de un gen tipo *luxI* en esta especie. La cepa 20SE además fue productora de AHLs de cadena larga detectadas por diferentes biosensores. Así mismo algunas cepas en las cuales se detectó la producción de AHLs, presentaron bandas a su vez bandas o barridos que demostraban la presencia de secuencias de reconocimiento correspondientes a regiones conservadas de genes tipo *luxI*. Por otro lado cepas como la 5SE (*Vibrio rotiferianus*) en las cuales se presentó algún tipo de amplificado pero no indujeron la expresión de genes reporteros en los biosensores, podría estar indicando por ejemplo, la producción de moléculas de señalización aún desconocidas.

Con estos resultados se resalta la importancia del desarrollo de nuevas metodologías basadas en la búsqueda de genes asociadas a circuitos de QS, ya que las existentes se fundamentan en la detección de los ya conocidos y no en la búsqueda de nuevos circuitos. Además esta metodología podría ser desarrollada para la búsqueda de genes involucrados en circuitos de QS en organismos que no logran ser cultivados en condiciones de laboratorio.

## **7.4 Dinámica de la comunidad bacteriana durante la enfermedad de la Plaga Blanca**

El principal objetivo de este trabajo fue buscar relaciones entre la estructura de comunidades bacterianas, posibles circuitos de comunicación y el potencial de virulencia de organismos pertenecientes a comunidades sanas y con la enfermedad de la Plaga Blanca. Los resultados obtenidos durante este trabajo y reportes previos muestran cómo la microbiota de corales cambia su estructura en respuesta a diferentes escenarios de estrés. Esto sugiere que el desbalance de estas comunidades microbianas es un fiel indicador del estado de salud de coral. Lo anterior se podría enmarcar en uno de los problemas básicos en la ecología, que es entender la distribución y abundancia de las especies. Para esto se plantea que los factores que ejercen efectos sobre la distribución de una especie también lo hacen sobre su abundancia. De acuerdo con esta premisa se podría concluir que si

ambas comunidades bacterianas no tienen los mismos patrones de presencia y abundancia de las especies que la componen, entonces factores que controlan la estructura de dicha comunidad son diferentes. También se encontró en este trabajo que la enfermedad no tenía una microbiota común de “enfermedad” a niveles taxonómicos inferiores como orden, familia, género y especie, pero si a niveles superiores como phylum y clase. Esto puede estar indicando que entre diferentes especies bacterianas existe redundancia funcional que puede ser solapada por miembros de la misma clase o del mismo phylum y por lo tanto aún es necesario hacer evaluaciones a nivel de gremios o grupos funcionales en la comunidad para llegar a una mejor aproximación sobre de la patogénesis de la enfermedad. Así mismo sería importante hacer un análisis funcional detallado de los miembros de la clase Alphaproteobacteria ya que según reportes y hallazgos de este trabajo, este grupo de bacterias parece estar llevando a cabo funciones importantes durante diferentes patologías coralinas.

Como consecuencia de los cambios de la estructura de la microbiota, se encontró que los patrones de presencia de moléculas de señalización entre comunidades de corales sanos y enfermos, era diferente. Esto influye directamente en la expresión de los genes involucrados en circuitos de QS y de los que están regulados por este fenómeno, de tal forma que, la presencia diferencial de una sola molécula de señalización podría tener repercusiones en la salud del coral. Una de las principales consecuencias de lo anterior podría ser, por ejemplo, la expresión de factores de virulencia en la comunidad bacteriana presente en corales mediada por AHLs detectadas en dicha comunidad y ausentes en la comunidad bacteriana de corales sanos. Otra posibilidad que puede plantearse es la ausencia de una AHLs, que si está presente en la comunidad sana, esté involucrada con la regulación o atenuación de ciertos factores de virulencia.

Sin embargo es fundamental mencionar un resultado obtenido y que ha sido también objeto de estudio para otras enfermedades: la temperatura, el pH y la salinidad tuvieron gran influencia en la expresión de factores de virulencia como proteasas, lipasas y hemolisinas. Esto indica que además del QS existen otros factores, en este caso ambientales, que podrían estar promoviendo la virulencia bacteriana en corales enfermos.

Una nueva tendencia plantea el papel de los microorganismos en la salud como un balance de entre benéficos vs patógenos. Sin embargo, este estudio va más allá de esto y permitió generar evidencia para reconsiderar la idea de “patogenicidad” como una característica

propia de ciertas especies y enriquecer una visión en la cual una comunidad está compuesta por grupos de poblaciones de individuos que tienen el potencial de establecer relaciones antagonistas (algunas de ellas perjudiciales) bajo determinadas condiciones, las cuales contribuyen con el desarrollo de una patología. De esta manera se busca darle importancia al papel que tienen los microorganismos comensales para iniciar una infección, dadas algunas condiciones específicas. Esto también contribuye a responder la pregunta: ¿por qué se desencadena la misma infección en corales enfermos si no tienen una microbiota común? Sin embargo, esta pregunta requiere más investigaciones específicas sobre el tema.

Los resultados obtenidos corroboran la hipótesis propuesta inicialmente en la cual se relaciona la estructura de la microbiota, la virulencia y la comunicación bacteriana durante la enfermedad de la Plaga Blanca. En la figura 22 se propone un modelo que representa la relación de los tres factores durante la enfermedad. El desbalance en la estructura de la comunidad bacteriana enferma como consecuencia de factores que aún se desconocen, causa diferencias en la presencia y abundancia de moléculas de señalización en dicha comunidad. Como resultado de esto, la molécula de señalización dominante en una comunidad será diferente y podría estar contribuyendo con la expresión sincronizada de la virulencia en especies dominantes y así contribuyendo con la degradación del tejido coralino. Los factores ambientales que contribuyen con la desestabilización en la estructura de la comunidad bacteriana, podrían a su vez estar potenciando la expresión de factores de virulencia diferencialmente expresados en las comunidades.

Aún queda mucho por explorar en el campo de las enfermedades coralinas, ¿serán condiciones ambientales las desencadenantes de la enfermedad? ¿El cambio en la estructura de la microbiota es una causa o una consecuencia de la enfermedad? ¿Cuáles son los mecanismos de patogenicidad que están promoviendo la degradación del tejido coralino? Sin embargo, todo apunta a que este problema debe ser tratado desde una visión holística que involucre más que la búsqueda de un agente causal.



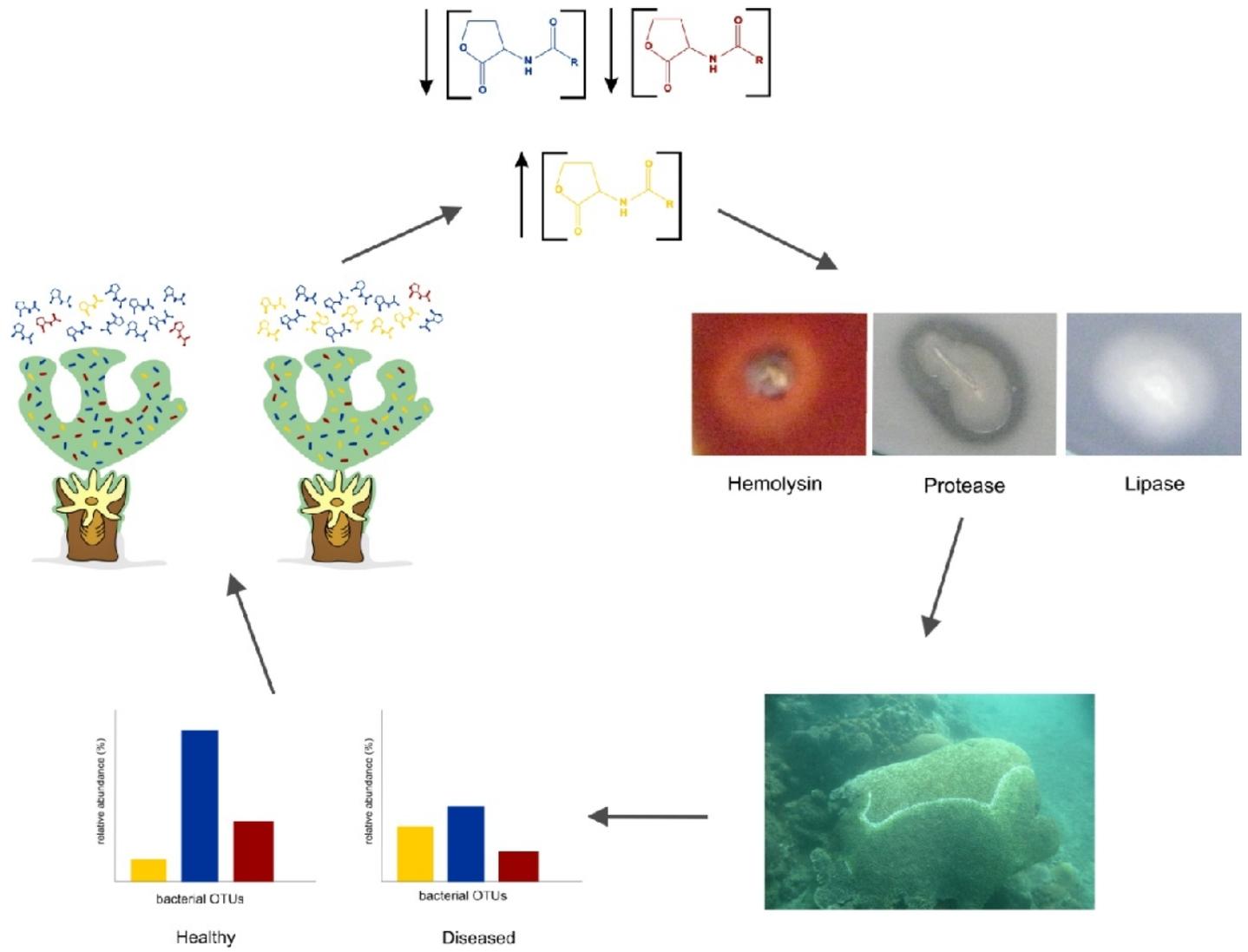


Figura 22. Dinámica de la enfermedad de Plaga Blanca con respecto a la estructura, la virulencia y la comunicación de las comunidades bacteriana sanas y enfermas.

## 8 CONCLUSIONES

En este trabajo fue posible relacionar aspectos claves de la biología de una comunidad bacteriana como su estructura, su potencial de virulencia y sus posibles mecanismos de comunicación.

A través del estudio de la estructura de las comunidades fue posible observar que la enfermedad de la Plaga Blanca tipo 2 está acompañada por cambios en la estructura taxonómica de la comunidad bacteriana, caracterizados por un aumento en la abundancia de la clase Alphaproteobacteria y una disminución en las clases Betaproteobacteria y Gammaproteobacteria. Sin embargo, aún no es claro si esta desestabilización en las comunidades es la causa o es una consecuencia de la enfermedad.

Se observó que los ordenes Oceanospirillales, Alteromonadales y Rhodobacterales aumentaban sus abundancias relativas durante el evento de enfermedad, dado que para estos grupos se han descrito previamente mecanismos de virulencia involucrados en diferentes enfermedades en invertebrados marinos, se sugiere que el aumento en su abundancia puede tener un impacto importante en el desarrollo de la enfermedad.

No se detectó la presencia de *Aurantimonas coralicida* ni *Thalassomonas loyana*, reafirmando así que no es necesaria la presencia de un agente causal capaz de desencadenar la enfermedad sino que cambios en las condiciones ambientales pueden llevar a la expresión de la virulencia de bacterias normalmente asociadas a los corales.

Teniendo en cuenta la presencia de tres tipos de factores de virulencia, proteasas, lipasas y hemolisinas, es posible concluir que los aislamientos procedentes de corales enfermos y sanos tienen el mismo potencial de virulencia. Es decir, ambas comunidades tienen la misma posibilidad de desencadenar una patología en el caso de estar mediada por estos factores de virulencia, siempre y cuando se den las condiciones necesarias para la expresión de los mismos.

Se comprobó que la expresión de estos factores de virulencia es dependiente de la temperatura, la salinidad y el pH. Esto puede ser llevado a un escenario real en donde las variaciones ambientales dadas por el cambio climático global pueden tener un papel importante en la regulación de la expresión de la virulencia.

Finalmente se comprobó que las bacterias pertenecientes a la comunidad cultivable proveniente de corales sanos y las provenientes de corales enfermos se comunican con diferentes moléculas de señalización. Esto indica que hay genes que pueden estar expresándose de manera diferencial en los dos estados y que podrían estar involucrados en los procesos de patogénesis.

## 9. RECOMENDACIONES

- Se sugiere realizar estudios más detallados en los órdenes Alteromonadales y Rhodobacterales ya que incrementan sus abundancias en diferentes enfermedades y su dinámica bajo diferentes condiciones de estrés podría ser una pieza clave en el entendimiento de la enfermedad.
- Las enfermedades coralinas aún no cuentan con estudios dirigidos a la detección de perfiles metabólicos diferenciales en corales sanos y enfermos. Por lo tanto se sugiere realizar estudios de metatranscriptómica o metaproteómica en condiciones de salud y enfermedad.
- Aún es necesario un análisis que revele la regulación de la expresión de diferentes moléculas como por ejemplo factores de virulencia para entender posibles mecanismos de patogenicidad.
- En este trabajo se propuso por primera vez una metodología para la detección genética de componentes involucrados en QS. Esta metodología debe ser mejorada para posteriores estudios de QS en bacterias no cultivables.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alagely A, Krediet CJ, Ritchie KB, Teplitski M (2011) Signaling-mediated cross-talk modulates swarming and biofilm formation in a coral pathogen *Serratia marcescens*. ISME J. 5: 1609-1620.

Antonius A (1981) Coral reef pathology: A review. Proc 4th Internat Coral Reef Symp 2: 3-6.

Arrieta MC, Finlay BB (2012) The commensal microbiota drives immune homeostasis. Front Immunol 3: 33.

Banaszak AT (2007) Optimization of DNA extraction from a scleractinian coral for the detection of thymine dimers by immunoassay. Photochem Photobiol 83: 833-838.

Barash Y, Sulam R, Y. L, Rosemberg E (2005) Bacterial Strain BA-3 and a filterable factor cause a white plague-like disease in corals from the Eilat coral reef. Aquat Microb Ecol 40: 183–189.

Barneah O, Ben-Dov E, Kramarsky-Winter E, Kushmaro A (2007) Characterization of black band disease in Red Sea stony corals. Environ Microbiol 9: 1995-2006.

Bassler B (1999) How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. Curr Opin Microbiol 6: 582-587.

Ben-Haim Y, Thompson FL, Thompson CC, Cnockaert MC, Hoste B, et al. (2003) *Vibrio coralliilyticus* sp. nov., a temperature-dependent pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. Int J Syst Evol Microbiol 53: 309-315.

Berkelmans R, van Oppen MJ (2006) The role of zooxanthellae in the thermal tolerance of corals: a 'nugget of hope' for coral reefs in an era of climate change. Proc Biol Sci 273: 2305-2312.

Bessat F, Buiges D (2001) Two centuries of variation in coral growth in a massive Porites colony from *Moorea* (French Polynesia): a response of ocean-atmosphere variability from south central Pacific. Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology 175: 381–392.

Boettcher K, Barber B, Singer J (2000) Additional evidence that juvenile oyster disease is caused by a member of the *Roseobacter* group and colonization of nonaffected animals by *Stappia stellulata*-like strains. Appl Environ Microbiol 66:3924-30.

Bourne D, Lida Y, Uthicke S, Smith-Keune C (2008) Changes in coral-associated microbial communities during a bleaching event. ISME J. 2: 350-363.

Bourne DG, Garren M, Work TM, Rosenberg E, Smith GW, et al. (2009) Microbial disease and the coral holobiont. *Trends Microbiol* 17: 554-562.

Bruno JF, Selig ER, Casey KS, Page CA, Willis BL, et al. (2007) Thermal stress and coral cover as drivers of coral disease outbreaks. *PLoS Biol* 5: e124.

Buddemeier RW, Kleypas JA, Aronson RB (2004) Coral Reefs and Global Climate Change. Potential Contributions of Climate Change to Stresses on Coral Reef Ecosystems, Pew Center for Global Climate Change, Arlington, VA. 42 p.

Case RJ, Labbate M, Kjelleberg S (2008) AHL-driven quorum-sensing circuits: their frequency and function among the Proteobacteria. *ISME J.* 2: 345-349.

Castro P, Huber M (2003) chapter 4: Coral Reefs Marine Biology 4th. Edition, McGraw Hill: 297 -300.

Cervino JM, Hayes RL, Polson SW, Polson SC, Goreau TJ, et al. (2004) Relationship of *Vibrio* species infection and elevated temperatures to yellow blotch/band disease in Caribbean corals. *Appl Environ Microbiol* 70: 6855-6864.

Chancey ST, Wood DW, Pierson LS, 3rd (1999) Two-component transcriptional regulation of N-acyl-homoserine lactone production in *Pseudomonas aureofaciens*. *Applied and environmental microbiology* 65: 2294-2299.

Coles S (1994) Extensive coral disease outbreak at Fahl Island, Gulf of Oman, Indian Ocean. *Coral Reefs* 13: 242.

Constanza R, dArge R, deGroot R, Farber S, Grasso M, et al. (1997) The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature* 387: 253-260.

Davis BM, Jensen R, Williams P, O'Shea P (2010) The interaction of N-acylhomoserine lactone quorum sensing signaling molecules with biological membranes: implications for inter-kingdom signaling. *PloS one* 5: e13522.

Denner EB, Smith GW, Busse HJ, Schumann P, Narzt T, et al. (2003) *Aurantimonas corallicida* gen. nov., sp. nov., the causative agent of white plague type II on Caribbean scleractinian corals. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 1115-1122.

DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, et al. (2006) Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and environmental microbiology* 72: 5069-5072.

DiMango E, Zar HJ, Bryan R, Prince A (1995) Diverse *Pseudomonas aeruginosa* gene products stimulate respiratory epithelial cells to produce interleukin-8. *J Clin Invest* 96: 2204-2210.

Douglas A (2003) Coral bleaching--how and why? *Mar Pollut Bull* 2003 Apr;46(4): 385-392.

Ducklow H, Mitchell R (1979) Bacterial populations and its adaptations in the mucus layer on living corals. *Limnol Oceanogr* 24: 715–725.

Dustan P (1977) Vitality of reef coral population off Key Largo, Florida: recruitment and mortality. *Environ Geol* 2: 51-58.

Dustan P, Halas J (1987) Changes in the reef-coral community of Carysfort Reef, Key Largo, Florida. *Coral Reefs* 6 (2): 91-106.

Efrony R, Atad I, Rosenberg E (2009) Phage therapy of coral white plague disease: properties of phage BA3. *Curr Microbiol* 58: 139-145.

Euzeby JP (1997) List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *Int J Syst Bacteriol* 47: 590-592.

Farrand SK, Qin Y, Oger P (2002) Quorum-sensing system of *Agrobacterium* plasmids: analysis and utility. *Methods Enzymol* 358: 452-484.

Freeman JA, Bassler BL (1999) A genetic analysis of the function of LuxO, a two-component response regulator involved in quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Mol Microbiol* 31: 665-677.

Garzón-Ferreira J, Gil-Agudelo DL, Barrios LM, Zea S (2001) Stony coral diseases observed in southwestern Caribbean reefs. *Bull Mar Sci* 460: 65-69.

Geiser D, Taylor J, Ritchie K, Smith G (1998) Cause of sea fan death in the West Indies. *Nature* 394: 137 - 138.

Gil-Agudelo D, Navas-Camacho R, Rodriguez-Ramirez A (2009) Coral diseases and their research in colombian reefs. *Boletín Invemar*, jul/dez vol.38, no.2: 189-224.

Gomez-Gil B, Thompson FL, Thompson CC, Swings J (2003) *Vibrio rotiferianus* sp. nov., isolated from cultures of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 239-243.

Gray KM, Garey JR (2001) The evolution of bacterial LuxI and LuxR quorum sensing regulators. *Microbiology* 147: 2379-2387.

Guthrie JN, Moriarty DJ, Blackall LL (2000) DNA extraction from coral reef sediment bacteria for the polymerase chain reaction. *J Microbiol Methods* 43: 73-80.

Haas W, Shepard BD, Gilmore MS (2002) Two-component regulator of *Enterococcus faecalis* cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction. *Nature* 415: 84-87.

Heracle BioSoft S (2011) DNA Baser Sequence Assembler, v3.x <http://www.DnaBaser.com>.

Herlemann DP, Labrenz M, Jurgens K, Bertilsson S, Waniek JJ, et al. (2011) Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *ISME J.* 5: 1571-1579.

Hold GL, Smith EA, Birkbeck TH, Gallacher S (2001) Comparison of paralytic shellfish toxin (PST) production by the dinoflagellates *Alexandrium lusitanicum* NEPCC 253 and *Alexandrium tamarense* NEPCC 407 in the presence and absence of bacteria. FEMS microbiology ecology 36: 223-234.

Hold GL, Smith EA, Rappe MS, Maas EW, Moore ERB, et al. (2001) Characterisation of bacterial communities associated with toxic and non-toxic dinoflagellates: *Alexandrium* spp. and *Scrippsiella trochoidea*. FEMS Microbiol Ecol 37:161–173.

Houghton JT, Ding Y, Griggs DJ, Noguer M, Van der Linden PJ, et al. (2001) IPCC Third Assessment Report: Climate Change 2001: The Scientific Basis. . Cambridge University Press, Cambridge, UK, 944 p.

Hughes D, Sperandio V (2008) Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. Nat Rev Microbiol Feb; 6(2): 111-120.

ITIS. (2011) Base de datos ITIS (*Integrated Taxonomic Information System on-line database*). Obtenido [25 de noviembre de 2011], disponible en <http://www.itis.gov>.

Joint I, Tait K, Wheeler G (2007) Cross-kingdom signalling: exploitation of bacterial quorum sensing molecules by the green seaweed *Ulva*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 362: 1223-1233.

Kambam PK, Sayut DJ, Niu Y, Eriksen DT, Sun L (2008) Directed evolution of LuxI for enhanced OHHL production. Biotechnol Bioeng 101: 263-272.

Khrul'nova SA, Manukhov IV, Zavil'gel'skii GB (2011) ["Quorum sensing" regulation of lux gene expression and the structure of lux operon in marine bacteria *Alivibrio logei*]. Genetika 47: 1596-1603.

Kimes NE, Grim CJ, Johnson WR, Hasan NA, Tall BD, et al. (2011) Temperature regulation of virulence factors in the pathogen *Vibrio coralliilyticus*. ISME J. 6: 835-846.

Knowlton N, Rohwer F (2003) Multispecies microbial mutualisms on coral reefs: the host as a habitat. Am Nat 162: 51-62.

Koren O, Rosenberg E (2008) Bacteria associated with the bleached and cave coral *Oculina patagonica*. Microb Ecol 55: 523-529.

Kuehl K, Jones R, Gibbs D, Richardson L (2011) The roles of temperature and light in black band disease (BBD) progression on corals of the genus *Diploria* in Bermuda. J Invertebr Pathol 106: 366-370.

Kvennefors E, Sampayo E, Ridgway T, Barnes A, O. H-G (2010) Bacterial communities of two ubiquitous Great Barrier Reef corals reveals both site- and species-specificity of common bacterial associates. PloSone 5: art no e10401.

Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), Nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Wiley and Sons, Chichester, England: 115 – 175.

Lesser M, Bythell J, Gates R, Johnstone R, Guldberg O (2007) Are infectious diseases really killing corals? Alternative interpretations of the experimental and ecological data. J Exp Mar Bio Ecol 346: 36–44.

Li Z, He L, Miao X (2007) Cultivable bacterial community from South China Sea sponge as revealed by DGGE fingerprinting and 16S rDNA phylogenetic analysis. Current microbiology 55: 465-472.

Littman RA, Bourne DG, Willis BL (2010) Responses of coral-associated bacterial communities to heat stress differ with *Symbiodinium* type on the same coral host. Mol Ecol 19: 1978-1990.

Llamas I, Keshavan N, Gonzalez JE (2004) Use of *Sinorhizobium meliloti* as an indicator for specific detection of long-chain N-acyl homoserine lactones. Applied and environmental microbiology 70: 3715-3723.

Lough JM, Barnes DJ (2000) Environmental controls on growth of the massive coral *Porites*. J Exp Mar Bio Ecol 245: 225-243.

Mao-Jones J, Ritchie K, Jones L, Ellner S (2010) How microbial community composition regulates coral disease development. PLoS Biol 2010 Mar 30;8(3): e1000345.

Mathesius U, Mulders S, Gao M, Teplitski M, Caetano-Anolles G, et al. (2003) Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 1444-1449.

McClellan KH, Winson MK, Fish L, Taylor A, Chhabra SR, et al. (1997) Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. Microbiology 143 ( Pt 12): 3703-3711.

McLean RJ, Barnes MB, Windham MK, Merchant M, Forstner MR, et al. (2005) Cell-cell influences on bacterial community development in aquatic biofilms. Appl Environ Microbiol 71: 8987-8990.

Meehan WJ, Ostrander GK (1997) Coral bleaching: a potential biomarker of environmental stress. J Toxicol Environ Health 50: 529-552.

Moore F, Best B. (2009) Coral Reef Crisis: Causes and Consequences. Global Trade and Consumer Choices: Coral Reefs in Crisis. AAAS, New York: 5-9

Mulhall M (2009) Saving the rainforests of the sea: an analysis of international efforts to conserve coral reefs. Duke environmental law & policy forum 19:321.

Nelson C, Alldredge A, McCliment E, Amaral-Zettler L, Carlson C (2011) Depleted dissolved organic carbon and distinct bacterial communities in the water column of rapid-flushing coral reef ecosystem. *ISME J.* 5: 1374 - 1387.

Neves E, Silveira F, Johnsson R (2010) Cnidaria, Scleractinia, Siderastreidae, *Siderastrea siderea* (Ellis and Solander, 1786): Hartt Expedition and the first record of a Caribbean siderastroid in tropical southwestern Atlantic. *Journal of species lists and distribution* 6: 505 - 510

Ng WL, Bassler BL (2009) Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annu Rev Genet* 43: 197-222.

Nie B, Chen T, Liang M, Wang Y, Zhong J, et al. (1997) Relationship between coral growth rate and sea surface temperature in the northern part of the South China Sea during the past 100 years. *Science in China (series D)* 40: 173–182.

Novick RP (2003) Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol* 48: 1429-1449.

Nugues M, Smith G, Van-Hooidonk R, Seabra M, BAK R (2004) Algal contact as a trigger for coral disease. *Ecol Lett* 7: 919-923.

Olson JB, Kellogg CA (2010) Microbial ecology of corals, sponges, and algae in mesophotic coral environments. *FEMS Microbiol Ecol* 73: 17-30.

Pantos O, Bythell JC (2006) Bacterial community structure associated with white band disease in the elkhorn coral *Acropora palmata* determined using culture-independent 16S rRNA techniques. *Diseases of aquatic organisms* 69: 79-88.

Pantos O, Cooney RP, Le Tissier MD, Barer MR, O'Donnell AG, et al. (2003) The bacterial ecology of a plague-like disease affecting the Caribbean coral *Montastrea annularis*. *Environ Microbiol* 5: 370-382.

Patil PB, Zeng Y, Coursey T, Houston P, Miller I, et al. (2010) Isolation and characterization of a *Nocardiosis* sp. from honeybee guts. *FEMS Microbiol Lett* 312: 110-118.

Patterson KL, Porter JW, Ritchie KB, Polson SW, Mueller E, et al. (2002) The etiology of white pox, a lethal disease of the Caribbean elkhorn coral, *Acropora palmata*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 8725-8730.

Pidiyar VJ, Jangid K, Patole MS, Shouche YS (2004) Studies on cultured and uncultured microbiota of wild *Culex quinquefasciatus* mosquito midgut based on 16s ribosomal RNA gene analysis. *Am J Trop Med Hyg* 70: 597-603.

Polson W, Higgins J, Woodley C (2008) PCR-based Assay for Detection of Four Coral Pathogens. *Proceedings of the 11th International Coral Reef Symposium Ft. Lauderdale, Florida, 7-11 July 2008, Session number 8.*

Prayitnoa SB, Latchford JW (1999) Experimental infections of crustaceans with luminous bacteria related to *Photobacterium* and *Vibrio*. Effect of salinity and pH on infectiosity. *Aquaculture* 132: 105-112.

R Development Core Team (2008) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing Vienna, Austria

Rao D, Webb JS, Holmstrom C, Case R, Low A, et al. (2007) Low densities of epiphytic bacteria from the marine alga *Ulva australis* inhibit settlement of fouling organisms. *Appl Environ Microbiol* 73: 7844-7852.

Reshef L, Koren O, Loya Y, Zilber-Rosenberg I, Rosenberg E (2006) The coral probiotic hypothesis. *Environ Microbiol* 8: 2068-2073.

Reyes J, Santodomingo N, Flórez P (2010) Corales Escleractinios de Colombia. Invemar, Serie de Publicaciones Especiales No. 14. Santa Marta, 246 p.

Richardson LL, Goldberg WM, Kuta KG, Aronson RB, Smith GW, et al. (1998) Florida's mystery coral-killer identified. *Nature* 392 scientific correspondence: 557 - 558.

Riedel K, Hentzer M, Geisenberger O, Huber B, Steidle A, et al. (2001) N-acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. *Microbiology* 147: 3249-3262.

Riegl B (2002) Effects of the 1996 and 1998 positive sea-surface temperature anomalies on corals, coral diseases and sh in the Arabian Gulf (Dubai, UAE). *Mar Biol* 140: 29-40.

Ritchie K (2006) Regulation of microbial populations by coral surface mucus and mucus-associated bacteria. *Mar Ecol Prog Ser* 322: 1–14

Ritchie KB, Smith GW (2004) Microbial communities of coral surface mucopolysaccharide layers. . In *Coral Health and Disease* Roseberg, E, and Loya, Y (eds) Berlin, Germany: Springer-Verlag: 143–156.

Roche (2009) Genome Sequencer FLX System, Amplicon Fusion Primer Design Guidelines for GS FLX Titanium Series Lib-A Chemistry. . 454 Technical Bulletin TCB No. 013-2009.

Rosenberg E, Ben-Haim Y (2002) Microbial diseases of corals and global warming. *Environmental microbiology* 4: 318-326.

Rosenberg E, Falkovitz L (2004) The *Vibrio shiloi*/Oculina patagonica model system of coral bleaching. *Annu Rev of Microbiol* 58: 143-159.

Rosenberg E, Kellogg. C, Rohwer F ( 2007) Coral microbiology. *Oceanography*: 114- 122.

Rosenberg E, Kushmaro A, Kramarsky-Winter E, Banin E, Yossi L (2009) The role of microorganisms in coral bleaching. *ISME J.* 3: 139-146.

Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132: 365-386.

Ruby E, Lee K (1998) The *Vibrio fischeri-Euprymna scolopes* Light Organ Association: Current Ecological Paradigms. *Appl Environ Microbiol* 64: 805-812.

Salazar S (2007) Distribución, abundancia, estructura de tallas y estado de salud de *Siderastrea siderea* (Ellis y Solander 1786) (Scleractinia: Siderastreidea) en el área marina protegida (AMP) "Parque Nacional Natural Corales del Rosario y San Bernardo" (PNNCRSB). Tesis de Doctorado Universidad Jorge Tadeo Lozano, Facultad de Ciencias Naturales, Departamento de Biología Marina.

Santavy D, Peters E (1997) Microbial pests: coral disease in the western Atlantic. *Proc 8th Internat Coral Reef Symp* 1: 607-612.

Santiago-Vazquez LZ, Bruck TB, Bruck WM, Duque-Alarcon AP, McCarthy PJ, et al. (2007) The diversity of the bacterial communities associated with the azooxanthellate hexacoral *Cirrihipathes lutkeni*. *ISME J.* 1: 654-659.

Sato Y, Willis BL, Bourne DG (2010) Successional changes in bacterial communities during the development of black band disease on the reef coral, *Montipora hispida*. *ISME J* 4: 203-214.

Schloss PD, Handelsman J (2005) Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl Environ Microbiol* 71: 1501-1506.

Schultz D, Wolynes PG, Ben Jacob E, Onuchic JN (2009) Deciding fate in adverse times: sporulation and competence in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 21027-21034.

Sekar R, Mills DK, Remily ER, Voss JD, Richardson LL (2006) Microbial communities in the surface mucopolysaccharide layer and the black band microbial mat of black band-diseased *Siderastrea siderea*. *Appl Environ Microbiol* 72: 5963-5973.

Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB (2010) Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev* 90: 859-904.

Sharp KH, Ritchie KB, Schupp PJ, Ritson-Williams R, Paul VJ (2010) Bacterial acquisition in juveniles of several broadcast spawning coral species. *PLoS one* 5: e10898.

Shinoda S, Miyoshi S (2011) Proteases produced by vibrios. *Biocontrol Sci* 16: 1-11.

Shnit-Orland M, Kushmaro A (2009) Coral mucus-associated bacteria: a possible first line of defense. *FEMS Microbiol Ecol* 67: 371-380.

Sitnikov DM, Schineller JB, Baldwin TO (1995) Transcriptional regulation of bioluminescence genes from *Vibrio fischeri*. *Molecular microbiology* 17: 801-812.

Smith JE, Hunter CL, Smith CM (2010) The effects of top-down versus bottom-up control on benthic coral reef community structure. *Oecologia* 163: 497-507.

Sokolow S (2009) Effects of a changing climate on the dynamics of coral infectious disease: a review of the evidence. *Dis Aquat Organ* 87: 5-18.

Soong K (1993) Colony size as a species character in massive reef coral. *Coral reefs* 12: 77-83.

Spor A, Koren O, Ley R (2011) Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. *Nat Rev Microbiol* 9: 279-290.

Steindler L, Venturi V (2007) Detection of quorum-sensing N-acyl homoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors. *FEMS microbiology letters* 266: 1-9.

Suarez-Moreno ZR, Devescovi G, Myers M, Hallack L, Mendonca-Previato L, et al. (2010) Commonalities and differences in regulation of N-acyl homoserine lactone quorum sensing in the beneficial plant-associated *Burkholderia* species cluster. *Applied and environmental microbiology* 76: 4302-4317.

Sun J, Steindler L, Thrash JC, Halsey KH, Smith DP, et al. (2011) One carbon metabolism in SAR11 pelagic marine bacteria. *PloS one* 6: e23973.

Sunagawa S, DeSantis TZ, Piceno YM, Brodie EL, DeSalvo MK, et al. (2009) Bacterial diversity and White Plague Disease-associated community changes in the Caribbean coral *Montastraea faveolata*. *ISME J.* 3: 512-521.

Swanson K, Dowd S, Suchodolski J, Middelbos I, Vester B, et al. (2011) Phylogenetic and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice. *ISME J.* 5: 639-649.

Sweet M, Jones R, Bythell J (2011) Coral diseases in aquaria and in nature. *J Mar Biol Assoc, UK*: 1469-7769.

Tait K, Williamson H, Atkinson S, Williams P, Camara M, et al. (2009) Turnover of quorum sensing signal molecules modulates cross-kingdom signalling. *Environ Microbiol* 11: 1792-1802.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596-1599.

Thomas T, Evans FF, Schleheck D, Mai-Prochnow A, Burke C, et al. (2008) Analysis of the *Pseudoalteromonas tunicata* genome reveals properties of a surface-associated life style in the marine environment. *PloS one* 3: e3252.

Thompson FL, Barash Y, Sawabe T, Sharon G, Swings J, et al. (2006) *Thalassomonas loyana* sp. nov., a causative agent of the white plague-like disease of corals on the Eilat coral reef. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 365-368.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876-4882.

Thurber R, Willner-Hall D, Rodriguez-Mueller B, Desnues C, Edwards R, et al. (2009) Metagenomic analysis of stressed coral holobionts. *Environ Microbiol* 11(8): 2148–2163.

Tippmann HF (2004) Analysis for free: comparing programs for sequence analysis. *Briefings in bioinformatics* 5: 82-87.

Valle A, Bailey MJ, Whiteley AS, Manefield M (2004) N-acyl-L-homoserine lactones (AHLs) affect microbial community composition and function in activated sludge. *Environmental microbiology* 6: 424-433.

Vega-Sequeda J, Rodríguez-Ramírez A, Reyes-Nivia M, Navas-Camacho R (2008) Formaciones coralinas del área de Santa Marta: Estado y patrones de distribución espacial de la comunidad bentónica. *Bol Invest Mar Cost* 37: 87 - 105.

Voss JD, Mills DK, Myers JL, Remily ER, Richardson LL (2007) Black band disease microbial community variation on corals in three regions of the wider Caribbean. *Microb Ecol* 54: 730-739.

Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR (2007) Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and environmental microbiology* 73: 5261-5267.

Waters VJ, Gomez MI, Soong G, Amin S, Ernst RK, et al. (2007) Immunostimulatory properties of the emerging pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Infect Immun* 75: 1698-1703.

Webster NS, Soo R, Cobb R, Negri AP (2011) Elevated seawater temperature causes a microbial shift on crustose coralline algae with implications for the recruitment of coral larvae. *ISME J*. 5: 759-770.

Weil E, Smith G, Gil-Agudelo DL (2006) Status and progress in coral reef disease research. *Dis Aquat Organ* 69: 1-7.

Winson MK, Swift S, Fish L, Throup JP, Jorgensen F, et al. (1998) Construction and analysis of luxCDABE-based plasmid sensors for investigating N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing. *FEMS microbiology letters* 163: 185-192.

Wong SM, Carroll PA, Rahme LG, Ausubel FM, Calderwood SB (1998) Modulation of expression of the ToxR regulon in *Vibrio cholerae* by a member of the two-component family of response regulators. *Infection and immunity* 66: 5854-5861.

Wright ES, Yilmaz LS, Noguera DR. (2011) DECIPHER: A Search-Based Approach to Chimera Identification for 16S rRNA Sequences." *Applied and Environmental Microbiology* 78: 717 – 125