



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA  
ECOLOGÍA

**ANÁLISIS DE DIVERSIDAD DE COMUNIDADES BACTERIANAS DE BIOFILMS ASOCIADOS  
CON LA LITIFICACIÓN DE LOS RESTOS DE *ACROPORA PALMATA***

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**M. en C. YÉSSICA YISLEM BELTRÁN DÍAZ**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Luisa Isaura Falcón Álvarez**  
**Instituto de Ecología**

**COMITÉ TUTOR: Dra. Susana Aurora Magallón Puebla**  
**Instituto de Biología**

**Dr. Miroslav Macek**  
**Facultad de Estudios Superiores Iztacala**

**CIUDAD DE MÉXICO, mayo de 2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA  
ECOLOGÍA

**ANÁLISIS DE DIVERSIDAD DE COMUNIDADES BACTERIANAS DE BIOFILMS ASOCIADOS  
CON LA LITIFICACIÓN DE LOS RESTOS DE *ACROPORA PALMATA***

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**M. en C. YÉSSICA YISLEM BELTRÁN DÍAZ**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Luisa Isaura Falcón Álvarez**  
**Instituto de Ecología**

**COMITÉ TUTOR: Dra. Susana Aurora Magallón Puebla**  
**Instituto de Biología**

**Dr. Miroslav Macek**  
**Facultad de Estudios Superiores Iztacala**

**MÉXICO, D.F. mayo de 2017**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al posgrado en Ciencias Biológicas, de la UNAM, por permitirme nuevamente formar parte de su programa para llevar a cabo mi formación doctoral. Asimismo, agradezco al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP), por el financiamiento concedido para la realización de una estancia de investigación en el Lawrence Berkeley National Laboratory en California, EUA., y para participar en el 16th International Symposium on Microbial Ecology en Montreal, CAN. Así como por el apoyo económico correspondiente a la convocatoria “Mejoras a la tasa de graduación del Doctorado en Ciencias Biológicas”.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de doctorado.

Agradezco a los proyectos SEP-CONACyT No. 0151796 y PAPIIT No. 100212-3, por el financiamiento otorgado para la realización de esta tesis.

A los miembros del comité tutor, por su atenta participación en cada uno de las reuniones semestrales, en las que tuve la fortuna de contar con sus valiosos comentarios que me permitieron conducir y enriquecer este proyecto:

Dra. Luisa I. Falcón (Tutor principal)

Dra. Susana Magallón Puebla (Miembro del Comité Tutor)

Dr. Miroslav Macek (Miembro del Comité Tutor)

A los miembros de jurado cuyos valiosos comentarios permitieron el enriquecimiento de esta tesis:

Dra. Patricia Thomé  
Dra. Rocio Alcántara  
Dr. Javier Carmona  
Dr. Luis Servín

A la Dra. Luisa Falcón por impulsarme siempre en este camino, creyendo en mí incluso más que yo. Por mostrarme la pasión y la dedicación necesaria en este camino, por tu entusiasmo al compartir no solo tu experiencia profesional sino también de vida. Por la confianza y la amistad brindadas todos estos años. Por compartir conocimiento sin restricciones.

A la Dra. Paty Thomé, sin tu invaluable apoyo este proyecto no habría sido posible. Por la confianza brindada y recibirme no solo en tu laboratorio sino también en tu hogar, te estoy infinitamente agradecida. Gracias también por las charlas científicas y de vida.

Al personal de la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales (UASA) por todas las facilidades brindadas para la realización de este proyecto. En especial al Dr. Roberto Iglesias, gracias a sus ideas se logró producir este proyecto. A las Dras. Susana Enríquez y Anastazia Banaszak por permitirme trabajar en su laboratorio. A la Dra. Wiebke Kramer y al Dr. Román Vásquez.

A la Biól. Susana Guzmán Gómez por su apoyo y asesoría en el uso del microscopio estereoscópico.

Al MC Fernando Negrete por su invaluable apoyo técnico, especialmente en el campo. Gracias por las técnicas de apnea que me permitieron mejorar mis inmersiones.

A la MC Osiris Gaona por su apoyo técnico. Gracias por hacer que las cosas sucedan, por todo tu apoyo moral y por siempre estar ahí para escuchar.

Al personal administrativo de la UASA y del Instituto Ecología por la gestión que permitió realizar esta tesis.

A los miembros del laboratorio de Ecología Bacteriana, especialmente a Daniel Cerqueda por darte el tiempo de ayudarme y ser paciente.

A mis amigos de Puerto Morelos: Rebe, Lesli, Alejandra, Nancy, Paty C, Mariana, Parmenio y Wendo por ofrecerme siempre una mano amiga, por la convivencia, la aventura, la confianza, todo lo vivido y lo aprendido ¡GRACIAS!

A Xoe, gracias por siempre estar ahí para escuchar mis ocurrencias y también por permitirme ser confidente de lo que acontece en tu vida.

A las Dras. Paty Valdespino y Rocio Alcántara por todo su apoyo, por escuchar y ayudarme a afrontar las dificultades durante mi formación doctoral. Por la confianza de dejarme formar parte de sus proyectos y por ser modelos de mujeres científicas impetuosas y apasionadas.

A Marcela por seguir ahí, a veces poco presente, pero siempre lista para apoyar.

A Carla por creer siempre en mí y hacerme ver que yo también puedo hacerlo. Por su amistad y apoyo incondicional en todos los aspectos de mi vida. Gracias por permitirme formar parte de tu vida y de tu familia.

A mi familia que han sido el pilar que me ha permitido recorrer el camino hasta acá. En especial a mi mamá que siempre está ahí para brindarme su ayuda y su cariño, haciendo más ligera la carga.

A Adrián por su apoyo incondicional, aún en los momentos más difíciles. Sin ti no habría sido lo mismo. Gracias por aguantar mis momentos más difíciles, por tenderme unos brazos donde superar mis miedos y frustraciones, y por ayudarme a ver la vida por su lado más simplificado.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por poner a mi alcance la oportunidad de gozar de una formación profesional completa, integra y de gran calidad. GOYA...!

*“We are dynamic creatures living in a dynamic world”*

Curt Meine

## Índice general

Índice general .....	i
Índice de tablas .....	iii
Índice de figuras .....	iv
RESUMEN .....	vi
ABSTRACT .....	vii
INTRODUCCIÓN .....	1
Interacción bacteria-mineral: carbonatos microbianos .....	2
Cambio Climático y la precipitación de carbonato .....	4
Estudio de las comunidades .....	6
Mesocosmos .....	8
ANTECEDENTES .....	9
OBJETIVO GENERAL .....	13
Objetivos específicos .....	13
SITIO DE ESTUDIO .....	14
MATERIAL Y MÉTODOS .....	16
Colecta .....	16
Extracción de DNA .....	19
Sistema de mesocosmos .....	19
Amplificación y secuenciación .....	20
RESULTADOS .....	23
Composición mineral .....	23
Diversidad genética de comunidades en los biotopos .....	24
Experimento de Mesocosmos con biofilms litificados .....	31
DISCUSIÓN .....	36
Diversidad microbiana .....	37
Experimentos de mesocosmos en biofilms litificados .....	38
CONCLUSIONES .....	41

PERSPECTIVAS .....	42
REFERENCIAS .....	43
ANEXO I .....	52
ANEXO II .....	53

## Índice de tablas

Tabla 1. Riqueza genética estimada (índices ACE y Chao1), índices de diversidad y cobertura de cada uno de los biotopos .....	<b>25</b>
Tabla 2. Resultados de la bondad de ajuste del análisis de PCA de la figura 11 .....	<b>31</b>

## Índice de Figuras

Figura 1. Deterioro masivo de las colonias de <i>Acropora palmata</i> con una baja tasa de recuperación.....	10
Figura 2. Cortes de núcleos geológicos que muestran una gruesa costra microbiana (1) relleno de las cavidades primarias entre las estructuras calcáreas formadas por <i>Acropora</i> y algas calcáreas (2). Tomado de Riding y colaboradores, 2014 .....	11
Figura 3. Localización geográfica de las áreas de muestreo en el Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos, en la costa este de la península de Yucatán, México. LA: Laguna arrecifal; 1: sitio de muestreo de los diferentes biotopos; 2: sitio de muestreo La Bocana; BA: barrera arrecifal.....	14
Figura 4. Biotopos con biofilm asociados a carbonatos de calcio. a) Colonia sana de <i>Acropora palmata</i> , b) Rama de <i>Acropora</i> identificada con biofilm descrito como estado 1, c) fragmentos en procesos de deterioro con biofilm en estado 2, litificado .....	17
Figura 5. Comparación entre los difractogramas obtenidos del escaneo de rayos-X de las muestras molturadas. Coral: fracción mineral identificada como esqueleto de <i>A. palmata</i> ; Biofilm: fracción mineral desarrollándose como una segunda precipitación sobre el mineral dejado por <i>A. palmata</i> .....	18
Figura 6. Imagen del microscopio estereoscópico que muestra el crecimiento de los biofilms en estado 1 (a) y en estado 2, litificado (b), sobre el esqueleto calcáreo de <i>A. palmata</i> . A la derecha se muestra la composición mineral de cada fase .....	23
Figura 7. Composición taxonómica a nivel de phylum de los diferentes biotopos asociados con los fragmentos litificados de <i>A. palmata</i> , se muestran aquellos con abundancia >1%. Biofilm en estado 2-Litificado (Lit); en estado 1 (S-1); sedimento circundante (Sed); Tapete microbiano (Tm); Agua circundante (Ac); <i>A. palmata</i> sano (Ap) .....	26
Figura 8. Diagrama de ordenación de la composición de los biotopos en los dos primeros ejes del Análisis de redundancia (db-RDA). En el paréntesis se muestra el porcentaje de variación que explica cada eje. E1, muestras de biofilm en el estado 1; Sed E1-L, sedimentos circundantes a ambos estados de biofilm; Sed TM, sedimentos circundantes al tapete microbiano .....	27
Figura 9. Dendograma obtenido por el algoritmo UPGMA muestra la relación de distancia entre los biotopos, basado en una matriz de distancia Bray-Curtis. E1, estado 1 del biofilm; Sed, sedimento circundante; TM, tapete microbiano .....	28

Figura 10. Distribución de abundancias (> 1% de abundancia relativa) de las clases registradas en las muestras de biofilm litificado. El resto de las clases fueron agrupadas y se muestran como el grupo <1% .....	<b>29</b>
Figura 11. Distribución de abundancias de las clases con menos de 1% en muestras de biofilm litificado .....	<b>30</b>
Figura 12. Diversidad bacteriana a nivel de género en el biofilm litificado representando los diferentes periodos de incubación (Día_0-Día_15) en la condición de mesocosmos con el efecto combinado de bajo pH y aumento de temperatura. (a) Análisis de componentes principales (PCA) escalado a 1. b) Dendograma de agrupación por UPGMA basado en un matriz de distancia Bray-Curtis que muestra dos clados principales agrupados por similitud en composición: Día_11, 15 y Día_0,1,3,7 .....	<b>32</b>
Figura 13. Diversidad bacteriana a nivel de género en el biofilm litificado de los diferentes periodos de incubación (Día_0-Día_15). A la izquierda el análisis de componentes principales (PCA) escalado a 1; a la derecha el dendograma de agrupación jerárquica por UPGMA. A) Condición control—temperatura 30°C y pH 8.2; B) Condición con pH bajo =7.9; C) Condición con temperatura elevada = 32°C .....	<b>33</b>
Figura 14. Distribución de abundancias de las clases más representativas (>1%) de los clados de la primera y la segunda semana, bajo la condición control y la condición con el efecto combinado (pH 7.9/32°C) .....	<b>34</b>
Figura 15. Distribución de clases en la segunda semana de incubación entre la condición control y la condición con el efecto combinado de pH bajo y temperatura incrementada .....	<b>35</b>

## RESUMEN

Las comunidades microbianas en procesos de litificación de carbonato de calcio son particularmente relevantes para la formación de los arrecifes de coral ya que esta litificación permite la estabilización de una estructura secundaria del arrecife compuesta de calcita con alta concentración de magnesio. Esta segunda estructura promueve la permanencia a largo plazo de los arrecifes, favoreciendo el establecimiento de organismos formadores de arrecifes, tales como los corales escleractinios. Los arrecifes de coral están disminuyendo debido a múltiples factores, algunos de ellos asociadas con los cambios ambientales. Particularmente en el Caribe, el coral *Acropora palmata* ha sufrido un gran deterioro debido a enfermedades, blanqueamiento y al impacto de huracanes y tormentas. Informes muestran que en zonas donde las colonias de *A. palmata* han sido muy perturbadas se forman, lejos del arrecife, estructuras montañosas con los restos calcáreos transportados desde la barrera arrecifal. Estos restos presentan un proceso de litificación que permite que los fragmentos se fijen entre sí. En este proyecto se explora la diversidad microbiana que se desarrolla sobre estos restos calcáreos litificados, que lograron permanecer después de la gran disminución de las colonias de *A. palmata*, el principal formador de arrecife en el Caribe Mexicano. También se analizó la composición microbiana que puede persistir bajo escenarios de cambio global: aumento de temperatura y disminución de pH. Los biofilms litificados tienen una composición mineral a base de aragonita, calcita y calcita con magnesio (16% mol de  $MgCO_3$ ), mientras que la fase mineral correspondiente al esqueleto de coral es básicamente aragonita. La composición microbiana en los biofilms litificados es distinta a aquella de los biotopos circundantes, incluyendo tapete microbiano, columna de agua, sedimentos y el tejido sano de *A. palmata*. La abundancia de la composición bacteriana del biofilm litificado presentó un cambio significativo después de permanecer en incubación en un sistema de mesocosmos. El efecto combinado de pH bajo y aumento de temperatura mostró un fuerte efecto después de dos semanas de incubación. Los resultados sugieren que los biofilms asociados con el proceso de litificación podrían permanecer como una estructura secundaria de restos de arrecife ante escenarios de cambio climático, que posiblemente afectará el papel funcional de los arrecifes de coral.

## ABSTRACT

Microbial communities in calcium carbonate lithification processes are particularly relevant to coral reef formation because this lithification allows the stabilization of secondary reef structure composed of magnesium calcite. This second framework promotes long-term permanence of the reef, favoring the establishment of macro-reef builders, including corals. Coral reefs are declining due to several variables associated to environmental change. In the Caribbean, stony coral *Acropora palmata* have suffered damage due to diseases, bleaching and storms. Some reports show that in highly disturbed areas wide ridges of reef rubble are formed by biological and physical lithification. In this study, we explore the microbial diversity associated to lithified rubbles left after the great decline of reef-building *A. palmata* in the Mexican Caribbean and analyze the microbial composition that can persist under scenarios of global change, including high temperature and low pH. Lithifying biofilms have a mineral composition of aragonite, magnesium calcite (16 mole% MgCO<sub>3</sub>) and calcite, while the mineral phase corresponding to coral skeleton is basically aragonite. Microbial composition of the lithifying biofilms is different in comparison to surrounding biotopes, including a microbial mat, water column, sediments and live *A. palmata* microbiome. Significant shifts in biofilm composition were detected in samples incubated in mesocosms. The combined effect of low pH and increased temperature showed a strong effect after 2-week incubation for biofilm composition. Findings suggest that lithifying biofilms could remain as a secondary structure on reef rubble possibly impacting the functional role of coral reefs.

### INTRODUCCIÓN

Actualmente las construcciones biológicas carbonatadas más importantes son los arrecifes de coral, considerados entre los ecosistemas más productivos del planeta. Las especies base de estos sistemas son eucariontes: pólipos de coral y dinoflagelados (*Symbiodinium* spp.), que a medida que se multiplican en un sitio, sus esqueletos calcáreos forman grandes arrecifes. Además, en asociación con las algas coralinas se promueve la actividad cementante permite la formación de las barreras arrecifales. Sus estructuras calcáreas proporcionan complejos microambientes, que sostienen una amplia diversidad microbiana y de macrofauna incluyendo crustáceos, moluscos y peces (Ainsworth *et al.*, 2010). Sin embargo, los arrecifes de coral están degradándose rápidamente a escala global debido a la combinación de diversos factores tales como: cambios ambientales, sobreexplotación, enfermedades del coral y la eutroficación del agua del océano, resultando en la pérdida de los hábitats y biodiversidad que los arrecifes confieren (Hoegh-Guldberg, *et al.*, 2007, Barott, *et al.*, 2011). Cerca del 50% de los corales a nivel mundial se encuentran dañados o gravemente amenazados. A medida que el coral muere la estructura calcárea se debilita y se rompe, algunos de estos fragmentos se depositan en el lecho marino a expensas de ser desintegrados debido a la fricción con la arena y a la bioerosión, lo que conlleva a la pérdida de arrecifes (Edwards, 2010). Sin embargo, se ha observado en el registro geológico evidencia de depósitos minerales microbianos rellenando resquicios en el arrecife, ya sean estructurales, o bien, producto de la erosión de moluscos u otros organismos horadadores (Camoin *et al.*, 1999).

Las comunidades microbianas que interactúan con minerales aparecen en el registro fósil desde etapas muy tempranas de la Tierra (Grotzinger & Knoll, 1999; Hofmann *et al.*, 1999; Schopf *et al.*, 2007). Estas comunidades han sido ampliamente identificadas en el registro fósil y actualmente en estructuras análogas, como microbialitos. Los estudios sobre la interacción de microorganismo con minerales, principalmente carbonato de calcio, se han llevado a cabo en estos microbialitos, con el objetivo de entender los procesos que intervienen en la litificación de dichas comunidades (Burne & Morre, 1987; Golubic *et al.*, 2000; Dupraz *et al.*, 2009).

### **Interacción bacteria-mineral: carbonatos microbianos**

La interacción de microorganismos con minerales fue puesta a consideración a partir de los indicios de materia orgánica en sedimentos calcáreos, como producto de la actividad microbiana (Brasier *et al.*, 2002; Shapiro, 2004; Perri & Tucker, 2007; Mata & Bottjer, 2012). De hecho, los estudios sobre carbonatos microbianos comenzaron siendo temas meramente geológicos (Burne & Moore, 1987; Grotzinger & Knoll, 1999) que más tarde abrieron brecha al área microbiológica, desencadenando una serie de estudios en comunidades microbianas bénticas vivas que resultan análogas a aquellas en el registro fósil (Chafetz & Buczynsk, 1992; Riding, 2000; Arp *et al.*, 2004; Stal, 2012). Por lo tanto, estos análogos actuales representan ecosistemas resilientes que han logrado permanecer en el tiempo y son los modelos perfectos para investigar interacciones microbianas, ciclaje de elementos (C, N y S), así como los procesos de precipitación y disolución de minerales (Myshrall *et al.*, 2010; Stal, 2012). La investigación sobre los procesos de precipitación de minerales se generó a causa del interés de explicar los procesos de cementación y litificación de las comunidades microbianas, que les permitieron quedar impresos en el registro fósil. Las principales comunidades microbianas que se estudian en materia de interacciones bacteria-mineral son biofilms<sup>1</sup> sedimentarios, tapetes microbianos y microbialitos tanto en el registro geológico como en formaciones vivas actuales (Riding, 2000; Stal, 2012). La precipitación de carbonatos microbianos se ha estudiado principalmente en comunidades bénticas en ambientes acuáticos tales como las zonas costeras tropicales (Feldmann & McKenzie, 1998; Reid *et al.*, 2000), lagos (Couradeau *et al.*, 2011; Glunk *et al.*, 2011) y lagunas hipersalinas (Bebout & García-Pichel, 1995; Omoregie *et al.*, 2004; Ley *et al.*, 2006; Breitbart *et al.*, 2009), ríos (Pedley 1992) y hot springs (Ward *et al.*, 1998).

La precipitación microbiana de CaCO<sub>3</sub> puede ocurrir principalmente por dos mecanismos. El primero es referido como precipitación inducida, que ocurre como resultado directo de la actividad metabólica de las bacterias, por lo tanto, requiere de la presencia de células metabólicamente activas. El otro, precipitación influenciada por microorganismos, en donde la precipitación ocurre por la interacción pasiva entre el ambiente orgánico extracelular (producido

---

<sup>1</sup> En su sentido más amplio se refiere a agregados microbianos que generalmente se acumulan en una interface sólido-líquido y están revestidos por una matriz muy hidratada de sustancias poliméricas extracelulares (EPS). Los *biofilms* pueden formar microconsorcios estables, desarrollar gradientes fisicoquímicos, experimentar transferencia horizontal de genes, así como una intensa comunicación célula a célula, por lo que estos consorcios resultan ambientes altamente competitivos (Flemming & Wingender, 2010)

por bacterias) y el ambiente geoquímico en el que se desarrolla el proceso (Dupraz *et al.*, 2009). Ambos procesos difieren de la biomineralización típica de eucariontes, debido a que en esta actividad celular es la que controla completamente la formación de minerales para constituir estructuras internas o externas del organismo (Perry *et al.*, 2007). Los procesos metabólicos bacterianos facilitan la precipitación de  $\text{CaCO}_3$ , creando microambientes químicos favorables para la precipitación, en donde se regulan la concentración de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{CO}_3^{2-}$ , el pH y por lo tanto el índice de saturación<sup>2</sup> del  $\text{CaCO}_3$  (Emerson & Hedges, 2008). La presencia de una matriz extracelular de sustancias poliméricas extracelulares (EPS, por sus siglas en inglés), de gran relevancia en la estabilidad y mantenimiento de los biofilms microbianos (Flemming & Wingender, 2010), es un factor clave en la regulación de la precipitación ya que permite el establecimiento de micronichos en los que se incrementa la eficiencia de las rutas metabólicas favorables para la nucleación y precipitación de carbonato de calcio (Kawaguchi & Decho, 2002; Braissant *et al.*, 2007; Dupraz *et al.*, 2009). La composición de comunidades formadoras de EPS es taxonómica y fisiológicamente diversa, dominada por cianobacterias, bacterias heterótrofas y quimiolitótrofas (Paerl *et al.*, 2000, Stolz, 2000, Stal, 2000), cuyos procesos metabólicos (por ejemplo: fotosíntesis, respiración y formación de EPS) resultan ser de interés en los procesos de precipitación de carbonatos (Dupraz & Visscher, 2005). La fotosíntesis, tanto oxigénica como anoxigénica, y la reducción de sulfato incrementan el pH en un sistema supersaturado de  $\text{CaCO}_3$ , favoreciendo su precipitación (Riding, 2000). En el caso de la fotosíntesis, presencia de la enzima anhidrasa carbónica favorece la formación de un microambiente extracelular alcalino en el cual sucede la precipitación de  $\text{CaCO}_3$ , debido a que su actividad catalítica en el carboxisoma exporta  $\text{OH}^-$ , y su actividad en el EPS aumenta localmente la concentración de  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{CO}_3^{2-}$  a partir del  $\text{CO}_2$  (Jansson & Northen, 2010). Además, la producción masiva del EPS, resulta muy eficiente en el secuestro de cationes como  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que puede inhibir la precipitación de carbonato, de tal manera que la descomposición de esta materia orgánica por el metabolismo heterotrófico permite la liberación de dichos cationes permitiendo la precipitación (Dupraz & Visscher, Dupraz, *et al.*, 2008, Paerl *et al.*, 2001). Básicamente los cambios geoquímicos inducidos metabólicamente por la

---

<sup>2</sup>  $\text{SI} = \log (\text{IAP} / \text{K}_{\text{sp}})$

IAP = Producto de la actividad iónica  $\{\text{Ca}^{2+}\} \times \{\text{CO}_3^{2-}\}$

$\text{K}_{\text{sp}}$  = Producto de la solubilidad del mineral correspondiente (aragonita =  $10^{-6.19}$ , calcita =  $10^{-6.37}$ ; a 25 °C, 1 bar de presión y 35 PSU de salinidad).

En donde un valor positivo del índice de saturación ( $\text{IAP} > \text{K}_{\text{sp}}$ ), indica sobresaturación de  $\text{CaCO}_3$  por lo que este se precipita.

actividad microbiana pueden alterar el índice de saturación del carbonato de calcio, así como promover o inhibir la nucleación de estos cristales (Visscher & Stolz, 2005; Soetaert *et al.*, 2007).

### **Cambio Climático y la precipitación de carbonato**

La precipitación y la disolución de minerales de  $\text{CaCO}_3$  están controlados por el pH el cual a su vez depende de la presión parcial del  $\text{CO}_2$  disuelto en el agua ( $p\text{CO}_2$ ), ya que cuando el  $\text{CO}_2$  se disuelve, el ácido carbónico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) y el bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) se disocian liberando iones hidrógeno causando una disminución en el pH de la solución. Esto incrementa la concentración de iones  $\text{CO}_3^{2-}$  en el agua, sin embargo, la tasa de generación de iones  $\text{H}^+$  en la disociación del ácido carbónico es más rápida que la reacción de disociación del  $\text{HCO}_3^-$  que produce iones  $\text{CO}_3^{2-}$ , por lo que el incremento de  $\text{CO}_2$  en realidad causa la disolución del carbonato por el incremento de la acidez al disminuir el pH. Esto quiere decir que, si los cristales de  $\text{CaCO}_3$  reaccionan con una solución de ácido carbónico, esos minerales estarán sujetos a la disolución. Esta reacción es reversible, por lo tanto, la pérdida de  $\text{CO}_2$  provoca la disminución de la concentración de iones  $\text{H}^+$  y el pH aumenta, permitiendo que ocurra la precipitación de  $\text{CaCO}_3$  (Le Quéré & Metzl, 2004). Por lo tanto, la presión parcial del  $\text{CO}_2$  claramente controla la precipitación del carbonato de calcio y cualquier variable que cause la pérdida de  $\text{CO}_2$  podría teóricamente provocar el inicio de la precipitación.

Durante los últimos 200 años, se ha registrado un incremento significativo del 35% en la concentración atmosférica de  $\text{CO}_2$  derivado de las emisiones antropogénicas, la concentración preindustrial era 280 ppm, mientras que el valor medio global actual es  $\sim 400$  ppm (Sabine *et al.*, 2004). De hecho, el Panel Intergubernamental de Cambio Climático (IPCC), ha dado a conocer que, si se continúa con las dramáticas emisiones de  $\text{CO}_2$  hacia la atmósfera, para finales de este siglo la concentración pudiera alcanzar 800 ppm. Este incremento en la concentración de  $\text{CO}_2$  atmosférico resultaría en la alteración de la producción de carbonatos, debido a la capacidad del océano de absorber  $\text{CO}_2$  de la atmósfera, aumentando la concentración de  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{H}^+$ . Por lo tanto, a medida que aumenta la concentración de  $\text{CO}_2$  absorbido por el océano también aumenta la disolución de carbonatos para compensar la pérdida de iones  $\text{CO}_3^{2-}$ , por lo que la absorción de grandes cantidades de  $\text{CO}_2$  en el océano no resulta favorable, ya que reduce el pH y altera los balances químicos fundamentales (Doney *et al.*, 2009). Desafortunadamente las proyecciones para los

océanos, respecto al incremento del  $\text{CO}_2$  en la atmósfera, indican que en el agua superficial el carbono inorgánico disuelto (DIC) podría incrementar hasta en un 12% y la concentración de iones carbonato disminuiría casi 60%, con una reducción de pH de hasta 0.4 unidades (Orr *et al.*, 2005), lo cual tendría un fuerte impacto en la adaptación de los sistemas biológicos en el océano en formas que apenas se están comenzando a comprender (Fabry *et al.*, 2008).

El aumento del DIC en relación a la alcalinidad causa un impacto sobre los niveles de saturación de calcita y aragonita; y por lo tanto en la precipitación de  $\text{CaCO}_3$ . La insaturación general de  $\text{CaCO}_3$  en el océano parece estar incrementando; lo que implica que la disolución de las partículas de  $\text{CaCO}_3$  probablemente aumentará a medida que las aguas se vuelvan cada vez más insaturadas (Caldeira & Wicket, 2003). La disminución del estado de saturación tiene un profundo impacto en las tasas de calcificación de muchas especies de organismos, ya que esta tasa disminuye en respuesta a la reducción del estado de saturación. Esta tendencia se mantiene en múltiples taxa y en todas las fases minerales de  $\text{CaCO}_3$ , lo cual repercute en gran medida sobre la habilidad de los corales escleractinios para producir grandes cantidades de  $\text{CaCO}_3$  y de la cual ha dependido su éxito evolutivo (Doney *et al.*, 2009).

Los arrecifes de coral son comunidades especializadas que se desarrollan en aguas tropicales y subtropicales, supersaturadas de aragonita (la principal forma cristalina de carbonato de calcio en sus exoesqueletos). En estas comunidades, las algas coralinas son esenciales en el establecimiento de sustratos para el desarrollo de corales, estos sustratos son de calcita con magnesio. La aragonita y la calcita con magnesio son por lo menos 50% más solubles que la calcita, por lo cual estos organismos son particularmente afectados por el incremento de la  $\text{pCO}_2$ . De hecho, los estudios recientes (Doney *et al.*, 2009; Carpenter *et al.*, 2008; Hoegh-Guldberg *et al.*, 2007) muestran que las tasas de calcificación de los corales disminuyen en respuesta a los cambios en el pH y al estado de saturación de la aragonita. En condiciones de pH y saturación bajos, los corales escleractinios llegan a perder sus esqueletos dejándolos vulnerables y a expensas de predadores.

Por otra parte, el incremento de la temperatura del océano se relaciona con una mayor frecuencia de blanqueamiento de corales y aumento de las enfermedades de los mismos (Bourne *et al.*, 2007). Se ha descrito que el mucus que recubre a los corales, alberga bacterias con capacidad antibiótica contra algunos patógenos que pueden causar enfermedades letales en el tejido de corales como *A. palmata*. Sin embargo, el incremento en la temperatura provoca un

cambio en la estructuración bacteriana benéfica del mucus, conduciendo al desarrollo excesivo de microorganismos oportunistas (Ritchie, 2006). El incremento en la temperatura del agua también incrementa la probabilidad de que *A. palmata* sea susceptible a enfermedades, al incrementar la abundancia y virulencia de organismos patógenos una vez que los corales fueron afectados por el blanqueamiento (Muller *et al.* 2008). El impacto del aumento de la temperatura del agua, aunado a la reducción de la saturación de carbonato de calcio, reducen la capacidad de los corales para producir sus esqueletos de carbonato de calcio, y por lo tanto llevar a los arrecifes a erosionarse más rápido de lo que pueden depositar carbonato. Además del efecto de la temperatura sobre el estado de salud de arrecife, parece tener un efecto opuesto en la saturación de carbonato de calcio, ya que el incremento de la temperatura resulta en la disminución de la solubilidad del  $\text{CaCO}_3$  y con ello el incremento en su estado de saturación. Sin embargo, el aumento de la  $\text{pCO}_2$  es más relevante que el cambio de la temperatura (Gattuso, 1999).

### **Estudio de las comunidades**

La aplicación de técnicas moleculares impulsó en gran medida el estudio de los sistemas biológicos y en particular la ecología microbiana. Si bien, ya había un desarrollo establecido en el estudio de los organismos procariontes, la comprensión de la estructura microbiana experimentó un gran avance con el desarrollo de la filogenia molecular, permitiendo clasificar a los organismos de acuerdo a sus relaciones evolutivas a partir del gen 16S rRNA (Woese, 1987). A pesar de que en principio se enfocó en cultivos puros, las técnicas de clonación y secuenciación, posteriormente se emplearon en muestras ambientales y en otros genes de interés (Pace *et al.*, 1986). De tal forma que se podía obtener información genética de organismos que nunca habían sido cultivados y mucho menos identificados. Estos estudios también revolucionaron la comprensión sobre la abundancia, distribución y relevancia ecológica de los procariontes en el medio ambiente. Por ejemplo, DeLong (1992) en un estudio de clonación y secuenciación reportó la amplia distribución de arqueas en el mar usando *primers* de PCR específicos. Así como este caso el de otros tantos microorganismos en una gran variedad de ambientes. Todas estas secuencias han sido depositadas en bases de datos, contra las que son comparadas las nuevas secuencias que se van produciendo.

Las técnicas moleculares además permitieron resolver problemas de la ecología microbiana, sobre todo usando distintos marcadores genéticos para atender problemas comunitarios, como lo es la identificación de la composición de comunidades complejas, su metabolismo potencial y su respuesta a cambios en los parámetros ambientales. Por ejemplo, en los estudios sobre microbialitos y tapetes microbianos, las herramientas que ofrece la biología molecular han permitido realizar estudios para identificar a los organismos que los forman, a partir de métodos de secuenciación masiva (Centeno *et al.*, 2012); estudios con marcadores más específicos se han aplicado para entender la actividad metabólica potencial a partir de la distribución de genes asociados a los ciclos del nitrógeno (Moir & Wood, 200; Beltrán *et al.*, 2012) y fósforo (Bhaya *et al.*, 2000, Valdespino *et al.*, 2014). En este sentido también se han llevado a cabo análisis de la expresión de estos genes por PCR de transcripción reversa (Zani *et al.*, 2000, Falcón *et al.*, 2004).

Hoy en día las diversas plataformas de secuenciación de nueva generación son capaces de generar una gran cantidad de secuencias en menos tiempo que los métodos de las generaciones anteriores. Estas plataformas producen millones de secuencias de alto rendimiento de ~600 pb, incluso de diversas muestras ambientales al mismo tiempo, ya que cada una de estas es identificada con un marcador o etiqueta (Quail *et al.*, 2012). Al producir fragmentos pequeños se reduce la posibilidad de realizar análisis filogenéticos. Sin embargo, se gana mucho en la profundidad del esfuerzo de muestreo sobre todo en comunidades, lo que permite realizar estimaciones más precisas sobre la diversidad. Estas plataformas son cada vez más utilizadas en los estudios que exploran la diversidad y abundancia en las comunidades microbianas (Kunin *et al.*, 2010). De hecho, gracias a la secuenciación masiva se han registrado un gran número de secuencias que al compararlas con las bases de datos no corresponden con ninguna otra secuencia, así como OTU's poco abundantes o raros que han sido poco explorados (Sogin *et al.*, 2006).

Con esta gran producción de información obtenida en tan poco tiempo, la genómica y en especial la metagenómica, proporciona a la ecología microbiana nuevas herramientas para comprender los procesos biológicos. Si bien, los detalles del proceso para la obtención de metagenomas son complejos y extenuantes, básicamente se pueden identificar no solo los genes sino también las posibles funciones bioquímicas que realizan los organismos y así inferir la manera en la que pudiera estar funcionando un ecosistema (Breitbart *et al.*, 2009). Hoy en día, existen

arduos esfuerzos que intentan caracterizar la diversidad microbiana funcional y taxonómica a nivel global, como lo es el *Earth Microbiome Project*. Este proyecto global tiene la premisa de examinar de una manera sistemática las comunidades microbianas para construir un mapa microbiano que será puesto a disposición para cualquier tipo de investigación en el mundo.

### **Mesocosmos**

El mesocosmos, en su definición más amplia, es un contenedor con una capacidad que puede ser desde uno hasta miles de litros, que se han vuelto cada vez más comunes en los estudios ecológicos sobre el impacto del cambio climático. La implementación de estos sistemas surge por la necesidad de aplicar experimentación para responder preguntas cuyas hipótesis alternativas no pueden ser descartadas por técnicas estadísticas ni por modelos matemáticos (Stewart, 2013). Particularmente, en los estudios que buscan entender y predecir efecto del cambio climático, es necesario un análisis integral en el cual sean incluidos experimentos de mesocosmos, ya que estos logran incluir la complejidad biológica a grandes escalas, considerándose como un método muy sensible para evaluar respuestas a los cambios a nivel de comunidades y ecosistemas en un escenario más cercano a lo que ocurre en los ambientes (Stewart, 2013)

La predicción de los efectos del cambio climático en los sistemas biológicos no solo es muy relevante sino también resulta muy complicado de determinar, en gran medida porque no solo se trata del efecto del calentamiento sino también del cambio en la hidrología, biogeoquímica y una serie de otras variables (Walther, 2010). Los estudios de mesocosmos han sido utilizados en estudios de hábitats terrestres y acuáticos para examinar los efectos de los principales componentes del cambio climático en sistemas con múltiples especies, que se enfocan en sequías, calentamiento, y en el incremento de CO<sub>2</sub>. Los análisis de mesocosmos en materia de cambio climático se han ido aplicado lentamente, lo cual refleja una combinación de limitaciones logísticas y financieras, así como a una temprana inquietud sobre la extrapolación de los resultados a una escala global (Carpenter, 1996).

### ANTECEDENTES

Históricamente, en la región del Caribe, el coral escleractinio *Acropora palmata* había sido la especie dominante, pero en un par de décadas las especies género *Acropora* perdieron hasta ~80% de su cobertura original (Aronson & Precht, 2001; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2014), lo que resulta en grandes extensiones de restos calcáreos de coral muerto (Figura 1). Esto resulta alarmante ya que, aunque el registro fósil muestra que los arrecifes de coral han tenido ciclos de gran diversidad y extinción asociada con perturbaciones ambientales a gran escala, desde el Cámbrico (Budd, 2000), la mortalidad acelerada de las especies de *Acropora* no había sido tan significativa desde su registro fósil más antiguo, fechado en el Oligoceno tardío, como hasta ahora (Budd, 2000; Aronson y Precht, 2001). De hecho, aunque las ramas deterioradas y rotas de *A. palmata* pueden regenerarse por fragmentación<sup>3</sup>, estos restos no están logrando regenerarse debido a que la fertilización, establecimiento y crecimiento de *A. palmata* están siendo afectados por la acidificación del océano (Albright *et al.*, 2010). Por el contrario, estos restos calcáreos están siendo colonizados por biofilms microbianos que posiblemente participan en procesos de precipitación de carbonatos, resultando en la formación de una nueva estructura arrecifal distinta a aquella formada por los corales escleractinios.

---

<sup>3</sup> Forma de reproducción asexual, en la cual las ramas de una colonia se rompen y se adhieren al sustrato formando una nueva colonia.

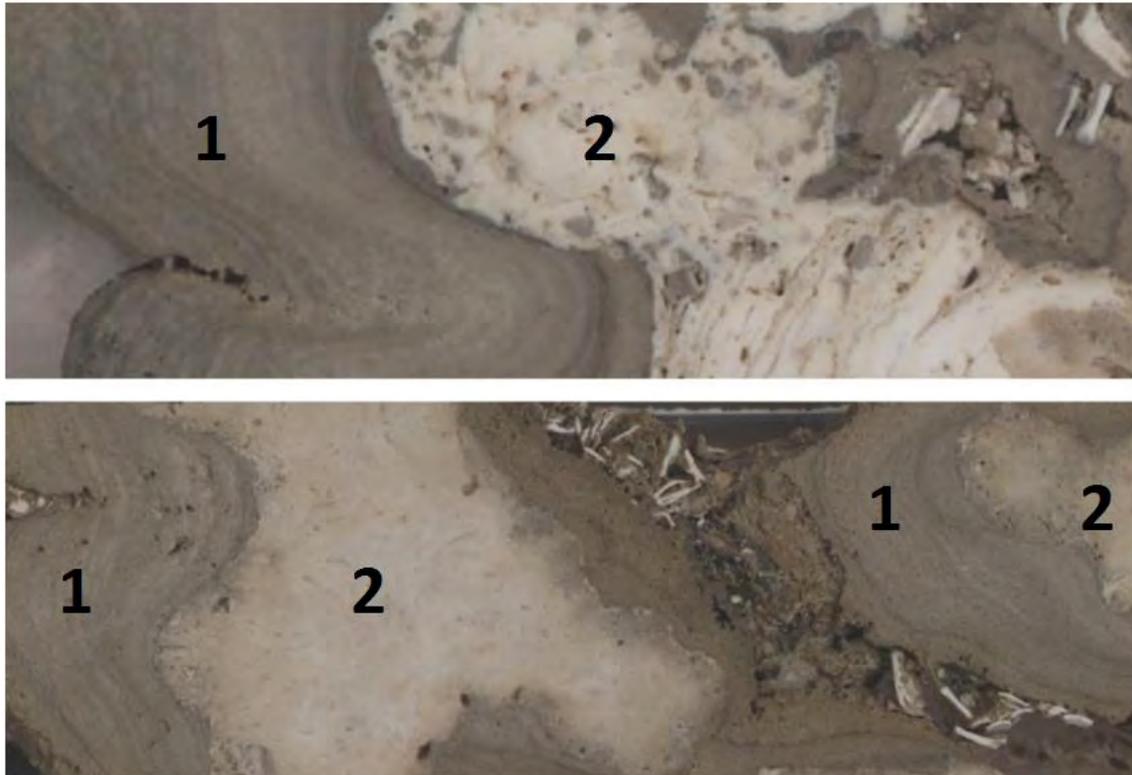


**Figura 1.** Deterioro masivo de las colonias de *Acropora palmata* con una baja tasa de recuperación.

Los restos calcáreos básicamente se derivan de las ramas muertas de una colonia de coral, en este caso de *A. palmata* que se originó en la parte frontal del arrecife. Se ha sugerido que cuando el coral se rompe en la parte frontal del arrecife, puede ser transportado hacia la parte posterior para formar montículos de estos restos que permiten el establecimiento de nuevas colonias, lo que resulta en un ciclo permanente de destrucción y regeneración del arrecife de coral (Blanchon *et al.*, 1997). Este ciclo ha logrado producir estructuras que se construyen en capas sucesivas de restos de coral durante miles de años (Blanchon *et al.*, 1997; Thornborough y Davies, 2011). La litificación, ya sea física o biológica de los cementos que estabilizan esta estructura arrecifal secundaria, está involucrada en la composición y preservación de los restos calcáreos (Rasser y Riegl, 2002).

El registro fósil indica que varios arrecifes de coral estaban formados por grandes volúmenes de costras bacterianas (Westphal *et al.*, 2010), las cuales persisten hoy en día en algunos arrecifes de aguas poco profundas tropicales (Camoin *et al.*, 2012), como se muestra en la figura 2. Estas costras bacterianas han sido llamadas cementos, estromatolitos y microbiolitos; y se componen principalmente de calcita de magnesio (Montar *et al.*, 2014), que juega un papel importante en el desarrollo de los arrecifes no sólo aportando una cantidad significativa de carbonato a la estructura arrecifal primaria, sino también ayudando en la estabilización y la unión de la formación arrecifal. Las comunidades calcáreas incrustantes pueden influir en la preservación

de la estructura principal construida por los corales, a través de la formación de un sistema secundario de carbonatos (Perry y Hepburn, 2008).



**Figura 2.** Cortes de núcleos geológicos que muestran una gruesa costra microbiana (1) relleno las cavidades primarias entre las estructuras calcáreas formadas por *Acropora* y algas calcáreas (2). Tomado de Riding y colaboradores, 2014.

El desarrollo de las comunidades microbianas sobre los restos calcáreos y aquellas en el arrecife de coral tiene gran relevancia en los procesos ecológicos dentro del ecosistema arrecifal, pero son poco o nada conocidas (Ainsworth *et al.*, 2010). Actualmente se empieza a reconocer la importancia benéfica de las comunidades microbianas en los ecosistemas costeros más allá de comunidades que pudieran resultar una fuente de enfermedades (Ritchie, 2006). Se ha descrito que la presencia de biofilms bacterianos instauran superficies que permiten un mayor asentamiento de invertebrados marinos y propágulos de macroalgas (Qian *et al.*, 2007). De hecho, se ha reportado que la estructura comunitaria del biofilm bacteriano puede influenciar el establecimiento de algunos invertebrados (Lau *et al.*, 2005). Por otro lado, determinar el efecto del cambio climático en los microorganismos marinos ha resultado ser un desafío (Joint *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2010). Sin embargo, recientemente se han comenzado a establecer una línea base

para el estudio de la respuesta de las comunidades microbianas a la acidificación del océano (Witt *et al.*, 2011; Lidbury *et al.*, 2012)

El estudio de las comunidades microbianas ambientales, hoy en día se realiza a través del análisis de secuencias de DNA, gracias a los avances tecnológicos en los métodos de secuenciación masiva (Metzker 2010), que han impulsado el rápido incremento en el número y alcance de proyectos que permiten entender la composición y operación de consorcios microbianos en muestras ambientales. En respuesta al aumento dramático en el volumen de secuencias, están siendo diseñadas herramientas computacionales como QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology), una paquetería de programación diseñada para la comparación y el análisis de las comunidades microbianas, basándose principalmente en los datos de la secuenciación de amplicones de alto rendimiento, generados en la amplia variedad de plataformas que existe (Caporaso *et al.*, 2010).

En este proyecto se explora la diversidad microbiana que se desarrolla sobre estos restos calcáreos litificados, que lograron permanecer después de la gran disminución de las colonias de *A. palmata*, el principal formador de arrecife en el Caribe Mexicano. También se analizó la composición microbiana que puede persistir bajo escenarios de cambio global: aumento de temperatura y disminución de pH.

## **OBJETIVO GENERAL**

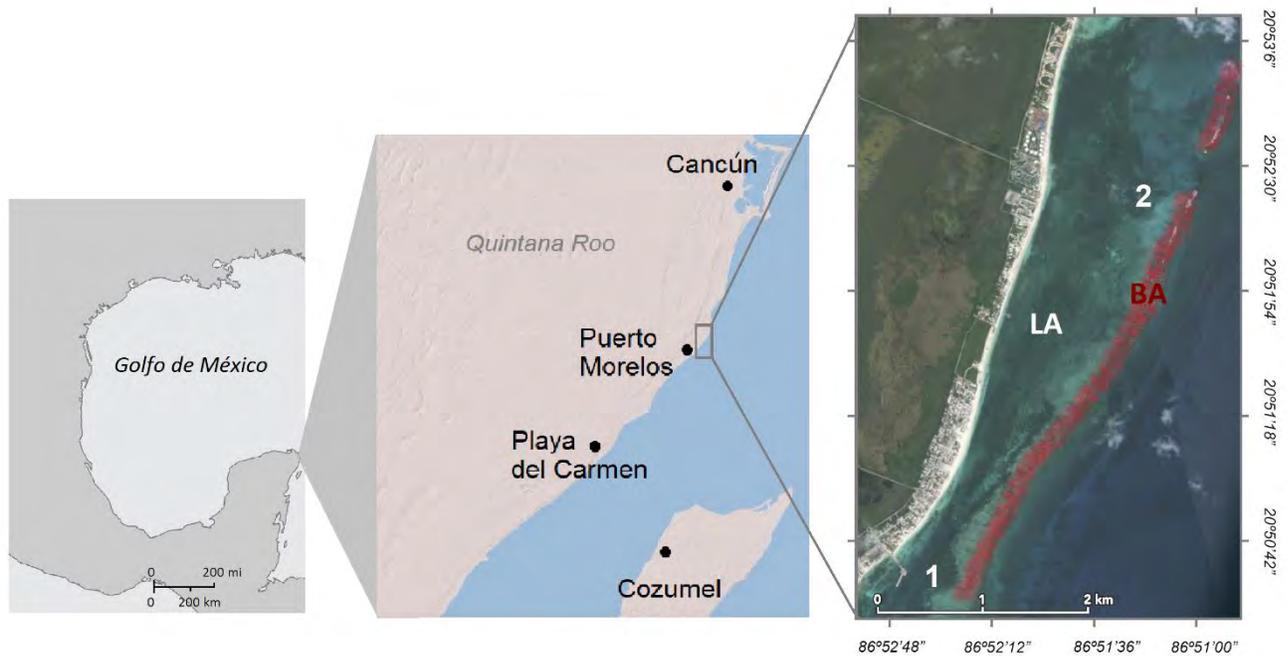
Describir las comunidades microbianas asociadas con estructuras coralinas en proceso de deterioro, así como su respuesta ante escenarios de cambio climático global (aumento en temperatura y disminución en pH).

### **Objetivos específicos**

- Describir el cambio en la diversidad microbiana de estructuras coralinas vivas y en proceso de deterioro.
- Describir la composición microbiana involucrada en el proceso de cementación de arrecifes deteriorados.
- Analizar el cambio de la composición microbiana involucrada en el proceso de litificación bajo escenarios de cambio climático.

## SITIO DE ESTUDIO

El Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos se localiza a 32 km al sur de la ciudad de Cancún, en el Municipio de Puerto Morelos, Q.R., México, ubicado a  $20^{\circ} 48' - 20^{\circ} 52' N$  y  $86^{\circ} 51' - 86^{\circ} 55' W$  (Figura 3). El parque resguarda una barrera de arrecife de 15 km que corre a lo largo de la línea costera la cual forma parte del Sistema Arrecifal Mesoamericano, la segunda barrera más grande del planeta. Este sistema de barrera arrecifal tiene una orientación norte-sur y se divide en laguna arrecifal, arrecife posterior y frontal, y cresta. El arrecife frontal forma una barrera que protege a la laguna y al arrecife posterior del impacto del oleaje. La profundidad del arrecife posterior varía dependiendo del tamaño de la tasa de crecimiento del arrecife, siendo la máxima profundidad de 6 m en una entrada al norte del arrecife, llamada Bocana, mientras que al sur se registró el arrecife a una profundidad de 1 m. El sustrato predominante en esta región del arrecife es básicamente un sustrato carbonatado formado por corales tales como *Acropora palmata*, algunas algas y *Thalassia testudium* (Collado-Vides *et al.*, 1998).



**Figura 3.** Localización geográfica de las áreas de muestreo en el Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos, en la costa este de la península de Yucatán, México. LA: Laguna arrecifal; 1: sitio de muestreo de los diferentes biotopos; 2: sitio de muestreo *La Bocana*; BA: barrera arrecifal.

La laguna arrecifal es el área entre la costa y el arrecife y tiene una amplitud entre 1500 m en la parte norte y 200 m en la región más cercana al poblado del mismo nombre. La profundidad máxima en el centro de la laguna es de ~4 m. El fondo de la laguna es arenoso con muy poco desarrollo de coral; mientras que algas y pastos marinos son más frecuentes. El agua en la laguna es oligotrófica con una baja concentración de nitritos ( $0.06 \mu\text{g-at L}^{-1}$ ), nitratos ( $13.9 \mu\text{g-at L}^{-1}$ ) y fosfatos ( $0.46 \mu\text{g-at L}^{-1}$ ). La salinidad varía poco a lo largo del año (35.8 to 36.2 ups). La alcalinidad promedio registrada es de  $2.5 \text{ mEq L}^{-1}$ , y el pH de 8.3; la temperatura del agua superficial oscila entre  $25.1\text{-}29.9 \text{ }^\circ\text{C}$  (Merino & Otero, 1991). La temporada seca y la temporada de lluvias no están claramente definidas, sin embargo, la temporada de huracanes se presenta de junio a noviembre (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010).

La condición general del arrecife en Puerto Morelos hace unas décadas exhibía una comunidad coralina dominada por grandes colonias de corales escleractinios, entre ellos *A. palmata*, *Millepora complanta* y *Orbicella annularis*, que gozaban de buena salud, sin presencia extrema de blanqueamiento, crecimiento de algas, ni otras enfermedades (Ruíz-Rentería *et al.*, 1998). Sin embargo, después comenzó un gran decremento presumiblemente causado por el incremento en la temperatura superficial del agua causando un estrés en los simbioses, reduciendo así la resistencia del coral a las infecciones e incrementando también el número de patógenos, ya que al principio solo era la banda blanca y el punto blanco que afectaban a las colonias de *Acropora*, pero rápidamente el número de enfermedades aumentó a seis, hasta que finalmente los eventos de blanqueamiento se volvieron más regulares cada que la temperatura del agua excede los  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010)

Durante los últimos 20 años se han llevado a cabo acciones de conservación y manejo, pero las poblaciones de *A. palmata* siguen vulnerables, con una baja recuperación después de los periodos importantes de mortandad en la década de 1980 (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2014).

### MATERIAL Y MÉTODOS

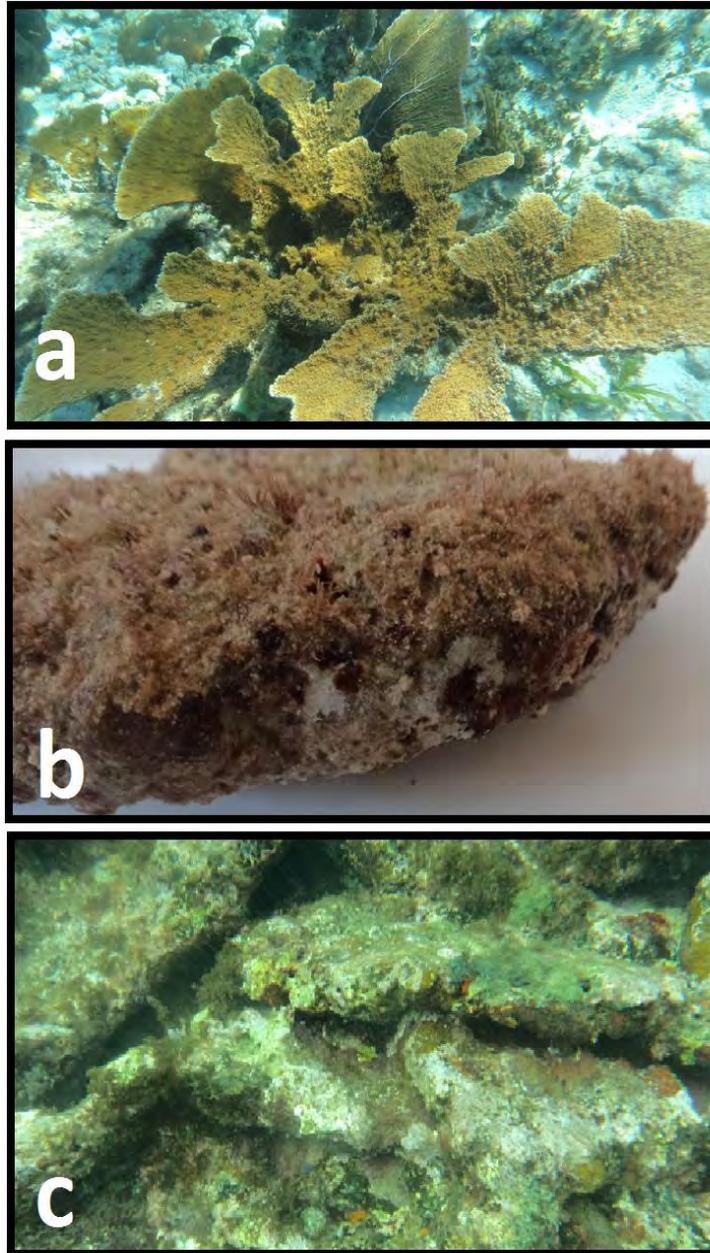
#### Colecta

En junio de 2013 fueron colectados en la laguna arrecifal en Puerto Morelos restos calcáreos de *Acropora palmata*, sobre los cuales se identificaron dos diferentes estados de crecimiento de un biofilm microbiano: el estado 1, un biofilm sin litificación; y el estado 2, un biofilm con litificación bien desarrollada (Figura 4). Estos fragmentos fueron colectados aproximadamente a 5 m de profundidad con cincel y martillo en bolsas estériles con cierre hermético y fueron transportadas en oscuridad dentro de una hielera. Las muestras de restos de *A. palmata* fueron almacenados a -20°C hasta su posterior manipulación.

El biofilm estado 1 es un consorcio microbiano desarrollándose sobre el sustrato carbonatado depositado por *A. palmata*, este biofilm calcificado es más delgado y la cementación entre los fragmentos no es resistente. El biofilm en estado 2 es un biofilm que presenta una estructura más compleja, con un fuerte grado de cementación que permite la sólida unión de los fragmentos entre sí. Además, fueron colectadas muestras de distintos biotopos<sup>4</sup> adyacentes a los restos calcáreos de *A. palmata* para analizar la diversidad microbiana y compararla con la de los biofilms de los restos calcáreos, estos biotopos incluyen sedimentos, agua circundante, un tapete microbiano y tejido de *A. palmata* sano. Las muestras de sedimentos fueron colectadas en núcleos triplicados de 10 cm, contiguos a los restos con biofilm (30-60 cm) y fueron colocados en bolsas estériles. El agua circundante fue colectada por triplicado con botellas estériles de 1 L. Muestras de un tapete microbiano creciendo en la proximidad del área de muestreo fueron colectadas en núcleos de 10 cm. Las muestras de tejido de *A. palmata* fueron colectadas removiendo con un cincel estéril un área de ~2 cm<sup>2</sup> del primer centímetro superficial de una colonia sana. Todas las muestras fueron conservadas en contenedores estériles en oscuridad y congelados a -20°C hasta su posterior manipulación.

---

<sup>4</sup> Biotopo= hábitat + comunidad; en un sentido más amplio que en su definición anterior, donde el biotopo era considerado solo la parte física del ecosistema (Olenin & Ducrottoy, 2006)

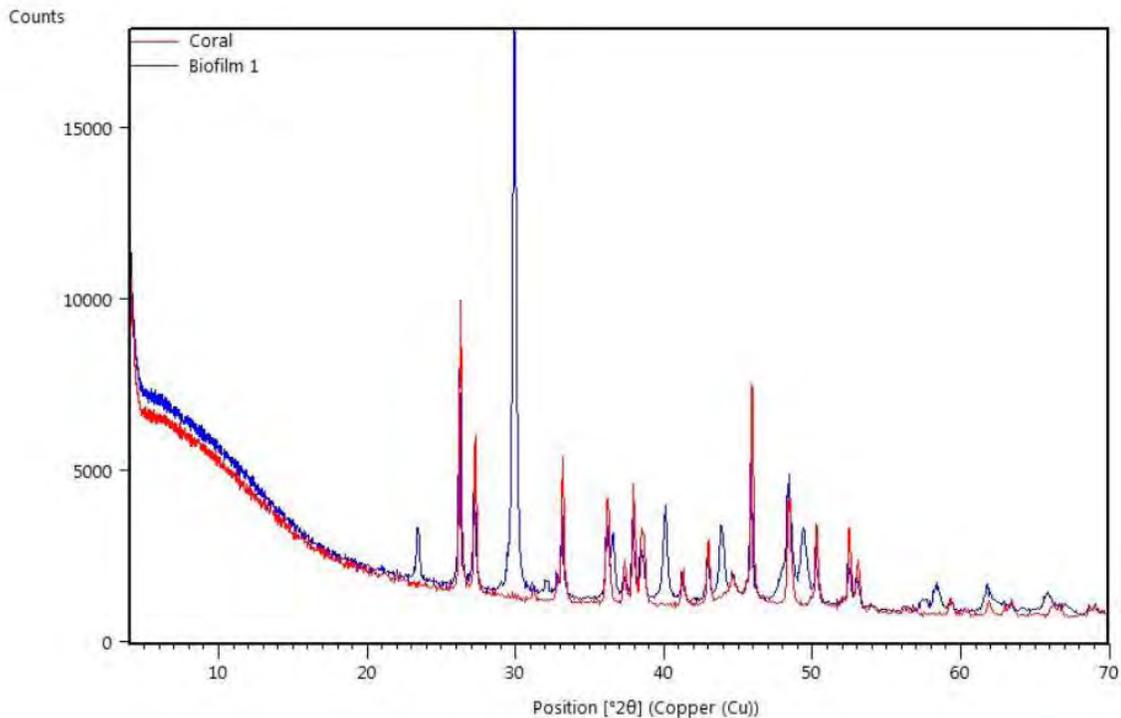


**Figura 4.** Biotopos con biofilm asociados a carbonatos de calcio. a) Colonia sana de *Acropora palmata*, b) Rama de *Acropora* identificada con biofilm descrito como estado 1, c) fragmentos en procesos de deterioro con biofilm en estado 2, litificado.

Los restos con biofilm fueron analizados para identificar las diferencias estructurales entre el estado 1 y el litificado con un microscopio estereoscópico con cámara de ocho megapíxeles, con módulos de multicon foco. Las imágenes con enfoque en todo el campo de profundidad y las

mediciones de longitud se obtuvieron con el programa Leica Application Suite, en el Instituto de Biología, UNAM.

La caracterización mineral de los biofilms en los restos calcáreos y de los esqueletos depositados por *A. palmata* se obtuvieron por medio de difracción de rayos X en el Instituto de Geología, UNAM. Los difractogramas<sup>5</sup> se obtuvieron en un Difractómetro Empyrean (PANalytical B.V.) equipado con un filtro de Ni, tubo de cobre de foco fino y detector PIXcel3D (Figura 5). Las muestras (~2 g) se molturaron y homogeneizaron en un mortero de ágata y se midieron utilizando un portamuestras de aluminio (fracciones no orientadas). La medición se realizó en el intervalo angular  $2\theta$  de  $5^\circ$  a  $70^\circ$  en escaneo por pasos con un “step scan” de  $0.003^\circ$  ( $2\theta$ ) y un tiempo de integración de 40 s por paso.



**Figura 5.** Comparación entre los difractogramas obtenidos del escaneo de rayos-X de las muestras molturadas. Coral: fracción mineral identificada como esqueleto de *A. palmata*; Biofilm: fracción mineral desarrollándose como una segunda precipitación sobre el mineral dejado por *A. palmata*.

<sup>5</sup> El difractograma corresponde a una huella particular de los minerales presentes en una muestra. Estos son interpretados y cuantificados a partir de su comparación con estándares de referencia (Flohr, 1997. Disponible en <http://pubs.usgs.gov/info-handout/diffraction/html> )

### Extracción de DNA

La extracción de DNA total se realizó siguiendo el protocolo modificado de Zhou *et al.* (1996). Se extrajo DNA de cada tipo de muestras (n=6 biofilms, n=3 por cada biotopo descrito previamente). Fue utilizada una mezcla homogenizada de 5 g de cada muestra, las cuales fueron pulverizadas en morteros de cerámica con nitrógeno líquido y 9 mL de buffer de extracción (100mM Tris-HCl, 1.5M NaCl, 100mM EDTA, 100mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8). Las muestras fueron incubadas durante 30 min a 37 °C con lisozima (concentración final 1 mg mL<sup>-1</sup>), Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB 6%) y se dejaron durante toda la noche a 55 °C con proteinasa K (concentración final 0.1 mg mL<sup>-1</sup>) y un volumen de dodecilsulfato sódico (SDS 20%). El DNA se extrajo dos veces con fenol:cloroformo:isoamil alcohol (24:25:1) y una vez con cloroformo, cada vez se obtuvo un sobrenadante por centrifugación (8000 rpm for 20 min). Finalmente, el ADN fue precipitado con etanol (0.6 del volumen) y 1/10 volumen parte de acetato de sodio 3M a -20 °C durante toda la noche. El DNA se recuperó por centrifugación (8000 rpm for 20 min) y el pellet lavado con etanol 70% (todos los reactivos son Sigma-Aldrich, Carlsbad, CA). Finalmente, los pellets de DNA fueron purificados con el kit DNeasy Blood & Tissue siguiendo el protocolo del fabricante (QIAGEN) y resuspendidos en agua grado molecular. Las muestras de agua fueron descongeladas y filtradas con membranas Durapore de 0.22 µm (Millipore). Posteriormente el DNA fue extraído siguiendo el mismo procedimiento de fenol-cloroformo mencionado anteriormente con las modificaciones de Centeno y colaboradores (2012).

### Sistema de mesocosmos

En la laguna arrecifal fue realizada una segunda colecta de restos calcáreos de *Acropora*, para trabajar en la descripción del cambio en la diversidad microbiana de estructuras carbonatadas. Esta colecta fue realizada en un sitio denominado Picudas, al sur de La bocana grande (20° 87. 792' N, 86° 84.283'), sitio en donde los restos calcáreos de *Acropora* se observaron más consolidados. En esta área la colecta se realizó en tres puntos con una separación de 50 m entre sí, a una profundidad de 5 metros aproximadamente. Las muestras fueron transportadas directamente hacia un sistema automatizado de mesocosmos, de cuatro tanques abiertos con capacidad de 60 L debajo de una pantalla de malla-sombra reduciendo 75% de la luz solar. Las muestras fueron sometidas a incubación en este sistema durante 15 días bajo las siguientes condiciones de pH y

temperatura: control—recreando la temperatura (30°C) y pH (8.2) del agua en el sitio de muestreo; temperatura alta—aumento de temperatura de 2°C y pH control (8.2); pH bajo—disminución de pH a 7.9 y temperatura control (30°C); combinada—aumento de temperatura a 32°C y pH bajo (7.9). EL pH en los mesocosmos fue ajustado burbujeando CO<sub>2</sub> en el flujo de agua que abastecía los tanques, mientras que la temperatura fue controlada con un termostato de recirculación hasta alcanzar los valores experimentales (pH=7.9, pCO<sub>2</sub>=890 ppm; pH=8.2, pCO<sub>2</sub>=390 ppm). Estos parámetros fueron monitoreados con un AquaController System (Neptune Systems, San Jose, CA). En cada uno de los tres sitios se colectaron cuatro fragmentos uno para cada condición, de los cuales se tomaron triplicados de 5 cm<sup>2</sup> de la superficie de los fragmentos incubados en cada condición, al inicio del experimento y después de 1, 3, 7, 11 y 15 días de incubación. Se realizó la extracción de DNA de 72 muestras (4 condiciones x 3 sitios x 6 tiempos) con el método fenol-cloroformo descrito anteriormente.

### Amplificación y secuenciación

Un fragmento de 420 pb que incluye la región hipervariable V4 del gen 16S rRNA fue amplificada por PCR siguiendo el protocolo de Caporaso *et al.* (2012), utilizando los *primers* universales de Bacteria y Archaea 515F/806R, con los cuales se obtiene una recuperación óptima de OTUs<sup>6</sup> en las muestras, a partir de secuencias con esta longitud (Caporaso *et al.*, 2011). El PCR para cada muestra tiene un *primer* Golay reverse específico (Caporaso *et al.*, 2010). La concentración de DNA de cada muestra para las reacciones de PCR fue obtenida por cuantificación fluorométrica con el kit de ensayo Qubit HS dsDNA (Invitrogen), que permite cuantificar de manera altamente específica muestras de ácidos nucleicos mediante el uso de sondas fluorescentes. Las reacciones de PCR de cada muestra, con volumen final de 25 µL (ver Anexo I), se realizaron con una concentración de ~2 ng/µL del DNA total, 2.5 µL de buffer 10X (Takara ExTaq PCR), 2 µL del mix de dNTP Takara (2.5 mM), 0.125 µL de Taq DNA Polimerasa Takara Ex (5u/µL, TaKaRa Corp., Shiga, Japan), 0.7 µL de albumina de suero bovino (20 mg/ml, Roche), *primers forward* y *reverse* (0.2 µM concentración final), y agua libre de nucleasas (Sigma Aldrich). La reacción se realizó con una desnaturalización inicial de 3 min a 95 °C; 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 s, alineamiento de *primer* a 52 °C por 40 s, extensión a 72 °C por 90 s, una extensión final de 12 min

<sup>6</sup> Del inglés Operational Taxonomic Units, es decir grupos de secuencias definidos por la similitud en sus nucleótidos.

a 72 °C. Se realizaron tres reacciones de PCR de cada muestra, las cuales fueron combinadas para obtener un volumen final de 75 µL por muestra, posteriormente las reacciones fueron purificadas con el sistema de fase sólida de purificación de inmovilización reversible con perlas magnéticas, (AgencourtAMPure XP, Beckman Coulter, Brea, CA). Este sistema permite eliminar los reactivos tales como cualquier *primer* y dímeros libres de la reacción de PCR y recuperar de manera eficiente solamente el DNA correspondiente a los amplicones de interés. Posteriormente, la concentración de DNA de la mezcla purificada de amplicones obtenida de las tres reacciones de PCR nuevamente es cuantificada con el kit de ensayo Qubit. Una sola mezcla, con los amplicones de todas las muestras (~20 ng por muestra, cada una identificada con un *primer* Golay *reverse* específico), fue enviada a secuenciar en la plataforma Illumina MiSeq300 (en el Centro de análisis genómico de Yale, CT, USA), de la cual se obtuvieron secuencias *paired-end* de ~250 pb. La longitud de estas secuencias se extendió solapándolas usando el programa FLASH (Magoč & Salzberg, 2011). El análisis de calidad de las secuencias y la agrupación según la muestra de la cual derivan (*demultiplex*) fueron realizados en QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) como se describe en Caporaso y colaboradores (2012) y Bokulich y colaboradores (2013), como se describe en el Anexo II. Las secuencias que se consideraron para los análisis posteriores fueron aquellas con al menos 75% de la longitud de la secuencia de entrada y libres de bases ambiguas. Las secuencias fueron agrupadas en unidades taxonómicas operativas (OTUs) al 97% de similitud nucleotídica, así como depuradas de secuencias quiméricas usando USEARCH (Edgar, 2010). La asignación taxonómica para cada OTU fue realizada en la versión 1.7.0 de QIIME (Caporaso *et al.*, 2012) usando las bases de datos RDP (Wang *et al.*, 2007) y Greengenes publicada 13-05. Los árboles filogenéticos fueron generados usando FastTree2 (Price *et al.*, 2010) en QIIME con los parámetros estándar, estos árboles se utilizaron para calcular las métricas de diversidad. Las secuencias generadas en este estudio fueron depositadas en la base European Nucleotide Archive SRA en el proyecto PRJEB10076.

Las métricas de diversidad, riqueza y cobertura de Good fueron calculadas en QIIME con análisis no-filogenéticos a partir del archivo con los OTUs únicos. La diversidad  $\beta$  fue calculada con la medida de distancia filogenética UniFRac ponderada. La matriz obtenida de esta métrica se utilizó para generar la ordenación de toda la composición microbiana en los distintos biotopos a partir de un análisis de redundancia basado en la distancia (db-RDA; Legendre & Legendre, 1998). Dicho análisis fue realizado en QIIME, así como la evaluación de la significancia estadística del agrupamiento de las muestras (ver Anexo II). Todos los análisis para agrupación de las muestras

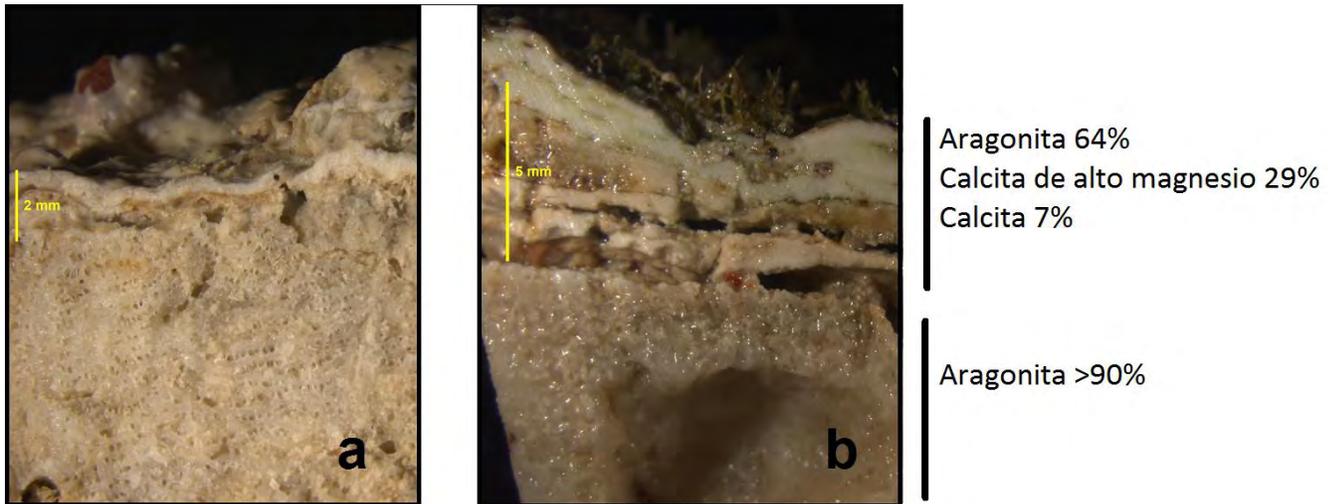
con una composición similar fueron realizados con el método UPGMA basado en la distancia Bray-Curtis y graficados con el paquete “cluster” en R 3.2.2.

Para el experimento de mesocosmos, un análisis de componentes principales basado en las diferencias en la composición a nivel de género (L6) entre los sitios fue graficado en R usando los paquetes “vegan” 2.2-1 y “Biodiversity R” 2.5-3. Un círculo de equilibrio fue plasmado en el gráfico de ordenación, que permite determinar los géneros que contribuyen significativamente a la ordenación ya que estos vectores salen del círculo (Legendre & Legendre, 1998).

## RESULTADOS

### Composición mineral

En la laguna arrecifal del Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos que representa una fracción del Sistema Arrecifal Mesoamericano, se presentan de manera cada vez más frecuente, cúmulos de restos calcáreos dejados principalmente por el coral escleractinio *Acropora palmata*, una vez que el pólipo y su simbiote han desaparecido. Las observaciones con el microscopio estereoscópico de los restos de *A. palmata* muestran una matriz litificada asociada con los biofilms (Figura 6), la cual impide que los fragmentos puedan ser separados entre sí. La caracterización mineral por difracción de rayos X muestra que la matriz mineral asociada con el biofilm es una mezcla de aragonita, calcita y calcita de alto contenido en magnesio (16 mol%  $MgCO_3$ ). Por otro lado, la fase mineral que corresponde al esqueleto calcáreo depositado por el coral presente en la fase más interna de los restos analizados, es decir, debajo del biofilm, es básicamente aragonita.



**Figura 6.** Imagen del microscopio estereoscópico que muestra el crecimiento de los biofilms en estado 1 (a) y en estado 2, litificado (b), sobre el esqueleto calcáreo de *A. palmata*. A la derecha se muestra la composición mineral de cada fase.

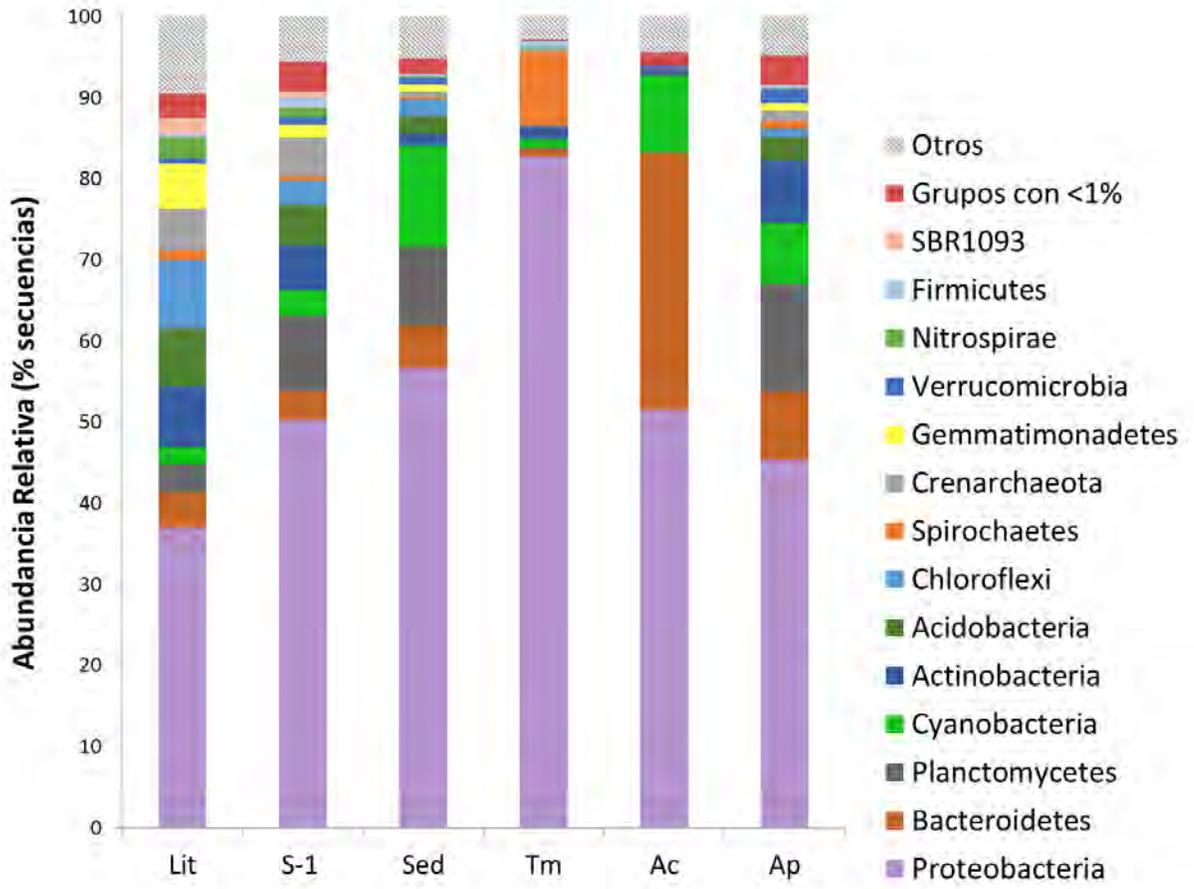
### Diversidad genética de comunidades en los biotopos

Se obtuvieron un total de 2,862,324 secuencias parciales del gen 16S rRNA de los seis biotopos considerados (biofilms estado 1 y litificado, coral sano, tapete microbiano, agua y sedimentos). Las muestras fueron rarefactadas a 14,400 secuencias y se obtuvieron un total de 12,668 OTUs al 97% de similitud. El biotopo con el menor número de OTUs fue el tejido de *A. palmata* sano (466 OTUs), mientras que la mayor cantidad de OTUs se obtuvo en las muestras de biofilm en estado 1 (3,493 OTUs). Los índices de diversidad fueron mayores en los biotopos biofilm estado 1, sedimentos y tapete microbiano, seguidos del biofilm litificado. La diversidad en las muestras de agua y de coral sano presentan la diversidad más baja de los biotopos analizados (Tabla 1). El número de OTUs obtenidos en cada uno de los biotopos cubren del 88 al 99% de la riqueza esperada para estas comunidades microbianas.

Los OTUs obtenidos en este análisis de biotopos pertenecen a alguno de 64 phyla bacterianos reportados, incluyendo algunos candidatos, sin embargo, la mayoría de las secuencias ~92% (dependiendo del biotopo), se afilian solamente a 14 phyla (Figura 7). Aunque los biotopos comparten la composición de los phyla más abundantes, su abundancia relativa varía entre ellos. En general el phylum Proteobacteria es el más abundante en cada uno de los biotopos. Otros phyla que resultaron abundantes en este estudio son Bacteroidetes, Planctomycetes, Cyanobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria y Crenarchaeota, este último particularmente abundante en los biofilms de los restos calcáreos. La composición bacteriana en *A. palmata* sano resultó predominantemente caracterizada por la presencia de Proteobacteria, Bacteroidetes, Planctomycetes y en menor proporción Cyanobacteria y Actinobacteria. Por otro lado, las muestras de agua tienen una composición típica de comunidades bacterianas en la columna de agua circundante a los corales (Frias-Lopez *et al.*, 2002), de la que resalta la presencia de Proteobacteria, Bacteroidetes y Cyanobacteria. Además de la dominancia de Proteobacteria, la composición del tapete microbiano está caracterizada por una gran proporción de Cyanobacteria (Figura 7). Los biofilms que colonizan los restos de *A. palmata* muestran a Proteobacteria, Bacteroidetes, Planctomycetes, Actinobacteria, Crenarchaeota, Acidobacteria y Chloroflexi como los phyla más abundantes (Figura 7). En todos los biotopos hay un considerable porcentaje de secuencias que no fueron asignados a ninguno de los phyla reconocidos a la fecha.

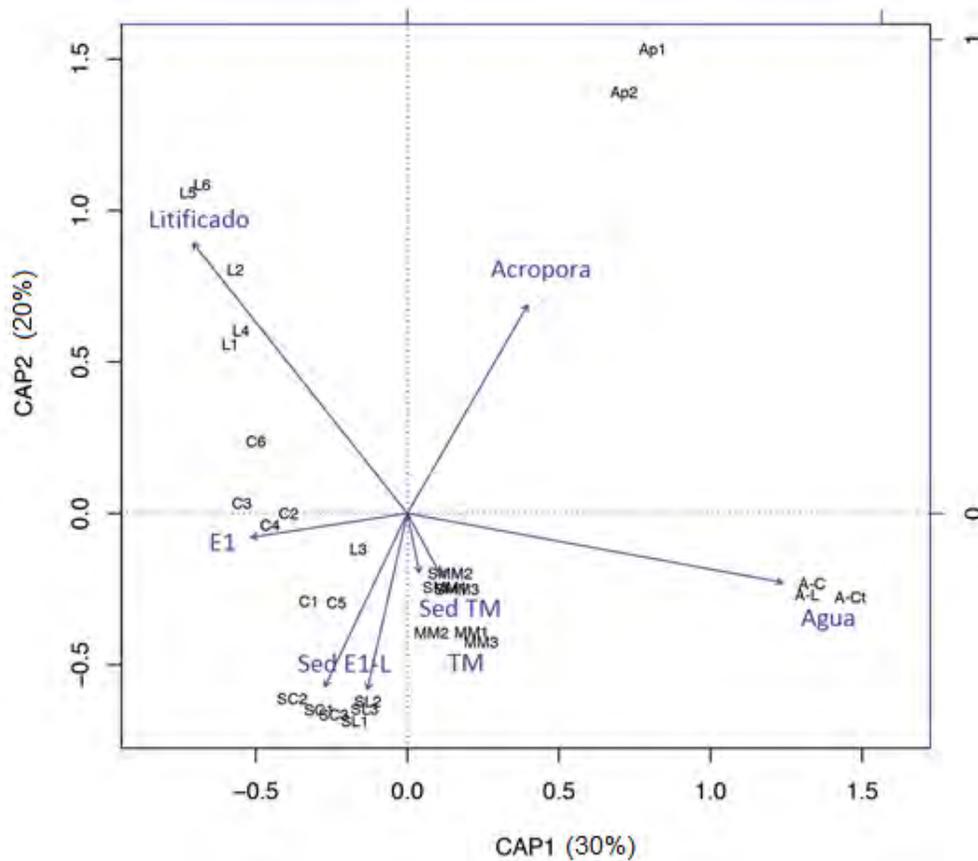
**Tabla 1.** Riqueza genética estimada (índices ACE y Chao1), índices de diversidad y cobertura de cada uno de los biotopos.

<b>Muestra</b>	<b>Número de OTUs</b>	<b>Chao1</b>	<b>ACE</b>	<b>H'</b>	<b>E<sub>H</sub></b>	<b>Simpson</b>	<b>Cobertura de Good (%)</b>	
<i>Biofilm estado 1</i>	110738	3493	5910	6140	10.35	0.88	1	93
<i>Biofilm estado 2-litificado</i>	80576	1983	3539	3620	8.72	0.8	0.99	90
<i>A. palmata sano</i>	67319	466	583	589	3.17	0.36	0.61	99
<i>Tapete microbiano</i>	65803	2800	4346	4494	9.66	0.84	0.99	95
<i>Agua circundante</i>	83550	786	1410	1402	5.82	0.61	0.94	96
<i>Sedimentos</i>	155441	3140	5499	5644	10.06	0.87	1	88

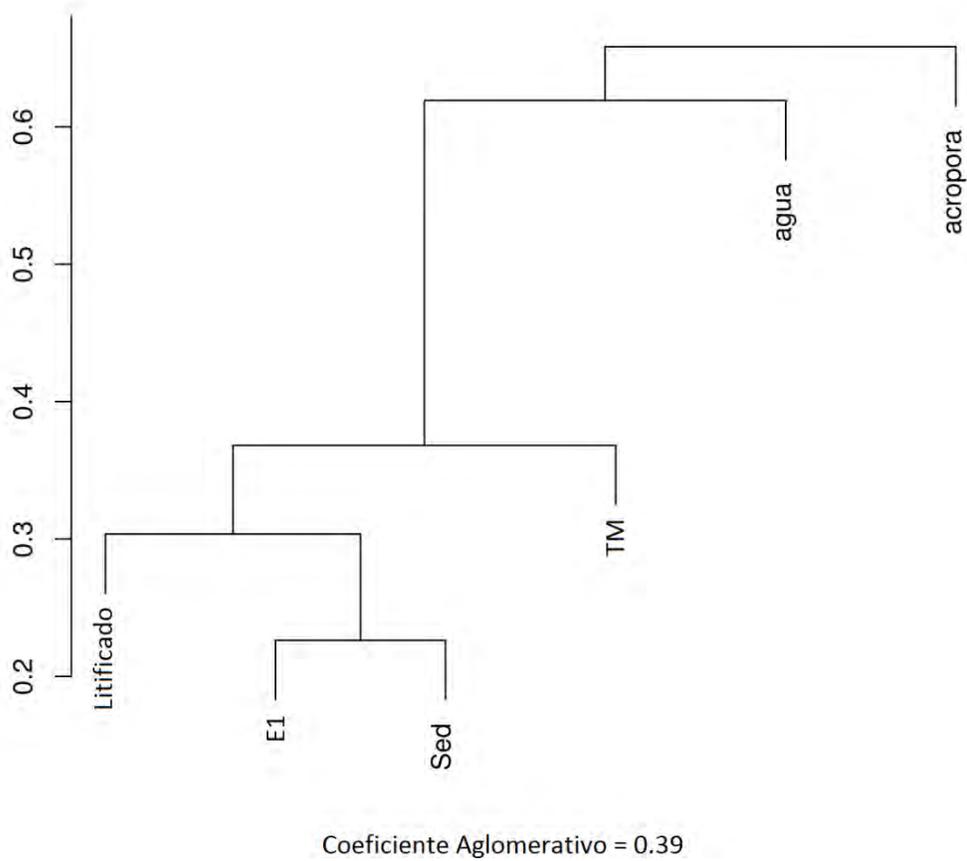


**Figura 7.** Composición taxonómica a nivel de phylum de los diferentes biotopos asociados con los fragmentos litificados de *A. palmata*, se muestran aquellos con abundancia >1%. Biofilm en estado 2-Litificado (Lit); en estado 1 (S-1); sedimento circundante (Sed); Tapete microbiano (Tm); Agua circundante (Ac); *A. palmata* sano (Ap).

La ordenación obtenida del análisis de redundancia basado en distancia (db-RDA) reveló que la composición de los biotopos es distinta entre cada uno de ellos (pseudo- $F_{10, 18} = 10.36$ ,  $p < 0.001$ ) (Figura 8). Este análisis identificó el tipo de biotopo como una variable significativa que explica el 85% varianza total de la ordenación espacial después de 999 permutaciones, lo que sugiere que los agregados microbianos son específicos para cada biotopo. El análisis de agrupación de la composición microbiana muestra una gran similitud entre los biotopos asociados con minerales (Figura 9). De hecho, las muestras que corresponden a los biofilms estado 1 y litificado son más similares entre ellos y con los sedimentos que con cualquier otro de los biotopos incluidos en el estudio, lo cual indica un cambio muy marcado de la composición en el tejido de coral sano y aquella que coloniza sus restos y forma una estructura arrecifal secundaria.

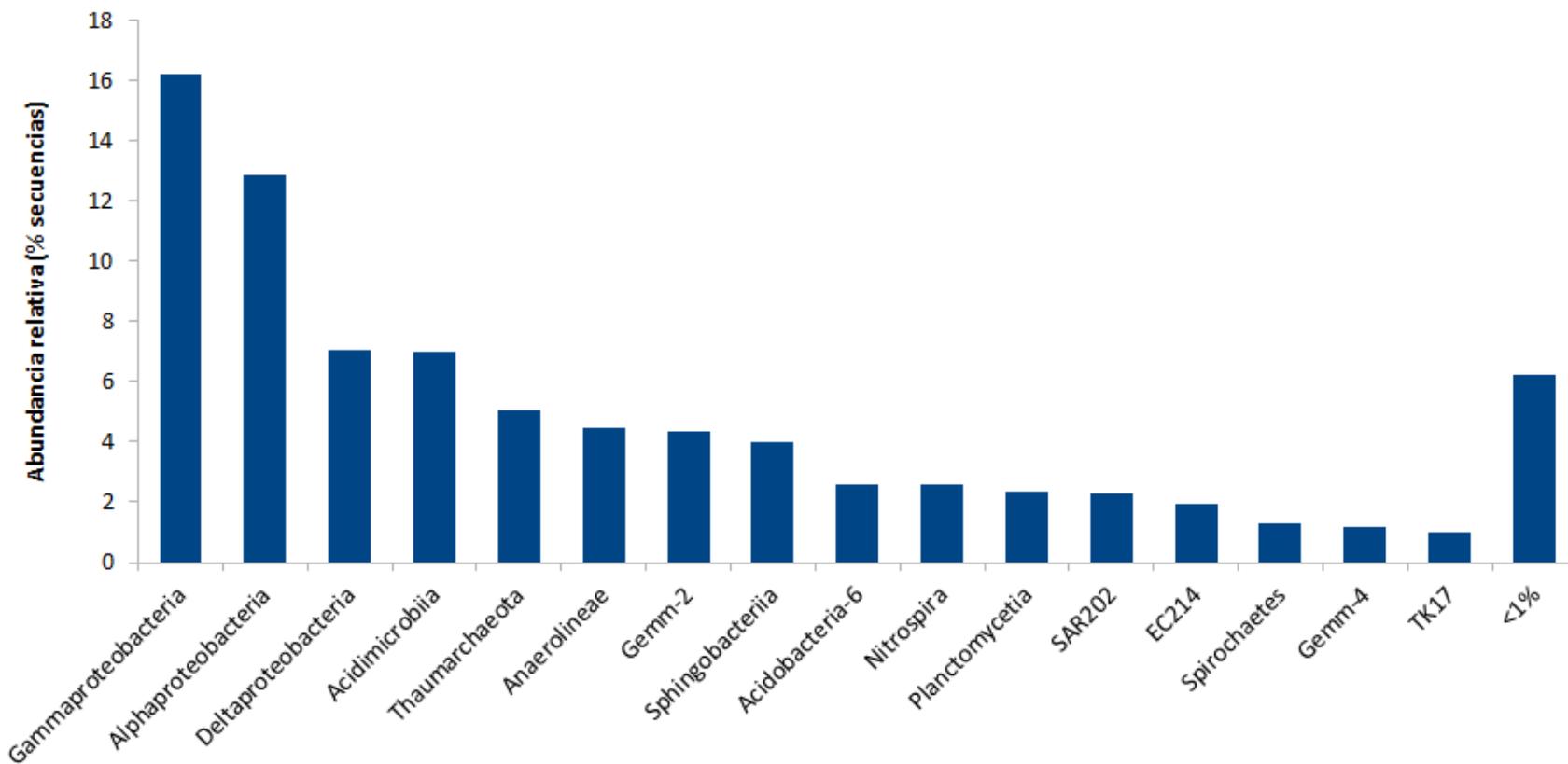


**Figura 8.** Diagrama de ordenación de la composición de los biotopos en los dos primeros ejes del Análisis de redundancia (db-RDA). En el paréntesis se muestra el porcentaje de variación que explica cada eje. E1, muestras de biofilm en el estado 1; Sed E1-L, sedimentos circundantes a ambos estados de biofilm; Sed TM, sedimentos circundantes al tapete microbiano.



**Figura 9.** Dendrograma obtenido por el algoritmo UPGMA muestra la relación de distancia entre los biotopos, basado en una matriz de distancia Bray-Curtis. E1, estado 1 del biofilm; Sed, sedimento circundante; TM, tapete microbiano.

El biofilm litificado tuvo 16 clases dominantes, en las cuales se representa 94% de la abundancia relativa total (Figura 10), incluyendo una proporción de cloroplasto de algas coralinas y algas verdes que pueden estar involucrados en gran medida en la litificación de la estructura arrecifal secundaria. La distribución de las restantes 96 clases con una abundancia relativa <1% que conforman el 6% restante de la abundancia relativa total se muestran en la figura 11.



**Figura 10.** Distribución de abundancias (> 1% de abundancia relativa) de las clases registradas en las muestras de biofilm litificado. El resto de las clases fueron agrupadas y se muestran como el grupo <1%.

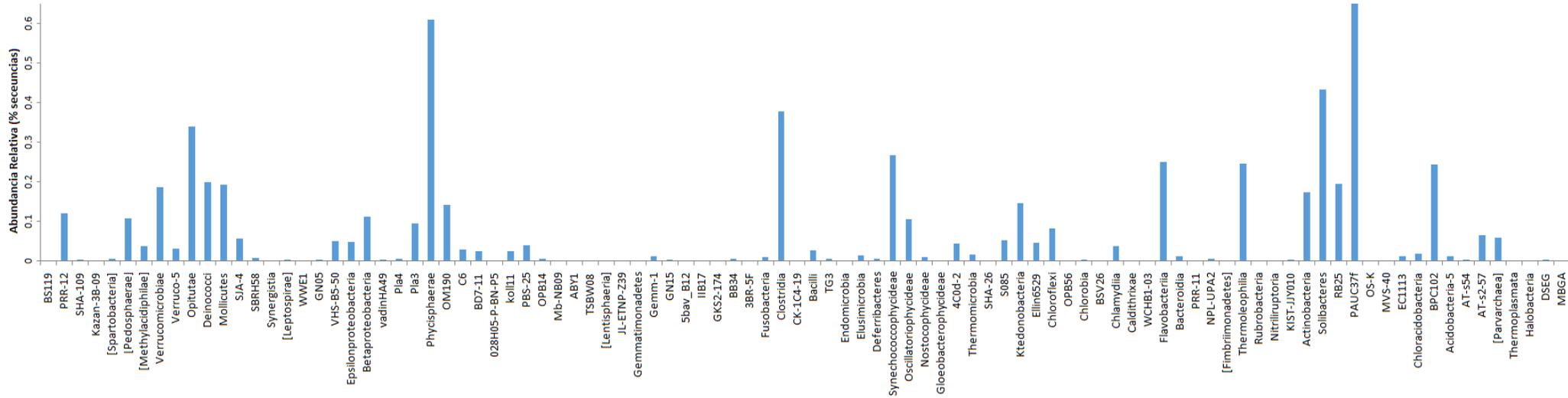


Figura 11. Distribución de abundancias de las clases con menos de 1% en muestras de biofilm litificado.

### Experimento de Mesocosmos con biofilms litificados

Se obtuvieron un total de 7,593,586 secuencias de alta calidad para los cuatro tratamientos que se mantuvieron en el sistema de mesocosmos, fueron obtenidas muestras con 48,436 secuencias hasta otras con 184,388 secuencias, mismas que fueron rarefactadas a 48,400. La composición microbiana de los restos litificados en una ordenación de componentes principales (PCA) de cada condición experimental muestra una clara división en la composición entre las muestras incubadas al menos una semana o menos (0, 1, 3, 7 días de incubación) y la composición en aquellas que permanecieron 11 y 15 días de incubación en el mesocosmos (Figuras 12a y 13). La bondad de ajuste para la ordenación fue calculada con el porcentaje de varianza explicado para cada periodo de incubación en los dos primeros componentes, resultando en más del 70% de la varianza explicada por día (tabla 2).

**Tabla 2.** Resultados de la bondad de ajuste del análisis de PCA de la figura 11.

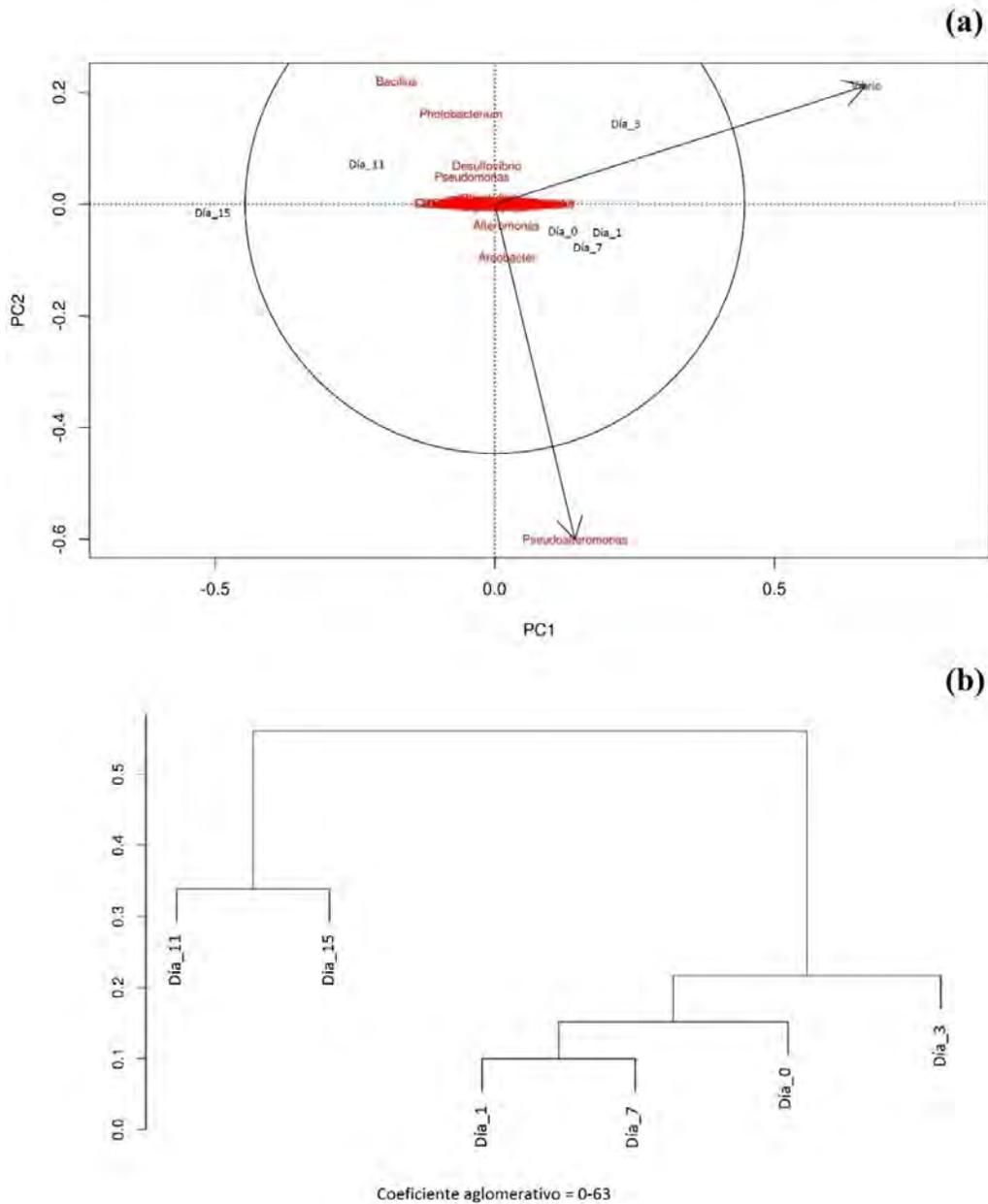
<i>Periodo de incubación</i>	<i>PC1</i>	<i>PC2</i>
<i>Día_11</i>	0.8540	0.9199
<i>Día_15</i>	0.9914	0.9929
<i>Día_1</i>	0.8896	0.9552
<i>Día_0</i>	0.6038	0.7035
<i>Día_3</i>	0.7275	0.9891
<i>Día_7</i>	0.7365	0.9107

El análisis de PCA presenta un círculo de contribución<sup>7</sup>, en el cual los géneros que más contribuyen a la ordenación tienen vectores más largos que el radio del círculo, sugiriendo que la ordenación de las muestras que se incubaron al menos una semana o menos, ocurre principalmente por la composición de los géneros *Vibrio* y *Pseudoalteromonas*. La agrupación en el UPGMA muestra que la composición es más similar entre las muestras de la primera semana y entre aquellas de la

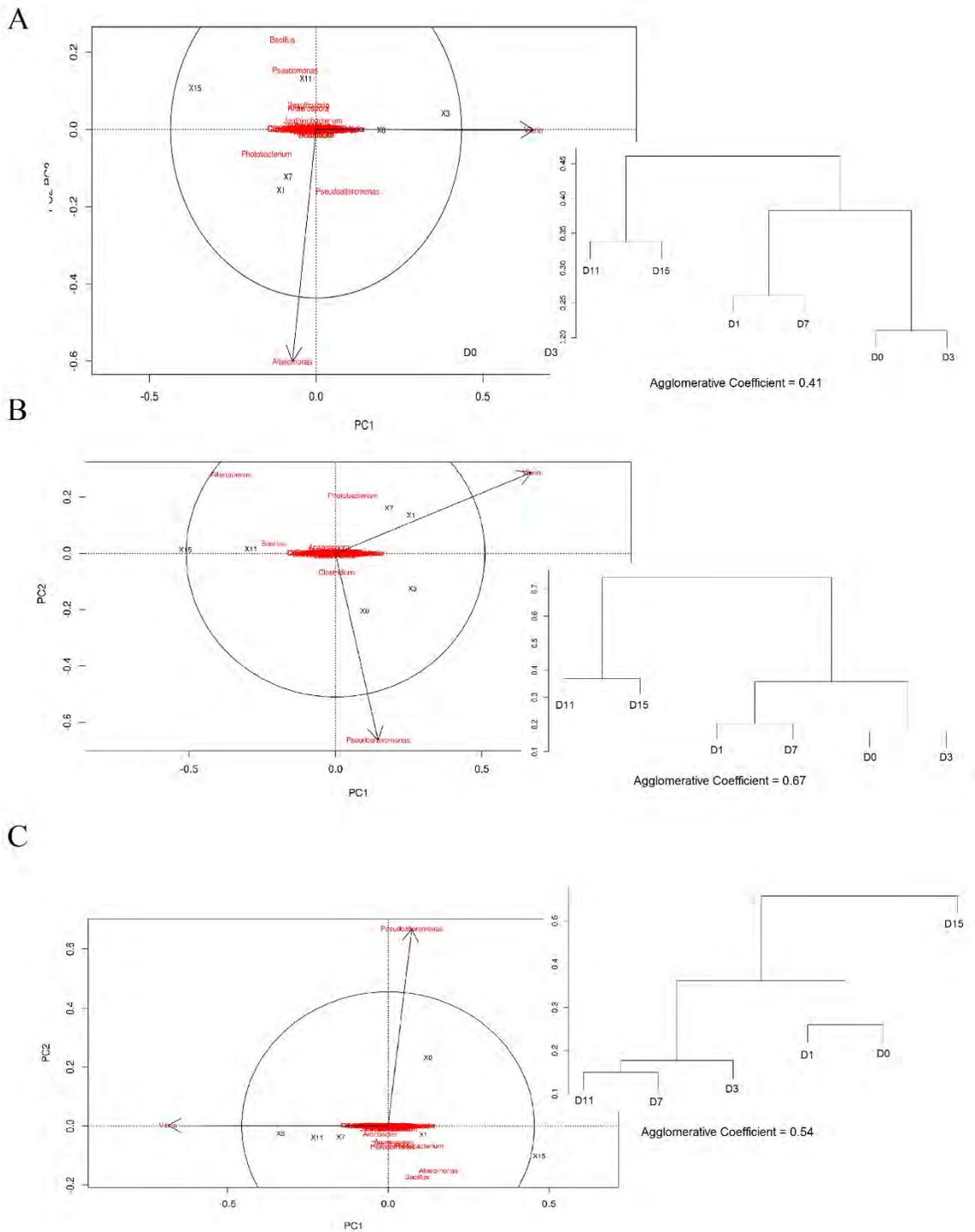
<sup>7</sup> Este radio se calcula a partir de  $\sqrt{d/p}$ , donde  $d$  es el número de dimensiones y  $p$  es el número total de descriptores (Legendre & Legendre, 1998)

## RESULTADOS

segunda semana, ya que se observa un clado con las muestras que tuvieron 11 y 15 días de incubación distinto de la agrupación que forman las muestras de los días 0, 1, 3 y 7 (Figura 12b).



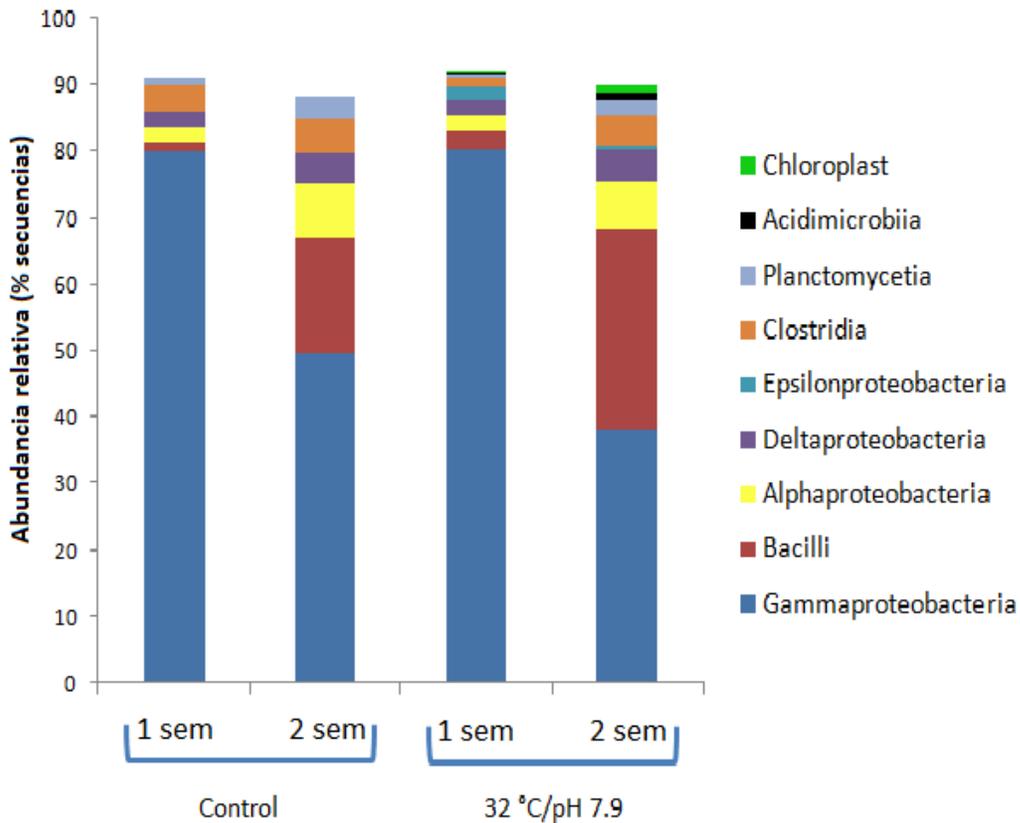
**Figura 12.** Diversidad bacteriana a nivel de género en el biofilm litificado representando los diferentes periodos de incubación (Día\_0-Día\_15) en la condición de mesocosmos con el efecto combinado de bajo pH y aumento de temperatura. (a) Análisis de componentes principales (PCA) escalado a 1. b) Dendrograma de agrupación por UPGMA basado en un matriz de distancia Bray-Curtis que muestra dos clados principales agrupados por similitud en composición: Día\_11, 15 y Día\_0,1,3,7.



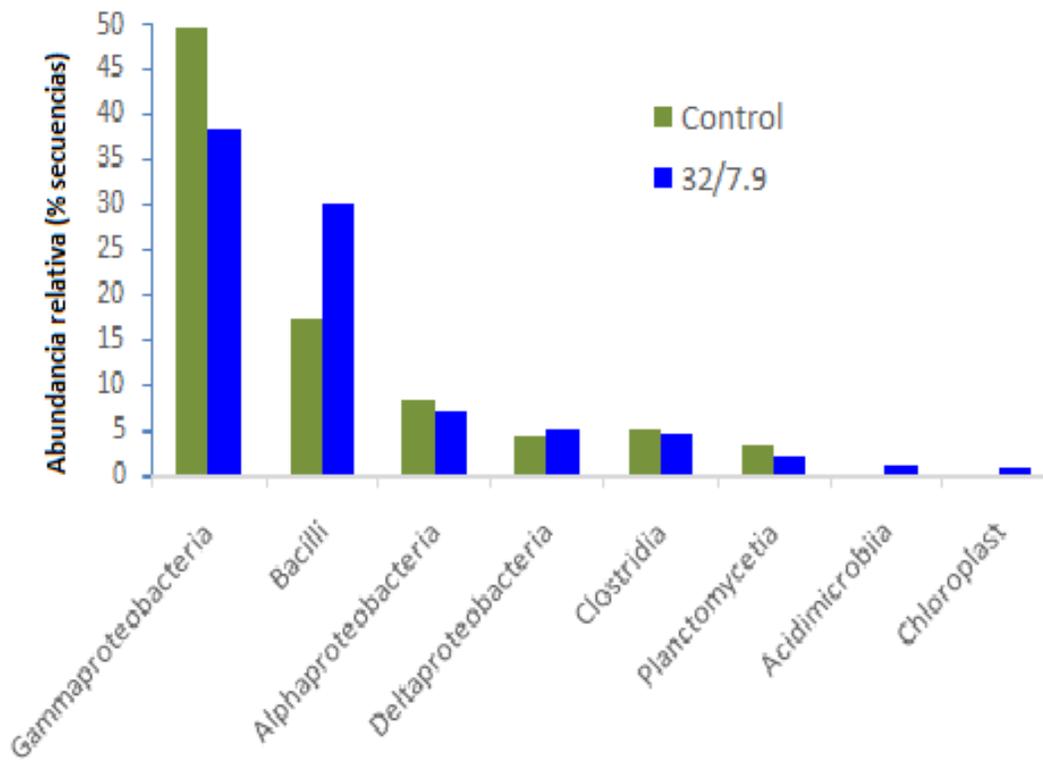
**Figura 13.** Diversidad bacteriana a nivel de género en el biofilm litificado de los diferentes periodos de incubación (Día\_0-Día\_15). A la izquierda el análisis de componentes principales (PCA) escalado a 1; a la derecha el dendrograma de agrupación jerárquica por UPGMA. A) Condición control—temperatura 30°C y pH 8.2; B) Condición con pH bajo =7.9; C) Condición con temperatura elevada = 32°C.

## RESULTADOS

Los mayores cambios en la abundancia relativa entre los clados de la primera (muestras de 0, 1, 3, 7 días de incubación) y de la segunda semana (muestras de 11 y 15 días de incubación) se encontraron en Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Clostridia y Bacilli. Los cambios en la distribución de abundancias a nivel de clase se muestran de acuerdo al tiempo de incubación bajo el efecto combinado de aumento de la temperatura y la disminución de pH contra las condiciones actuales (30°C y pH 8.2) (Figura 14), en donde Gamma-, Alpha-, Delta- y Epsilonproteobacteria, Clostridia, Bacilli, Planctomycetia, Acidimicrobiia y Chloroplasto fueron los grupos más abundantes en la segunda semana. Se encontraron diferencias en la distribución de las clases entre la condición control y la condición con efecto combinado (Figura 15), resaltando el incremento de las clases Bacilli, Acidimicrobiia y de la señal del cloroplasto, bajo el efecto combinado de incremento de temperatura y pH bajo.



**Figura 14.** Distribución de abundancias de las clases más representativas (>1%) de los clados de la primera y la segunda semana, bajo la condición control y la condición con el efecto combinado (pH 7.9/32°C).



**Figura 15.** Distribución de clases en la segunda semana de incubación entre la condición control y la condición con el efecto combinado de pH bajo y temperatura incrementada.

## DISCUSIÓN

La composición mineral muestra que ambos tipos de biofilms encontrados en la colonización de los restos calcáreos de *Acropora palmata* es distinta a la composición del mineral depositado por el coral. El proceso de mineralización de carbonato inducido por la actividad microbiana, distinto a la calcificación que realizan los corales escleractinos, ha sido registrada en muestras paleontológicas de arrecifes (Camoin *et al.*, 1999; Riding & Tomás, 2006). En las cuales el efecto de la mineralización inducida por comunidades microbianas, como costras laminares de grano fino, han sido llamadas cementos, costras microbianas, estromatolitos y microbialitos, y que predominan en las estructuras sedimentarias de facies arrecifales (Camoin *et al.*, 1999; Braissant *et al.*, 2003; Riding & Tomás 2006; Camoin *et al.*, 2007; Riding *et al.*, 2014). Estos carbonatos microbianos producidos por comunidades bacterianas y algas coralinas, han sido reconocidas como un elemento crucial en el desarrollo arrecifal sobre todo para la edificación y estabilización de sustratos calcáreos, como lo son los restos de *A. palmata*. La formación de restos calcáreos se traduce en abrasión, destrucción y transportación de los fragmentos, lo cual finalmente impide su regeneración. Sin embargo, las cavidades entre estos fragmentos, bajo ciertas condiciones, son rellenadas por carbonatos microbianos que logran dar estabilidad a este nuevo sustrato inestable (Camoin *et al.*, 1999; Rasser & Riegl, 2002).

La formación de carbonatos bacterianos sugiere la presencia de un biofilm microbiano adhesivo, que atrapa en una costra la materia orgánica bacteriana y algunos minerales. La superficie de estos biofilms puede atrapar sedimentos y facilitar un medio para la precipitación de  $\text{CaCO}_3$  (Riding, 2011). La costra microbiana se considera el último estado de la formación del arrecife y también la más abundante. En la mayoría de los núcleos obtenidos en las muestras geológicas, la mineralización inducida por la actividad microbiana es el mayor componente estructural y volumétrico en los arrecifes, formando hasta el 80% de la formación rocosa (Camoin *et al.*, 1999; Riding, 2002). Las formas minerales precipitadas por actividad biológica se pueden distinguir de los minerales inorgánicos por su heterogeneidad química y estructural. Especialmente, la calcita puede contener hasta 30%  $\text{MgCO}_3$  y altas cantidades de Na,  $\text{SO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{HCO}_3^-$  (Tucker, 1990). Característica registrada en aguas marinas tropicales poco profundas donde las principales formas minerales en que se presentan los carbonatos son calcita con magnesio (que contiene 14-20% moles de  $\text{MgCO}_3$ ; Perry & Hepburn 2008). El tipo de mineral presente en los carbonatos bacterianos es una mezcla de calcita con alto contenido de magnesio 11-17%  $\text{Mg}^{2+}$

(Dupraz *et al.*, 2009). Por lo tanto, el biofilm litificado identificado creciendo sobre los restos de *A. palmata* (Figura 6b), bien puede resultar en una formación calcárea secundaria originada a partir de la precipitación biológica de carbonatos por la mineralización inducida por la actividad microbiana. Esta nueva formación de carbonatos además permite la resiliencia de un sustrato que los organismos formadores de arrecife, entre ellos los corales y algas coralinas, pueden utilizar para seguir creciendo o en algunos casos recuperarse después de una perturbación.

### **Diversidad microbiana**

Los altos valores de diversidad en las comunidades microbianas asociadas con minerales obtenidos en este estudio han sido previamente registrados en otros estudios sobre comunidades asociadas con la precipitación de carbonatos (Papineau *et al.*, 2005; Ley *et al.*, 2006; Pringault *et al.*, 2008). Incluso, hay evidencia de que, al deteriorarse la estructura coralina por fracturas, blanqueamiento y entrada de nutrientes al sistema, aumenta la riqueza microbiana asociada que coloniza su superficie, y en ocasiones la actividad patogénica de la microbiota (Rohwer *et al.*, 2001), lo cual coincide con el aumento de la diversidad en los biofilms respecto a la diversidad registrada en el tejido sano de *Acropora*.

Este estudio es el primer intento por caracterizar los biofilms que litifican los restos de *A. palmata*. De hecho, la composición a nivel de phylum que se obtuvo en las muestras del tejido sano también coinciden con aquellas registradas previamente en tejido de otros corales vivos (Frias-Lopez *et al.*, 2002; Rohwer *et al.*, 2002; Pantos & Bythell, 2006; Nithyanand & Pandian, 2009). Cabe señalar que la composición bacteriana en el tejido coralino obtenida en estos estudios resulta ser específico a las especies de coral, por lo cual este estudio tiene la ventaja de poder describir el cambio en composición de la comunidad en el tejido sano a la comunidad sobre los biofilms creciendo una vez que el coral ha muerto, ya que los biofilms descritos se desarrollan sobre las ramas fácilmente distinguibles de *A. palmata*.

Por otro lado, tanto la composición bacteriana encontrada en las muestras de agua y en otros tapetes microbianos resultaron ser similares a la composición microbiana en muestras de estos tipos de biotopos (Frias-Lopez *et al.*, 2002, Papineau *et al.*, 2005; Havemann & Foster, 2008; Centeno *et al.*, 2012).

En el biofilm litificado se obtuvo la señal filogenética del cloroplasto de algas verdes y coralinas, las cuales pueden ser relevantes en el proceso de litificación de los fragmentos de *Acropora*. La presencia de algas coralinas, además de esta señal en el 16S rRNA se puede sustentar en la composición mineral del biofilm, ya que calcita y calcita de magnesio son los componentes en los esqueletos calcáreos de estas algas (Stanley et. al., 2002), lo que coincide con otros reportes que muestran a las algas coralinas como constructores de una estructura carbonatada secundaria después de un disturbio que afecta a los corales (Perry & Hepburn, 2008).

### Experimentos de mesocosmos en biofilms litificados

Los resultados del experimento de mesocosmos sugieren que la variación en la composición microbiana es acentuada con el tiempo que pasan los fragmentos en cada una de las condiciones del mesocosmos De tal forma que los biofilms que colonizan los restos de *A. palmata* pueden ser significativamente modificados bajo los posibles escenarios de cambios proyectado para pH y temperatura para el arrecife Mesoamericano de México. La respuesta de los invertebrados marinos y plancton a una concentración elevada de CO<sub>2</sub> ha sido estudiada antes (Hoegh-Guldberg et al., 2007; Newbold et al., 2012; Johnson et al., 2013). Sin embargo, a pesar de la importancia de los microorganismos en la función y salud de los ecosistemas arrecifales, existen escasos estudios publicados sobre el aumento en la concentración de CO<sub>2</sub> y su impacto en estos organismos. En estos estudios se ha observado un aumento en la biomasa de biofilms en condiciones de alta concentración de CO<sub>2</sub>, en conjunto con cambios en la estructura de la comunidad microbiana (Lidbury et al., 2012). También se ha reconocido que grupos específicos en la comunidad microbiana responden a la variación de pH, evidenciado por el decremento de la abundancia de Alfarproteobacteria e incremento de Flavobacteriales (phylum Bacteroidetes) cuando se incrementa la concentración de CO<sub>2</sub> (Witt et al., 2011).

Otros estudios experimentales se han enfocado en el efecto de altas concentraciones de CO<sub>2</sub> en las comunidades bacterianas en mesocosmos marinos mostrando ligeros cambios en la composición microbiana en respuesta a la condición prevista de finales de este siglo de ~1140 ppm de CO<sub>2</sub> (Liu et al., 2010; Witt et al., 2011; Lidbury et al., 2012; Roy et al., 2013). Roy y colaboradores (2013) reportan una respuesta significativa de la estructura bacteriana en comunidades pelágicas a partir de amplicones del gen 16S rRNA obtenidos por secuenciación de

alto rendimiento. Sin embargo, esta respuesta al aumento de pCO<sub>2</sub> se observa solo en algunos taxa con muy baja abundancia en la comunidad. Otros trabajos reportan que no hay cambios significativos en la estructura de la comunidad microbiana (Tanaka *et al.*, 2008; Newbold *et al.*, 2012). Los cambios en la abundancia relativa de algunos filotipos, ha sido registrada en concentraciones de pCO<sub>2</sub> mayores a 400 ppm (Witt *et al.*, 2011). Una composición similar a la obtenida en el presente estudio fue reportada en sedimentos árticos superficiales que fueron expuestos a diferentes concentraciones de CO<sub>2</sub>, en los cuales algunas clases de los phyla Proteobacteria, así como Planctomycetia y algunos amplicones afiliados al cloroplasto, dominaron la comunidad microbiana (Tait *et al.*, 2013). Los experimentos de acidificación en estas comunidades sugieren un cambio en los grupos dominantes, así como en la diversidad bajo condiciones ácidas especialmente para el taxón Acidimicrobiia (Monier *et al.*, 2014). Algunos autores sugieren que los microorganismos asociados con sedimentos ya están adaptados a un bajo pH y a las condiciones fluctuantes debido a las reacciones redox derivadas de la actividad microbiana (Zhu *et al.*, 2006; Joint *et al.*, 2011). De hecho, en las comunidades microbianas la dinámica geoquímica que se establece en los microambientes que forman resulta muy diferente a las condiciones a su alrededor. Por ejemplo, se ha demostrado que la concentración de Ca<sup>2+</sup> en la superficie de microbialitos es mayor hasta por cinco órdenes de magnitud que aquella en el agua circundante (Visscher & Stolz, 2005). Tal ha sido el reto de determinar el efecto de la acidificación sobre las comunidades microbianas, donde la discusión actual plantea la hipótesis de que, dado que los microorganismos ya experimentan variaciones naturales de pH, otros procesos distintos a la calcificación podrían no ser afectados en gran medida (Joint *et al.*, 2011); mientras otros argumentan, basados en el metaanálisis, que las tasas de varios procesos microbianos podrían ser afectados (Liu *et al.*, 2010). La respuesta de la comunidad asociada con los restos litificados de *A. palmata* parece apoyar la hipótesis que predice que las variaciones en pH y temperatura tendrán efectos sobre la comunidad microbiana, ya que en este estudio se registró que la abundancia de los ensamblajes microbianos son sensibles a los cambios en el ambiente, lo cual podría tener consecuencias evolutivas creando un recambio en la abundancia y/o diversidad afectando la estructura de la comunidad en un ambiente de CO<sub>2</sub> y temperatura incrementados, pero finalmente logran adaptarse al cambio y permanecer

En conclusión, este estudio representa el primer intento por caracterizar los biofilms que litifican los restos calcáreos de *A. palmata*, los cuales forman una nueva estructura carbonatada que podría permitir la resiliencia del sustrato, permitiendo el restablecimiento de organismos

## DISCUSIÓN

formadores de arrecife, incluyendo corales y algas coralinas. El análisis de la respuesta de la estructura microbiana a niveles elevados de CO<sub>2</sub> indica diferencias entre las condiciones actuales y aquellas previstas para el futuro cercano, de tal forma que los cambios previstos en el pH y la temperatura parecen relevantes para estos biofilms litificados.

## CONCLUSIONES

Los biofilms implicados en la litificación tienen una composición mineral que incluye aragonita, calcita de magnesio (16% moles  $\text{MgCO}_3$ ) y calcita, mientras que la fase mineral que corresponde al esqueleto de coral es básicamente aragonita.

La composición microbiana de los biofilms que colonizan y litifican los restos calcáreos de *Acropora palmata* en el Caribe mexicano es distinta a las comunidades presentes en cualquier otro biotopo circundante.

La composición microbiana de los biofilms litificados puede persistir bajo escenarios de cambio global, incluyendo alta temperatura y pH bajo, pero la abundancia relativa de sus principales phyla varía.

Los biofilms litificados podrían permanecer como una estructura secundaria sobre los restos de los corales, que finalmente reemplazarían las funciones de los arrecifes de coral.

## PERSPECTIVAS

- Vale la pena explorar a nivel metagenómico la relevancia metabólica potencial con la que las comunidades impactan estos biofilms implicados en procesos de litificación y describir el cambio funcional en respuesta a escenarios de cambio global.
- Resulta fundamental conocer las modificaciones funcionales al ecosistema arrecifal causadas por biofilms litificados que colonizan el sustrato de coral muerto incluyendo: tasas fotosintéticas, tasas de calcificación, flujo de nutrientes, ciclaje de los elementos constitutivos de la materia orgánica. Es muy relevante poder identificar las regiones de aporte de microorganismos que forman el biofilm litificado que está colonizando los restos de coral en el Caribe mexicano. Este estudio indica que la diversidad de estos biofilms es diferente a la encontrada en otras regiones del sistema arrecifal, sin embargo, aún no podemos definir los sitios de ingreso ni las fuentes de ingreso de los microorganismos responsables de la litificación de estas estructuras.
- Los sistemas arrecifales son de los ecosistemas más biodiversos del planeta; no sabemos si los arrecifes en proceso de deterioro y colonización por biofilms litificantes podrán sostener la diversidad biológica de macroorganismos en el arrecife.
- Los arrecifes de coral tienen la capacidad de capturar carbono mediante la precipitación de carbonatos asociados al crecimiento de las colonias coralinas. No sabemos la tasa de descalcificación del coral muerto, y el efecto del biofilm litificante sobre este proceso ecosistémico.

## REFERENCIAS

Ainsworth TD, Thurber RV & Gates RD (2010) The future of coral reefs: a microbial perspective. *Trends Ecol Evol* **25**: 233-240.

Albright R, Mason B, Miller M, & Langdon C (2010) Ocean acidification compromises recruitment success of the threatened Caribbean coral *Acropora palmata*. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**(47): 20400-20404.

Aronson RB & Precht WF (2001) White-band disease and the changing face of Caribbean coral reefs. *Hydrobiologia* **460**: 25-38.

Arp G, Reimer A, Reitner J (2004) Microbialite formation in seawater of increased alkalinity, Satonda Crater Lake, Indonesia - Reply. *Journal of Sedimentary Research* **74**:318-325.

Barott KL, Rodriguez-Brito B, JJanouškovec J, Marhaver KL, Smith JE, Keeling P & Rohwer FL (2011) Microbial diversity associated with four functional groups of benthic reef algae and the reef-building coral *Montastraea annularis*. *Environ. Microbiol.* **13**: 1192–1204.

Bebout BM & Garcia-Pichel F. (1995). UV B-induced vertical migrations of cyanobacteria in a microbial mat. *Applied and Environmental Microbiology* **61**(12): 4215-4222.

Beltrán Y, Centeno CM, García-Oliva F, Legendre P & Falcón LI (2012) N<sub>2</sub> fixation rates and associated diversity (nifH) of microbialite and mat-forming consortia from different aquatic environments in Mexico. *Aquatic Microbial Ecology*, **67**(1):15.

Bhaya D, Schwarz R & Grossman AR (2002) Molecular responses to environmental stress. In *The ecology of cyanobacteria* (pp. 397-442). Springer Netherlands.

Blanchon P, Jones B & Kalbfleisch W (1997) Anatomy of a fringing reef around Grand Cayman: Storm rubble, not coral framework. *J Sediment Res* **67**: 1-16.

Bokulich NA, Subramanian S, Faith JJ, Gevers D, Gordon JI, Knight R, Mills DA & Caporaso JG (2013) Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat Methods* **10**: 57-U11.

Bourne D, Iida Y, Uthicke S & Smith-Keune C (2007) Changes in coral-associated microbial communities during a bleaching event. *The ISME journal* **2**(4): 350-363.

Braissant O, Cailleau G, Dupraz C & Verrecchia AP (2003) Bacterially induced mineralization of calcium carbonate in terrestrial environments: The role of exopolysaccharides and amino acids. *J Sediment Res* **73**: 485-490.

Braissant O, Decho AW, Dupraz C, Glunk C, Przekop KM, Visscher PT (2007) Exopolymeric substances of sulfate-reducing bacteria: Interactions with calcium at alkaline pH and implication for formation of carbonate minerals. *Geobiology* **5**:401-411.

Brasier MD, Green OR, Jephcoat AP, Kleppe AK, Van Kranendonk MJ, Lindsay JF, Steele A, Grassineau NV (2002) Questioning the evidence for Earth's oldest fossils. *Nature* **416**:76-81.

Breitbart M, Hoare A, Nitti A, Siefert J, Haynes M, Dinsdale E, Edwards R, Souza V, Rohwer F, Hollander D (2009) Metagenomic and stable isotopic analyses of modern freshwater microbialites in Cuatro CiEnegas, Mexico. *Environmental Microbiology* **11**:16-34.

Budd AF (2000) Diversity and extinction in the Cenozoic history of Caribbean reefs. *Coral Reefs* **19**: 25-35.

Burne RV & Moore LS (1987) Microbialites organosedimentary deposits of microbial communities. *Palaios* **2**:241-254

Caldeira K, & Wickett ME (2003) Oceanography: anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature* **425**(6956): 365-365.

Camoin GF, Gautret P, Montaggioni LF & Cabioch G (1999) Nature and environmental significance of microbialites in Quaternary reefs: the Tahiti paradox. *Sediment Geol* **126**: 271-304.

Camoin GF, Iryu Y, & McInroy DB (2007). IODP expedition 310 reconstructs sea level, climatic, and environmental changes in the South Pacific during the last deglaciation. *Sci Drilling* **5**: 4-12.

Camoin GF, Searl C, Deschamps P, *et al.* (2012) Reef response to sea-level and environmental changes during the last deglaciation: Integrated Ocean Drilling Program Expedition 310, Tahiti Sea Level. *Geology* **40**: 643-646.

Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, *et al.* (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* **7**: 335-336.

Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh P J ... & Knight R (2011) Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**(Supplement 1): 4516-4522.

Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, *et al.* (2012) Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J* **6**: 1621-1624.

Carpenter SR (1996) Microcosm experiments have limited relevance for community and ecosystem ecology. *Ecology* **77**(3): 677-680.

Carpenter KE, Abrar M, Aeby G, Aronson RB, Banks S, Bruckner A, ... & Wood E (2008) One-third of reef-building corals face elevated extinction risk from climate change and local impacts. *Science* **321**(5888): 560-563.

Centeno CM, Legendre P, Beltran Y, Alcantara-Hernandez RJ, Lidstroem UE, Ashby MN & Falcon LI (2012) Microbialite genetic diversity and composition relate to environmental variables. *FEMS Microbiol Ecol* **82**: 724-735.

Chafetz HS, Buczynski C (1992) Bacterially induced lithification of microbial mats. *Palaios* **7**:277-

Collado-Vides L, Ortegón-Aznar I, Senties-Granados A, Comba-Barrera L & González-González J (1998) Macroalgae of Puerto Morelos reef system, Mexican Caribbean. *Hidrobiológica* **8**(2): 133-143.

Couradeau E, Benzerara K, Moreira D, Gerard E, Kaźmierczak J, Tavera R & López-García P (2011) Prokaryotic and eukaryotic community structure in field and cultured microbialites from the alkaline Lake Alchichica (Mexico). *PLoS One* **6**(12):e28767.

DeLong EF (1992) Archaea in coastal marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**(12):5685-5689.

Doney SC, Fabry VJ, Feely RA & Kleypas JA (2009) Ocean Acidification: The Other CO<sub>2</sub> Problem. *Annu. Rev. Marine. Sci.* **1**:169-92.

Dupraz C, Visscher PT (2005) Microbial lithification in marine stromatolites and hypersaline mats. *Trends in Microbiology* **13**:429-438.

Dupraz C, Reid RP, Braissant O, Decho AW, Norman RS & Visscher PT (2009) Processes of carbonate precipitation in modern microbial mats. *Earth-Sci Rev* **96**: 141-162.

Edgar RC (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **26**: 2460-2461.

Edwards AJ(ed.) (2010). Reef Rehabilitation Manual. Coral Reef Targeted Research & Capacity Building for Management Program: St Lucia, Australia. ii + 166 pp.

Emerson SR, Hedges JI (2008) Chemical oceanography and the marine carbon cycle. Cambridge University Press. New York, US.

Fabry VJ, Seibel BA, Feely RA & Orr JC (2008) Impacts of ocean acidification on marine fauna and ecosystem processes. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil* **65**(3): 414-432.

Falcón LI, Carpenter EJ, Cipriano F, Bergman B & Capone DG (2004) N<sub>2</sub> fixation by unicellular bacterioplankton from the Atlantic and Pacific Oceans: Phylogeny and in situ rates. *Applied and environmental microbiology* **70**(2):765-770.

Feldmann M, McKenzie JA (1998) Stromatolite-thrombolite associations in a modern environment, Lee Stocking Island, Bahamas. *Palaios* **13**:201-212.

Flemming HC & Wingender J (2010) The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* **8**:623.

Frias-Lopez J, Zerkle AL, Bonheyo GT & Fouke BW (2002) Partitioning of bacterial communities between seawater and healthy, black band diseased, and dead coral surfaces. *Appl Environ Microb* **68**: 2214-2228.

Gattuso JP, Allemand D & Frankignoulle M (1999) Photosynthesis and calcification at cellular, organismal and community levels in coral reefs: a review on interactions and control by carbonate

chemistry. *American Zoologist* **39**(1):160-183.

Glunk C, Dupraz C, Braissant O, Gallagher KL, Verrecchia EP, Visscher PT (2011) Microbially mediated carbonate precipitation in a hypersaline lake, Big Pond (Eleuthera, Bahamas). *Sedimentology* **58**:720-738.

Golubic S, Seong-Joo L & Browne KM (2000) Cyanobacteria: architects of sedimentary structures. In *Microbial sediments* (pp. 57-67). Springer Berlin Heidelberg.

Grotzinger JP, Knoll AH (1999) Stromatolites in Precambrian carbonates: Evolutionary mileposts or environmental dipsticks? *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* **27**:313-358.

Havemann SA & Foster JS (2008) Comparative Characterization of the Microbial Diversities of an Artificial Microbialite Model and a Natural Stromatolite. *Appl Environ Microb* **74**: 7410-7421.

Hoegh-Guldberg O, Mumby PJ, Hooten AJ, *et al.* (2007) Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. *Science* **318**: 1737-1742.

Hofmann HJ (2000) Archean stromatolites as microbial archives. *Microbial Sedim* 315-327.

Jansson, C., & Northen, T. (2010). Calcifying cyanobacteria—the potential of biomineralization for carbon capture and storage. *Current Opinion in Biotechnology*, **21**(3), 365-371.

Johnson VR, Brownlee C, Rickaby REM, Graziano M, Milazzo M & Hall-Spencer JM (2013) Responses of marine benthic microalgae to elevated CO<sub>2</sub>. *Mar Biol* **160**: 1813-1824.

Joint I, Doney SC & Karl DM (2011) Will ocean acidification affect marine microbes? *ISME J* **5**: 1-7.

Kawaguchi T & Decho AW (2002). A laboratory investigation of cyanobacterial extracellular polymeric secretions (EPS) in influencing CaCO<sub>3</sub> polymorphism. *Journal of Crystal Growth*, **240**(1): 230-235.

Kunin V, Engelbrektson A, Ochman H & Hugenholtz P (2010) Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environmental microbiology* **12**(1): 118-123.

Lau SC, Thiyagarajan V, Cheung SC., & Qian PY (2005) Roles of bacterial community composition in biofilms as a mediator for larval settlement of three marine invertebrates. *Aquatic Microbial Ecology*, **38**(1): 41-51.

Le Quéré C & Metzl N (2004) Natural processes regulating the ocean uptake of CO<sub>2</sub>. *The Global Carbon Cycle: Integrating Humans, Climate, and the Natural World*, 62, 243.

Legendre P, Legendre L. *Numerical Ecology*. Amsterdam: Elsevier Science BV, 1998.

Ley RE, Harris JK, Wilcox J, Spear JR, Miller SR, Bebout BM, Maresca JA, Bryant DA, Sogin ML & Pace NR (2006) Unexpected diversity and complexity of the Guerrero Negro hypersaline microbial mat. *Appl Environ Microb* **72**: 3685-3695.

Lidbury I, Johnson V, Hall-Spencer JM, Munn CB & Cunliffe M (2012) Community-level response of coastal microbial biofilms to ocean acidification in a natural carbon dioxide vent ecosystem. *Mar Pollut Bull* **64**: 1063-1066.

Liu J, Weinbauer MG, Maier C, Dai M & Gattuso J-P (2010) Effect of ocean acidification on microbial diversity and on microbe-driven biogeochemistry and ecosystem functioning. *Aquat Microb Ecol* **61**, 291-305.

Magoc T & Salzberg SL (2011) FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* **27**: 2957-2963.

Mata SA, Bottjer DJ (2012) Microbes and mass extinctions: paleoenvironmental distribution of microbialites during times of biotic crisis. *Geobiology* **10**:3-24.

Merino M & Otero L (1991) Atlas Ambiental Costero, Puerto Morelos-Quintana Roo, Centro de Investigaciones de Quintana Roo, Chetumal, Mexico.

Metzker ML (2010) Sequencing technologies—the next generation. *Nature reviews genetics* **11**(1): 31-46.

Moir JW & Wood NJ (2001) Nitrate and nitrite transport in bacteria. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **58**(2): 215-224.

Monier A, Findlay HS, Charvet S *et al.* (2014) Late winter under ice pelagic microbial communities in the high Arctic Ocean and the impact of short-term exposure to elevated CO<sub>2</sub> levels. *Front Microbiol* **5**:490.

Muller EM, Rogers CS, Spitzack AS, & Van Woesik R (2008) Bleaching increases likelihood of disease on *Acropora palmata* (Lamarck) in Hawksnest Bay, St John, US Virgin Islands. *Coral Reefs*, **27**(1): 191-195.

Myshrall KL, Mobberley JM, Green SJ, Visscher PT, Havemann SA, Reid RP, Foster JS (2010) Biogeochemical cycling and microbial diversity in the thrombolitic microbialites of Highborne Cay, Bahamas. *Geobiology* **8**:337-354.

Newbold LK, Oliver AE, Booth T, Tiwari B, DeSantis T, Maguire M, Andersen G, van der Gast CJ & Whiteley AS (2012) The response of marine picoplankton to ocean acidification. *Environ Microbiol* **14**: 2293-2307.

Nithyanand P & Pandian SK (2009) Phylogenetic characterization of culturable bacterial diversity associated with the mucus and tissue of the coral *Acropora digitifera* from the Gulf of Mannar. *FEMS Microbiol Ecol* **69**: 384-394.

Omoregie EO, Crumbliss LL, Bebout BM, Zehr JP (2004) Comparison of diazotroph community structure in *Lyngbya* sp and *Microcoleus chthonoplastes* dominated microbial mats from Guerrero Negro, Baja, Mexico. *Fems Microbiology Ecology* **47**:305-318.

Orr JC, Fabry VJ, Aumont O, Bopp L, Doney SC, Feely RA ... & Yool A (2005) Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature* **437**(7059):681-686.

Pace NR, Stahl DA, Lane DJ & Olsen GJ (1986) The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. In *Advances in microbial ecology* (pp.1-55). Springer US.

Paerl HW, Pinckney JL & Stepe TF (2000). Cyanobacterial-bacterial mat consortia: examining the functional unit of microbial survival and growth in extreme environments. *Environmental Microbiology* **2**:11-26.

Paerl HW (2001) Bacterially mediated precipitation in marine Stromatolites. *Environmental Microbiology* **3**(2):123-30.

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. *Dis Aquat Organ* **69**: 79-88.

Papineau D, Walker JJ, Mojzsis SJ & Pace NR (2005) Composition and structure of microbial communities from stromatolites of Hamelin Pool in Shark Bay, Western Australia. *Appl Environ Microb* **71**: 4822-4832.

Pedley M (1992) Freshwater (phytoherm) reefs: the role of biofilms and their bearing on marine reef cementation. *Sediment Geol.* **79**:255-274.

Perry RS, McLoughlin N, Lynne BY, Sephton MA, Oliver JD, Perry CC, Campbell K, Engel MH, Farmer JD, Brasier MD, Staley JI (2007) Defining biominerals and organominerals: Direct and indirect indicators of life. *Sedimentary Geology* **201**:157-179.

Perry CT & Hepburn LJ (2008) Syn-depositional alteration of coral reef framework through bioerosion, encrustation and cementation: Taphonomic signatures of reef accretion and reef depositional events. *Earth-Sci Rev* **86**: 106-144.

Perri E, Tucker M (2007) Bacterial fossils and microbial dolomite in Triassic stromatolites. *Geology* **35**:207-210.

Price MN, Dehal PS, Arkin AP (2010) FastTree 2—approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One* **5**:e9490.

Pringault O, Duran R, Jacquet S & Torreton J-P (2008) Temporal variations of microbial activity and diversity in marine tropical sediments (New Caledonia lagoon). *Microbial Ecol* **55**: 247-258.

Qian PY, Lau SC, Dahms HU, Dobretsov S, & Harder T (2007) Marine biofilms as mediators of colonization by marine macroorganisms: implications for antifouling and aquaculture. *Marine Biotechnology*, **9**(4): 399-410.

Quail MA, Smith M, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR ... & Gu Y (2012) A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina

MiSeq sequencers. *BMC genomics* **13**(1):341.

Rasser MW & Riegl B (2002) Holocene coral reef rubble and its binding agents. *Coral Reefs* **21**: 57-72.

Ritchie KB (2006) Regulation of microbial populations by coral surface mucus and mucus-associated bacteria. *Marine Ecology Progress Series*, **322**: 1-14.

Reid RP, Visscher PT, Decho AW, Stolz JF, Bebout BM, Dupraz C, Macintyre LG, Paerl HW, Pinckney JL, Prufert-Bebout L, Stegge TF, DesMarais DJ (2000) The role of microbes in accretion, lamination and early lithification of modern marine stromatolites. *Nature* **406**:989-992.

Riding R (2000) Microbial carbonates: the geological record of calcified bacterial-algal mats and biofilms. *Sedimentology* **47**: 179-214.

Riding R (2002) Biofilm architecture of Phanerozoic cryptic carbonate marine veneers. *Geology* **30**: 31-34.

Riding R (2011). Reefal microbial crusts. In: Hopley D (ed.). *Encyclopedia of Modern Coral Reefs: Structure, Form and Process*, Springer Netherlands. pp. 911-915.

Riding R & Tomas S (2006) Stromatolite reef crusts, Early Cretaceous, Spain: bacterial origin of in situ-precipitated peloid microspar? *Sedimentology* **53**: 23-34.

Riding R, Liang L & Braga JC (2014) Millennial-scale ocean acidification and late Quaternary decline of cryptic bacterial crusts in tropical reefs. *Geobiology* **12**: 387-405.

Rodriguez-Martinez RE, Ruiz-Renteria F, van Tussenbroek B, Barba-Santos G, Escalante-Mancera E, Jordan-Garza G & Jordan-Dahlgren E (2010) Environmental state and tendencies of the Puerto Morelos CARICOMP site, Mexico. *Rev Biol Trop* **58**: 23-43.

Rodríguez-Martínez RE, Banaszak AT, McField MD, Beltran-Torres AU & Alvarez-Filip L (2014) Assessment of *Acropora palmata* in the mesoamerican reef system. *PloS one* **9**(4): e96140.

Rohwer F, Breitbart M, Java J, Azam F, Knowlton N (2001) Microbial diversity of scleractinian corals. *Coral Reefs* **20**(1): 85-95.

Rohwer F, Seguritan V, Azam F & Knowlton N (2002) Diversity and distribution of coral-associated bacteria. *Mar Ecol-Prog Ser* **243**: 1-10.

Roy AS, Gibbons SM, Schunck H, *et al.* (2013) Ocean acidification shows negligible impacts on high-latitude bacterial community structure in coastal pelagic mesocosms. *Biogeosciences* **10**: 555-566.

Ruíz-Rentería F, Van Tussenbroek BI & Jordán-Dahlgren E (1998). Puerto Morelos, Quintana Roo, Mexico, p 57-66. In B.J. Kjerfve (ed.). *CARICOMP-Caribbean Coral Reef, Seagrass and Mangrove Sites*. UNESCO, Paris.

Sabine CL, Heimann M, Artaxo P, Bakker DC, Chen CT, Field CB, ... & Valentini R. (2004) Current

status and past trends of the global carbon cycle. The global carbon cycle: integrating humans, climate, and the natural world (pp. 17-44) Island Press.

Schopf JW, Kudryavtsev AB, Czaja AD, Tripathi AB (2007) Evidence of archean life: Stromatolites and microfossils. *Precambrian Research* **158**:141-155.

Shapiro RS (2004) Recognition of fossil prokaryotes in cretaceous methane seep carbonates: Relevance to astrobiology. *Astrobiology* **4**:438-449.

Soetaert K, Hofmann AF, Middelburg JJ, Meysman FJR, Greenwood J (2007) The effect of biogeochemical processes on pH. *Marine Chemistry* **105**:30-51.

Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, Mark Welch D, Huse SM, Neal PR, Arrieta JM & Herndl GJ (2006) Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *PNAS* **103**: 12115-12120.

Stal LJ (2000) Cyanobacterial Mats and Stromatolites. En: BA Whitton and M Potts (eds). The ecology of cyanobacteria. 61-120. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.

Stal LJ (2012) Cyanobacterial mats and stromatolites. Pp: 61-120. En: The ecology of Cyanobacteria II, their diversity in time and space. B.A. Whitton (ed). Springer Science+Business Media B.V.

Stanley SM, Ries JB, Hardie LA (2002) Low-magnesium calcite produced by coralline algae in seawater of Late Cretaceous composition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:15323–6.

Stewart RI, Dossena M, Bohan DA, Jeppesen E, Kordas RL, Ledger ME, ... & Suttle B (2013) Mesocosm experiments as a tool for ecological climate-change research. *Adv. Ecol. Res* **48**:71-181.

Stolz JF (2000) Structure of microbial mats and biofilms. Pp 1-8. En: Microbial Sediments (Riding, R. E y S. M. Awramik eds) Springer. New York.

Tait K, Laverock B, Shaw J, Somerfield PJ & Widdicombe S (2013) Minor impact of ocean acidification to the composition of the active microbial community in an Arctic sediment. *Environ Microbiol Reports* **5**: 851-860.

Tanaka T, Thingstad TF, Lovdal T, *et al.* (2008) Availability of phosphate for phytoplankton and bacteria and of glucose for bacteria at different pCO<sub>2</sub> levels in a mesocosm study. *Biogeosciences* **5**: 669-678.

Thornborough KJ & Davies PJ (2011). Reef flats. . In: Hopley D (ed.). *Encyclopedia of Modern Coral Reefs: Structure, Form and Process*, Springer Netherlands. pp. 869-876.

Tucker ME, Bathurst RG (eds). *Carbonate Diagenesis*, Vol. 1. Oxford:Blackwell Scientific Publications, 1990.

Valdespino-Castillo PM, Alcántara-Hernández RJ, Alcocer J, Merino-Ibarra M, Macek M & Falcón LI (2014) Alkaline phosphatases in microbialites and bacterioplankton from Alchichica soda lake, Mexico. *FEMS microbiology ecology* **90**(2):504-519.

Visscher PT & Stolz JF (2005) Microbial mats as bioreactors: populations, processes, and products. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **219**(1): 87-100.

Walther GR (2010) Community and ecosystem responses to recent climate change. *Phil.Trans. R. Soc. B* **365**: 2019–2024.

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

Ward DM, Ferris MJ, Nold SC & Bateson MM (1998) A natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial mat communities. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**(4): 1353-1370.

Westphal H, Heindel K, Brandano M & Peckmann J (2010) Genesis of microbialites as contemporaneous framework components of deglacial coral reefs, Tahiti (IODP 310). *Facies* **56**: 337-352.

Witt V, Wild C, Anthony KRN, Diaz-Pulido G & Uthicke S (2011) Effects of ocean acidification on microbial community composition of, and oxygen fluxes through, biofilms from the Great Barrier Reef. *Environ Microbiol* **13**: 2976-2989.

Woese CR (1987) Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**: 221–271.

Zani S, Mellon MT, Collier JL & Zehr JP (2000) Expression of nifH genes in natural microbial assemblages in Lake George, New York, detected by reverse transcriptase PCR. *Applied and environmental microbiology* **66**(7): 3119-3124.

Zhou JZ, Bruns MA & Tiedje JM (1996) DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microb* **62**: 316-322.

Zhu Q, Aller RC & Fan Y (2006) Two-dimensional pH distributions and dynamics in bioturbated marine sediments. *Geochim Cosmochim Ac* **70**: 4933-4949.

## ANEXO I

### Mezcla de la reacción de PCR

Agua grado molecular	15.67 $\mu\text{L}$
Buffer 10x Takara	2.5 $\mu\text{L}$
dNTPs Takara	2 $\mu\text{L}$
BSA	0.7 $\mu\text{L}$
Primer Forward (10 $\mu\text{M}$ )	1 $\mu\text{L}$
Primer reverse (10 $\mu\text{M}$ )	1 $\mu\text{L}$
Taq polimerasa (Takara)	0.125 $\mu\text{L}$
DNA	2 $\mu\text{L}$
<b>Volumen final</b>	<b>25 <math>\mu\text{L}</math></b>

### Condiciones del termociclador

Temperatura	Tiempo	
95°C	3 min	
95°C	30 s	} 35 ciclos
52°C	40 s	
72°C	90 s	
72°C	12 min	
4°C	$\infty$	

## ANEXO II

#El comando que se usa para formar los otus una vez que USEARCH ha sido descargado  
pick\_otus.py -i secuencias.fna -m usearch --word\_length 64 --suppress\_reference\_chimera\_detection --  
minsize 2 -o usearch\_qf\_results\_no\_ref\_chim\_detection/

#Para agrupar y asignar OTUs. El archivo parámetros tiene la ruta donde se encuentra la base de datos.  
pick\_de\_novo\_otus.py -i secuencias.fna -o denovo\_otus -p ../ruta//parametros.txt

#Descartar todos los grupos con menos de dos secuencias  
filter\_otus\_from\_otu\_table.py -i otu\_table.biom -o otu\_table\_no\_singletons.biom -n 2

#Información de los OTUs en cada muestra  
biom summarize-table -i otu\_table\_no\_singletons.biom -o nonsin\_summary

#Paquete de diversidad básico  
core\_diversity\_analyses.py -i otu\_table\_no\_singletons.biom -o core\_output -m mappingfile.txt -c  
descriptor1,descriptor2,descriptor3 -t rep\_set.tre -e #(rarefaccion)

#Separar un "otu table" por taxonomía y hacer los análisis al nivel taxonómico de phylum (L2) con un  
archivo sin los singletons  
split\_otu\_table\_by\_taxonomy.py -i otu\_table\_no\_singletons.biom -L 2 -o split\_L2

#Información sobre el número de secuencias en cada muestra para determinar el límite de rarefacción.  
biom summarize-table -i otu\_table\_Cyanobacteria.biom -o summary

#Comparación entre comunidades  
compare\_categories.py --method anosim -i unweighted\_unifrac\_dm.txt -m mappingfile.txt -c  
Descriptor -o anosim\_file

#hace un compendio de los taxa en matrices de proporciones en los archivos L2-L6.txt  
summarize\_taxa\_through\_plots.py -o taxa\_summary -i otu\_table\_no\_singletons.biom -m  
mappingfile.txt

# Cortar el archivo ".biom" de acuerdo a algún descriptor  
split\_otu\_table.py -i otu\_table\_no\_singletons.biom -m mappingfile.txt -f Descriptor -o by\_Descriptor

#Separar un set de secuencias específicas de un fasta  
filter\_fasta.py -f secuencias.fna -o secuencias\_especificas.fna --sample\_id\_fp  
IDs\_secuencias\_especificas.txt

# Detectar las chimeras. Usando el archivo "secuencias.fasta" con el alineamiento (pynast directory). El tiempo depende del número de secuencias, pero puede tardar algunas horas.  
identify\_chimeric\_seqs.py -m ChimeraSlayer -i seqs\_rep\_set\_aligned.fasta -a ../ruta/85\_otus.fasta -o chimeric\_seqs\_cs.txt

# Remover del archivo ".biom" las chimeras detectadas  
filter\_otus\_from\_otu\_table.py -i otu\_table.biom -o otu\_table\_non\_chimeric.biom -e chimeric\_otus.txt

# Filtrar de las secuencias representativas los IDs de las chimeras  
filter\_fasta.py -f rep\_set.fasta -o non\_chimeric\_seqs.fna -s chimeric\_seq.txt -n

# Recortar un árbol incluyendo solo los OTUs que se encuentran en el archivo FASTA elegido (el que no tiene chimeras)  
filter\_tree.py -i rep\_set.tre -f non\_chimeric\_seqs.fna -o rep\_set\_NCHfilter.tre

# Obtener métricas de diversidad  
alpha\_diversity.py -i table\_even#(rarefaction).biom -m chao1,simpson,shannon,equitability,ACE,observed\_species,goods\_coverage -o adiv\_all.txt

## RESEARCH ARTICLE

# Microbial composition of biofilms associated with lithifying rubble of *Acropora palmata* branches

Yislem Beltrán<sup>1</sup>, Daniel Cerqueda-García<sup>1</sup>, Neslihan Taş<sup>2</sup>, Patricia E Thomé<sup>3</sup>, Roberto Iglesias-Prieto<sup>3</sup> and Luisa I. Falcón<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Ecología Bacteriana, Instituto de Ecología, UNAM, DF, México, 04510, <sup>2</sup>Lawrence Berkeley National Laboratory, Earth & Environmental Sciences, Ecology Department, Berkeley, CA 94720, USA and <sup>3</sup>Unidad Académica de Sistemas Arrecifales, Puerto Morelos, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM Ado. Post. 1152, Cancun, QR, México, 77500

\*Corresponding author: Cto ext sn, Cd Universitaria, Mexico, DF, Mexico, 04510. Tel: +52-55-5622-9060; Fax: +52-55-5622-8995;

E-mail: [falcon@ecologia.unam.mx](mailto:falcon@ecologia.unam.mx)

**One sentence summary:** The composition of lithifying biofilms associated with *Acropora palmata* coral rubble differed under conditions of elevated temperature and decreased pH.

Editor: Julie Olson

## ABSTRACT

Coral reefs are amongst the most productive ecosystems on the planet, but are rapidly declining due to global warming-mediated changes in the oceans. Particularly for the Caribbean region, *Acropora* sp. stony corals have lost ~80% of their original coverage, resulting in vast extensions of dead coral rubble. We analysed the microbial composition of biofilms that colonize and lithify dead *A. palmata* rubble in the Mexican Caribbean and identified the microbial assemblages that can persist under scenarios of global change, including high temperature and low pH. Lithifying biofilms have a mineral composition that includes aragonite and magnesium calcite (16 mole% MgCO<sub>3</sub>) and calcite, while the mineral phase corresponding to coral skeleton is basically aragonite. Microbial composition of the lithifying biofilms are different in comparison to surrounding biotopes, including a microbial mat, water column, sediments and live *A. palmata* microbiome. Significant shifts in biofilm composition were detected in samples incubated in mesocosms. The combined effect of low pH and increased temperature showed a strong effect after 2-week incubations for biofilm composition. Findings suggest that lithifying biofilms could remain as a secondary structure on reef rubble possibly impacting the functional role of coral reefs.

**Keywords:** *Acropora palmata*; microbial carbonates; lithifying biofilms; global warming; pH; genetic diversity

## INTRODUCTION

Coral reefs are formed by calcium carbonate skeletons secreted by stony corals, and are amongst the most productive ecosystems on the planet. However, they are declining rapidly due to a combination of environmental change, overfishing, coral diseases and ocean acidification (Hoegh-Guldberg et al. 2007). Particularly in the Caribbean region, *Acropora* spp. stony corals used to be the most abundant and most important species in

terms of accretion of reef structure. However, since the early 1980s, *Acropora* spp. have suffered an excessive loss of individuals in several areas of the Caribbean (Aronson and Precht 2001), particularly due to disease, bleaching and storms (Rodríguez-Martínez, Banaszak and Jordan-Dahlgren 2001; Patterson et al. 2002; Precht et al. 2002; Williams and Miller 2005). Despite fossil record evidence that coral reefs have had cycles of high diversity and extinction associated with large-scale environmental perturbations since the early Cambrian (Budd 2000),

paleontological data suggest that accelerated mortality of *Acropora* spp. has not been significant since their first fossil record dated in the Late Oligocene (Budd 2000; Aronson and Precht 2001), up until two decades ago (Rodríguez-Martínez et al. 2014).

Paleobiological studies indicate that coral reef taphonomy (post-mortem history of biological material including skeletal) is of importance since carbonate skeleton is altered via physical, chemical and biological processes that impact its composition and preservation (Greenstein and Pandolfi 2003). Coral reefs form wide ridges of reef rubble in highly disturbed areas. This rubble is often composed of material derived from the dead branches of colonial coral (in the case of *A. palmata*) that originates from the reef front. It has been suggested that when coral is broken on the reef front, it can accumulate *in situ* and then can be transported to form rubble ridges in the reef lagoon, resulting in a permanent cycle of coral destruction and regeneration (Blanchon, Jones and Kalbfleisch 1997). This cycle will produce structures that are built up by successive layers of coral rubble over thousands of years (Blanchon, Jones and Kalbfleisch 1997; Thornborough and Davies 2011). Lithification by either biological or physical cement that stabilizes a secondary reef structure is involved in the composition and preservation of rubble (Rasser and Riegl 2002).

Although coral reefs are one of the most important and oldest carbonate frameworks in the world, bacterial carbonates (e.g. stromatolites) were important reef builders long before eukaryotes appeared (Hofmann 2000). Prokaryotes can induce carbonate precipitation by their metabolic activity (Dupraz et al. 2009). Metabolisms that induce mineral precipitation in bacteria are sulfate reduction, denitrification, urea hydrolysis (Visscher, Reid and Bebout 2000; Hammes et al. 2003; Fujita et al. 2008) and photosynthesis (Arp, Reimer and Reitner 2001). Carbonate precipitation can also be influenced by passive organic interaction between the geochemical environment and bacteria (Dupraz et al. 2009). Microbial calcification often takes place in a biofilm of layers of organic matter (extracellular polymeric substances) attached to substrates that contain a variety of bacteria within a

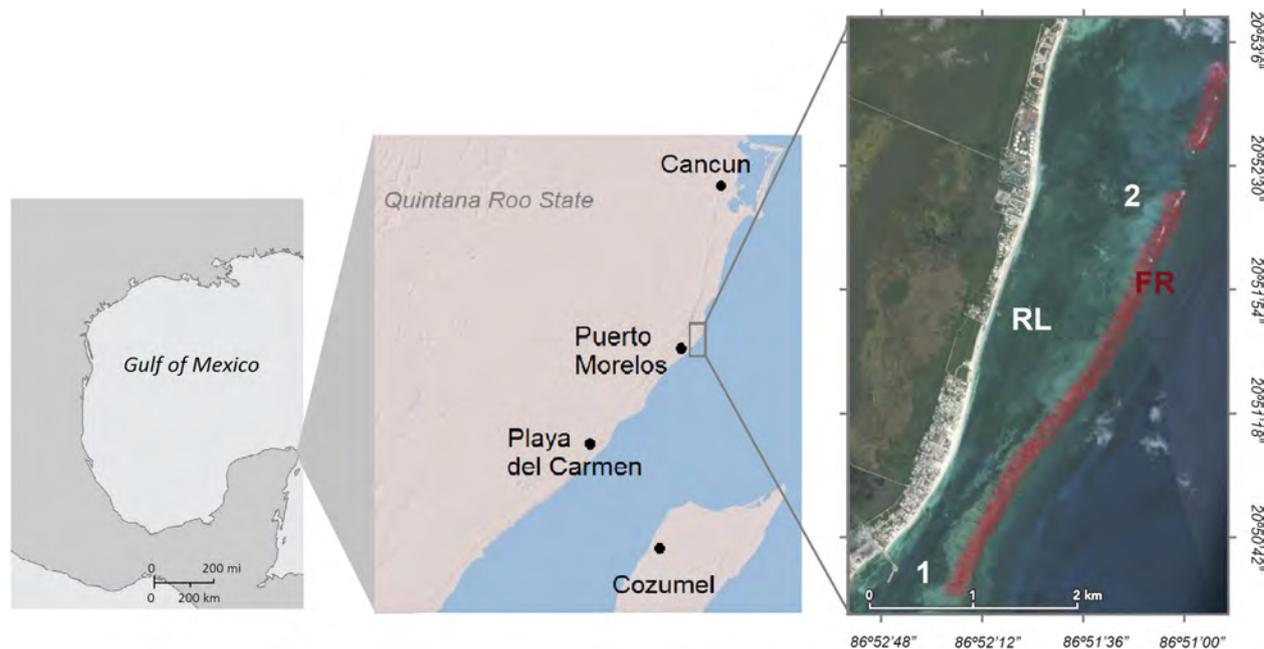
matrix of degrading organic matter, where it can be an important binding or cementing agent (Riding 2000). The fossil record indicates that numerous coral reef frameworks are formed by large volumes of bacterial crust (Westphal et al. 2010) some of which persist today in tropical shallow-water reefs (Camoin et al. 2012). These reef-bacterial crusts have been called cements, stromatolites and microbialites, and are mainly composed of magnesium calcite (Riding, Liang and Braga 2014), playing an important role in reef development not only by contributing a significant amount of carbonate to the primary reef structure but also by aiding in the stabilization and binding of the reef framework. Calcareous encrusting communities can influence preservation of a primary framework built by corals, developing a secondary reef framework (Perry and Hepburn 2008).

After the great decline of reef-building *A. palmata* in the Mexican Caribbean, dead coral rubble colonized by microbial communities is a common occurrence. Although microbial lithification may be relevant in the reef, its role in binding of rubble and healthy coral tissue has not yet been described (Ainsworth, Thurber and Gates 2010). This study presents the first survey of biofilms that grow and cement *A. palmata* rubble, and microbial aggregates inhabiting seawater and liquid-solid interface biotopes associated with rubble ridges in the Mexican Caribbean. Biofilms growing and cementing *A. palmata* rubble are described following a high-throughput 16S rRNA itag-MiSeq sequencing strategy to identify the microbial assemblages that may prevail under scenarios of global change (Caporaso et al. 2010), represented in different mesocosm systems, including the isolated and combined effects of high temperature and low pH at different incubation times.

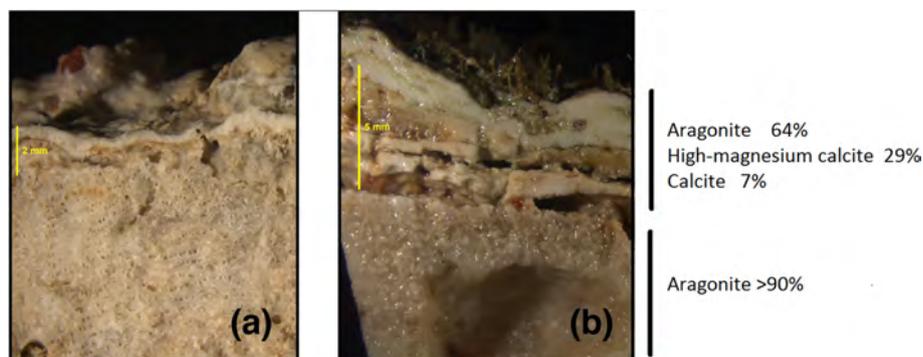
## MATERIALS AND METHODS

### Study area and sampling

Puerto Morelos is located 32 km south of Cancun, Mexico, 20° 48'–20° 52' N and 86° 51'–86° 55' W (Fig. 1). The barrier reef runs



**Figure 1.** Geographical location of study area in the Puerto Morelos reef system on the eastern coast of the Yucatan Peninsula, Mexico. RL: reef lagoon; 1: lagoon sampling station of different biotopes; 2: lagoon sampling site 'La Bocana'; FR: fringing reef.



**Figure 2.** Stereomicroscopic images representing Stage 1 (a) and Stage 2, lithified (b) biofilms growing on *A. palmata* rubble collected from the Puerto Morelos reef, Mexico. Mineral composition of biofilms and coral obtained with X-ray diffraction is shown.

along the entire coastline with a length of 15 km, and is part of the Mesoamerican Barrier Reef. The reef lagoon has a width of 550–1500 m and 3–5 m depth. Lagoon seawater is oligotrophic with low nitrite ( $0.06 \mu\text{g-at L}^{-1}$ ), nitrate ( $13.9 \mu\text{g-at L}^{-1}$ ) and phosphate ( $0.46 \mu\text{g-at L}^{-1}$ ). Salinity varies little throughout the year (35.8 to 36.2 ups). The average value of registered alkalinity is  $2.5 \text{ mEq L}^{-1}$ , and pH of 8.3; average surface water temperature ranges between 25.1 and 29.9°C (Merino and Otero 1991). The dry and rainy seasons are not clearly defined and the hurricane season extends from June through November (Rodríguez-Martínez et al. 2010).

In June 2013 *Acropora palmata* rubble, undergoing two different stages of biofilm growth (Fig. 2) (Stage 1, biofilm without lithification; Stage 2, lithified biofilm) were collected from the reef lagoon in Puerto Morelos (~5 m depth). Biofilms were collected by apnea with hammer and chisel and brought back to the laboratory in a cooler. Samples of ~5 cm<sup>2</sup> of the uppermost surface of the rubble were stored at -20°C in the laboratory. Stage 1 biofilm is a microbial aggregate growing on *A. palmata* carbonate substrate, where calcified biofilm is thinner and cementation of the rubble is weak. Stage 2 biofilm exhibits a complex structure, with a strong degree of cementation that binds rubble together. Samples of different biotopes adjacent to *A. palmata* rubble were collected to analyse their microbial diversity and compared to rubble biofilms, including sediment, overlying seawater, a microbial mat and live tissue of *A. palmata*. Sediment samples were collected in triplicate with 10 cm cores adjacent (30–60 cm) to sampled rubble and stored in sterile bags. Seawater overlying the rubble was collected in triplicate with sterile 1 L containers. A microbial mat growing in proximity to the sampled area was also collected in triplicate with sterile 10 cm cores. A sample of *A. palmata* tissue was collected by removing ~2 cm<sup>2</sup> of the uppermost 1 cm of a coral colony with a sterile chisel. Samples were kept in sterile containers in darkness and frozen at -20°C until analysis. Rubble was analysed using a stereomicroscope to identify structural differences between Stage 1 and 2 biofilms, at the Institute of Biology, UNAM. Mineral characterization of biofilms on rubble and *A. palmata* skeleton was obtained by powder X-ray diffraction (Empyrean, PANalytical B.V.) at the Institute of Geology, UNAM.

### DNA extraction

Total environmental DNA was extracted from each type of sample ( $n = 6$  per biofilms,  $n = 3$  per biotope described above) following the protocol of Zhou, Bruns and Tiedje (1996) with modifications. We used a homogenized mixture of 5 g for each

sample, which was pulverized on ceramic mortars with liquid nitrogen and 9 mL of extraction buffer (100 mM Tris-HCl, 1.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 100 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8). The freeze-thaw and continuous maceration cycle was repeated three times. Samples were incubated for 30 min at 37°C with lysozyme ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$  final concentration), cetyltrimethylammonium bromide (CTAB 6%) and left overnight at 55°C with a volume of 20% sodium dodecyl sulphate (SDS) and proteinase K ( $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$  final concentration). Samples were extracted twice with phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) and once with chloroform, recovering the supernatant after each centrifugation (8000 r.p.m. for 20 min). DNA was precipitated by addition of 0.6 volume of chilled absolute ethanol, 1/10 volume of 3 M sodium acetate and refrigerated at -20°C overnight. DNA was recovered by centrifugation (3500 g for 20 min) and the pellet was washed with 70% ethanol (all reagents came from Sigma-Aldrich, St Louise, MO, USA). The DNA pellet was further purified with a DNeasy Blood & Tissue kit following the protocol of the manufacturer (Qiagen) and resuspended in molecular grade water. Water samples were thawed and filtered through Durapore membranes ( $0.22 \mu\text{m}$ ) (Millipore). DNA from filters was extracted as described above.

### Mesocosms

In order to assess the response of biofilms to changes in temperature and pH we used a mesocosm system. Fragments of lithified biofilm-covered *A. palmata* rubble were collected in August 2013 in the Puerto Morelos reef as described above. The sampling site is known as 'La Bocana' ( $20^\circ 52' 20.92'' \text{ N}$ ,  $86^\circ 51' 12.52'' \text{ W}$ ), and represents an area where extensive colonization of *A. palmata* rubble with lithified biofilms occurs. Samples were transported immediately after collection to the mesocosm system, which consisted of four 60 L capacity open top tanks, screened with several layers of netting to remove 75% of natural illumination. The mesocosm system was designed as follows: control: re-creating the temperature (30°C) and pH (8.2) of the seawater in the sampling site; high temperature: increased temperature by 2°C, control pH value of 8.2; low pH: decrease in pH to 7.9, control temperature of 30°C; combined: high temperature (32°C), low pH (7.9). Triplicate samples of 5 cm<sup>2</sup> of the uppermost surface of the incubated fragments were taken for each treatment at several time points: at the beginning of the experiment (immediately after leaving them in tanks) and after 1, 3, 7, 11 and 15 days of incubation. Total DNA for these samples was extracted as described above. pH in mesocosms was adjusted by bubbling CO<sub>2</sub> into flowing seawater, and temperature was controlled using a

recirculating chiller, until reaching experimental values (pH 7.9,  $p\text{CO}_2 = 890$  p.p.m.; pH 8.2,  $p\text{CO}_2 = 390$  p.p.m.). Both parameters were monitored with an AquaController System (Neptune Systems, San Jose, CA, USA).

### 16S rRNA gene amplification and sequencing

A 420 bp fragment including the V4 hypervariable region of the 16S rRNA gene was PCR-amplified following the protocol of Caporaso et al. (2012) for paired-end community sequencing using universal primers 515F/806R for Bacteria and Archaea. PCR for each sample had a specific Golay reverse primer (Caporaso et al. 2010). DNA concentration was calculated from each sample with a Qubit dsDNA HS assay (Invitrogen), and  $\sim 2$  ng  $\mu\text{l}^{-1}$  of total DNA was used in PCR reactions consisting of a final volume of 25  $\mu\text{l}$ , 2.5  $\mu\text{l}$  Takara ExTaq PCR 10 $\times$  buffer (TaKaRa Corp., Shiga, Japan), 2  $\mu\text{l}$  Takara dNTP mix (2.5 mM), 0.7  $\mu\text{l}$  bovine serum albumin (20 mg  $\text{ml}^{-1}$ , Roche), forward and reverse primers (0.2  $\mu\text{M}$  final concentration), 0.125  $\mu\text{l}$  Takara Ex Taq DNA Polymerase (5 u  $\mu\text{l}^{-1}$ ) and nuclease-free water (Sigma-Aldrich). Thermal cycling conditions included an initial denaturation step at 95°C for 3 min, followed by 35 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, primer annealing at 52°C for 40 s, strand extension at 72°C for 90 s and a final extension step at 72°C for 12 min. Three PCR reactions for each biotope sample were combined and purified with the SPRI magnetic bead, AgencourtAMPure XP PCR purification system (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), and DNA concentration of each sample, after pooling PCR products, was obtained with the Qubit dsDNA HS assay. Amplicons were pooled ( $\sim 20$  ng per sample, identified with a specific Golay reverse primer) and sequenced on the Illumina MiSeq300 platform (at the Yale Center for Genome Analysis, CT, USA), resulting in  $\sim 250$  bp paired end reads. The length of short reads was extended by overlapping paired-ends using FLASH (Magoc and Salzberg 2011). Quality filtering and demultiplexing were performed in QIIME ( $r = 1$ ;  $p = 0.75$ ;  $q = 3$ ;  $n = 0$ , min\_count 0.005) as described by Caporaso et al. (2012) and Bokulich et al. (2013), identifying the first quality score below Q3 and truncating the read prior to that position. Reads retained were those with at least 75% of the length of the input sequence and without any ambiguous base calls. USEARCH (Edgar 2010) was used to group sequences into operational taxonomic units (OTUs) at 97% similarity and also remove chimeric sequences. Taxonomic assignments for each OTU were given in QIIME (Caporaso et al. 2012) version 1.7.0 using RDP classifier (Wang et al. 2007) and Greengenes database release 13.5. Phylogenetic trees were generated using FastTree2 (Price, Dehal and Arkin 2010) with QIIME's default parameters; these trees were used for diversity metrics. The sequence data generated and used in this study were deposited in the European Nucleotide Archive SRA under project ID PRJEB10076.

Diversity, richness and Good's coverage metrics were calculated using QIIME with non-phylogenetic analysis on a single OTU table file.  $\beta$  diversity was calculated by weighted UniFrac distance metrics. The weighted UniFrac distance matrix was used to obtain the ordination of the whole composition detected by 16S rRNA gene amplicon sequencing in a distance-based redundancy analysis (db-RDA) (Legendre and Legendre 1998). This RDA analysis was conducted in QIIME to test statistical significance of sample grouping. All cluster analysis to group samples with similar composition were made by the UPGMA method based on Bray-Curtis distance and plotted with the 'cluster' package in R 3.2.2.

For the mesocosm experiments, a principal components analysis (PCA) based on composition differences at the genus

level (L6) amongst sites was plotted in R using the vegan 2.2-1 and Biodiversity R 2.5-3 packages. An equilibrium circle was drawn on the ordination plot, where the genera that contribute significantly to the ordination have vectors outside of the circle (Legendre and Legendre 1998).

## RESULTS AND DISCUSSION

Rubble composed of materials derived from dead *Acropora palmata* branches showed under stereomicroscopic observations a lithified matrix associated with the biofilms (Fig. 2a and b), which impedes fragments to be separated. Mineral characterization by X-ray diffraction showed that the biofilm is composed of a mixture of aragonite with magnesium calcite (16 mole%  $\text{MgCO}_3$ ) and calcite, while the mineral phase corresponding to coral skeleton found in the inner phase of the rubble is basically aragonite. Similar reefal non-skeletal lithification has been reported in the geological outcrop (Camoin et al. 1999). The microbially induced mineralization consisting of laminar fine-grained crusts has been described as cements, microbial crusts, stromatolites and microbialites, and are common features of sedimentary structures of reefal facies (Camoin et al. 1999; Braissant et al. 2003; Riding and Tomas 2006; Camoin, Iryu and McInroy 2007; Riding, Liang and Braga 2014). This binding overgrowth consists of microbial carbonates produced by bacterial communities (Rasser and Riegl 2002) and coralline algae, and has been acknowledged to be crucial in coral reefs for the edification and stabilization of substrates (Riding, Martin and Braga 1991). Bacterial carbonates suggest an adhesive biofilm where calcified bacterial organic matter and grains are trapped in a crust. The surface of this microbial biofilm can trap sediments and provide a medium for  $\text{CaCO}_3$  precipitation (Riding 2011). Microbial crust is considered the last stage of reef formation and the most abundant. In most cores obtained in geological sections, microbially induced mineralization is a major structural and volumetric component of reefs, constituting up to 80% of the rock (Camoin et al. 1999; Riding 2002). The mineral forms precipitated by biological activity can be distinguished from inorganic minerals by their chemical and structural heterogeneity. Specifically, calcite may contain up to 30%  $\text{MgCO}_3$  and high amounts of Na,  $\text{SO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , OH- and  $\text{HCO}_3^-$  (Tucker 1990). Within shallow marine tropical waters the main carbonate mineralogies are Mg-calcites (containing 14–20 mol%  $\text{MgCO}_3$ ), which are more abundant than aragonite in reefs (Perry and Hepburn 2008). The mineralogy found in bacterial carbonates is a solid solution of high-Mg calcite with 11–17%  $\text{Mg}^{2+}$  (Dupraz et al. 2009). Therefore, the lithified biofilm identified growing on the rubble of *A. palmata* branches (Fig. 2b), could consist of a secondary carbonate framework, originated from the biological precipitation of carbonates by microbially induced mineralization. This new framework of carbonate allows resilience of the substrate that reef builders including coralline algae and corals can use as a substrate to grow on.

A total of 2 862 324 sequences were obtained from six biotopes (Stage 1 and lithified biofilms, healthy coral, microbial mat, water and sediments adjacent to Stage 1 and lithified biofilms). Samples were rarefied to 14 400 sequences and grouped in a total of 12 668 OTUs at 97% of similarity. The biotope with the lowest number of OTUs was the healthy *A. palmata* coral (466 OTUs), while the largest number of OTUs was found in the Stage 1 biofilm (3493 OTUs). Diversity was highest in Stage 1 biofilms, sediments and microbial mats, followed by lithified biofilms. Water, and healthy corals had the lowest diversity (Table 1); Good's coverage was on average 90% for all biotopes.

**Table 1.** Estimated richness indices (OTU, Chao1, ACE), diversity indices (H', EH, Simpson) and coverage for all biotopes.

Sample	No. of sequences	OTUs	Chao1	ACE	H'	E <sub>H</sub>	Simpson	Good's coverage (%)
Stage 1 biofilm	110 738	3493	5910	6140	10.35	0.88	1	93
Stage 2 lithified biofilm	80 576	1983	3539	3620	8.72	0.8	0.99	90
Healthy <i>A. palmata</i>	67 319	466	583	589	3.17	0.36	0.61	99
Microbial mat	65 803	2800	4346	4494	9.66	0.84	0.99	95
Seawater	83 550	786	1410	1402	5.82	0.61	0.94	96
Sediment	155 441	3140	5499	5644	10.06	0.87	1	88

High diversity of calcified microbial communities has previously been recorded in reef systems (Papineau *et al.* 2005, 2008; Ley *et al.* 2006), although this is the first attempt to characterize the biofilms that lithify *A. palmata* rubble.

Sixty-four phyla were recovered from the entire biotope-associated bacterial composition including candidate phyla, with ~92% (depending of biotope) of the sequences affiliated to 14 phyla (Fig. 3a). Although composition between biotopes showed the same abundant phyla, their proportion varied among biotopes. Proteobacteria was the most abundant phylum in each biotope. Other ubiquitous phyla included Bacteroidetes, Planctomycetes, Cyanobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria and Crenarchaeota, the last particularly abundant in rubble biofilms. Distance-based redundancy (db-RDA) analysis of ecological distance by ordination revealed that the compositions of the biotopes analysed here were different from each other (pseudo- $F_{10,18} = 10.36$ ,  $P < 0.001$ ) (Fig. 3b). This analysis identified each biotope as a significant explanatory variable of spatial genetic variation after 999 permutations, explaining 85% of total variance, suggesting that microbial aggregates are specific for each biotope. Clustering analysis of the microbial composition showed greater similarity within mineral-associated biotopes (Fig. 3c). Indeed, samples from Stage 1 and lithified biofilms had a more similar composition among them and sediments than to any other biotope included in this study, indicating the strong shift in composition between healthy coral and the biofilms that colonize their remains and form a secondary reef structure.

Healthy *A. palmata* bacterial composition was predominantly characterized by abundance (Fig. 3a) of Proteobacteria, Bacteroidetes, Planctomycetes and to a lesser extent Cyanobacteria and Actinobacteria. A similar composition has been registered in the live tissue of corals (Frias-Lopez *et al.* 2002; Rohwer *et al.* 2002; Pantos and Bythell 2006; Nithyanand and Pandian 2009). Water sample controls had a typical composition of communities from overlying seawater (Frias-Lopez *et al.* 2002) highlighting the presence of Proteobacteria, Bacteroidetes and Cyanobacteria. In addition to Proteobacterial dominance, microbial mat composition was characterized by a greater proportion of Cyanobacteria (Fig. 3a). The compositions of the biofilms and microbial mat are similar to bacterial biofilms associated with carbonates (Papineau *et al.* 2005; Havemann and Foster 2008; Centeno *et al.* 2012). Biofilms colonizing *A. palmata* rubble showed the relevance of Proteobacteria, Bacteroidetes, Planctomycetes, Actinobacteria, Crenarchaeota, Acidobacteria and Chloroflexi as the most abundant phyla (Fig. 3a).

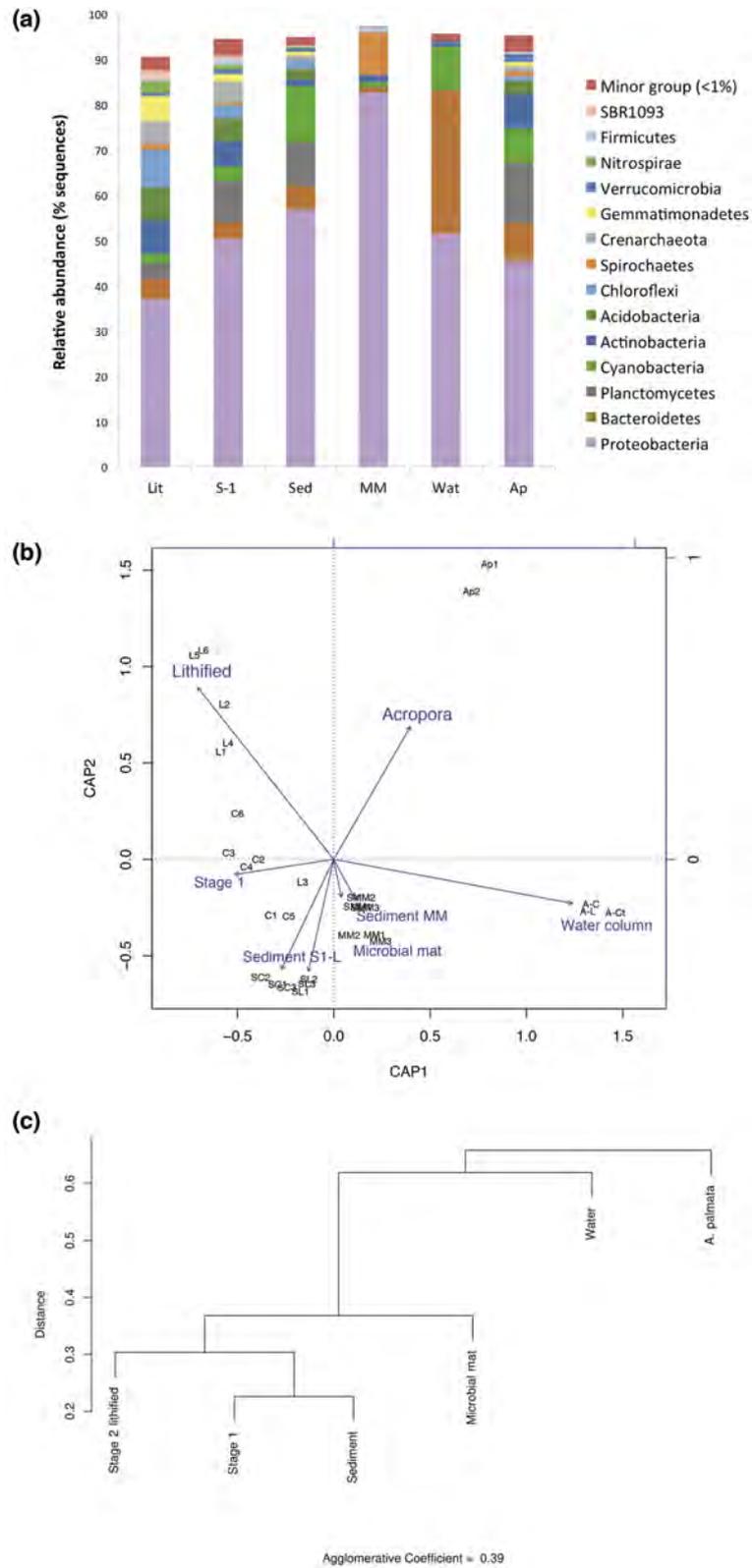
The lithified biofilm had 17 dominant classes, representing 80% of total abundance (Fig. 4). Classes representing abundances <1% are shown in Supplementary Fig. S1. Chloroplasts have a common ancestor within the Cyanobacteria (Falcón, Magallón and Castillo 2010); the 16S rRNA amplification protocol can identify chloroplast diversity that in this study corresponded to Chlorophyta, Rhodophyta and Stramenopiles. Presence of

coralline algae is supported by mineral composition of biofilms, where calcite and magnesium calcite are relevant components (Stanley, Ries and Hardie 2002), and is consistent with reports that show coralline algae as secondary-framework builders after coral disturbance (Perry and Hepburn 2008).

### Mesocosm experiments on lithified biofilms

A total of 7 593 586 high-quality sequences were obtained for all four treatments maintained in the mesocosm system, ranging from 48 436 to 184 388 sequences per sample, which were rarified to 48 400. Microbial composition of lithified rubble in a PCA ordination of each experimental set-up for each set of pH and temperature conditions showed a clear division in microbial composition between samples incubated at least 1 week or less (1, 3, 7 incubations days) and composition of samples for the second week of the experiment (11 and 15 incubation days) (Fig. 5a) (individual PCA figures for each mesocosm condition are shown in Supplementary Fig. S2). UPGMA clustering shows that composition is more similar between samples during the first week and for the second week, respectively by clustering day 11 and 15 outwardly of days 0, 1, 3 and 7 (Fig. 5b). PCA analysis suggests that ordination of samples incubated at least 1 week or less are conducted mostly by the composition of genera *Vibrio* and *Pseudoalteromonas*. A negative correlation relationship has been described by Rodrigues *et al.* (2015) who identified *Pseudoalteromonas* as a potential inhibitor of biofilm development, a negative correlation that also seems to be present in this dataset for the first week (Pearson's correlation  $r = -0.73$ ), but statistical meaning is poor ( $P = 0.27$ ) due to the small number of observations (days). Major changes in abundance between the first and second week were found in Gamma- and Alphaproteobacteria, Clostridia and Bacilli. Changes in distribution of abundance at the class level are shown (Fig. 6a), according to the time of incubation under the combined effect of temperature increase and pH decrease vs current conditions (30°C and pH 8.2). Gamma-, Alpha-, Delta- and Epsilonproteobacteria, Clostridia, Bacilli, Planctomycetia and Acidimicrobiia were the most abundant groups for Week 2. Differences in class distribution between control and combined low pH and high temperature conditions for Week 2 were found (Fig. 6b), highlighting the increase in Bacilli and Acidimicrobiia under the combined effect of temperature increase and low pH.

The results from the mesocosm experiments suggest that the variation in microbial composition is accentuated with time spent in the combined condition of 32°C and pH 7.9 where biofilms that colonize *A. palmata* rubble may be significantly modified under expected scenarios of changes in pH and temperature for the Mexican Mesoamerican Barrier Reef. The response of marine invertebrates and plankton to elevated CO<sub>2</sub> concentration has been investigated before (Hoegh-Guldberg *et al.* 2007; Newbold *et al.* 2012; Johnson *et al.* 2013). However, despite the importance of microbes for a coral reef ecosystem's



**Figure 3.** Comparison of bacterial taxonomic composition in different biotopes associated with *A. palmata* rubble. (a) Dominating phyla abundance per biotope: Stage 1, biofilm (S-1); Stage 2, lithified biofilm (Lit); microbial mat (MM); healthy *A. palmata* (Ap); overlying seawater (Wat); sediment (Sed). (b) Distance-based redundancy (db-RDA) analysis of ecological distance by ordination. (c) Clustering UPGMA showing distance relationships among biotopes, based on Bray-Curtis distance matrix.

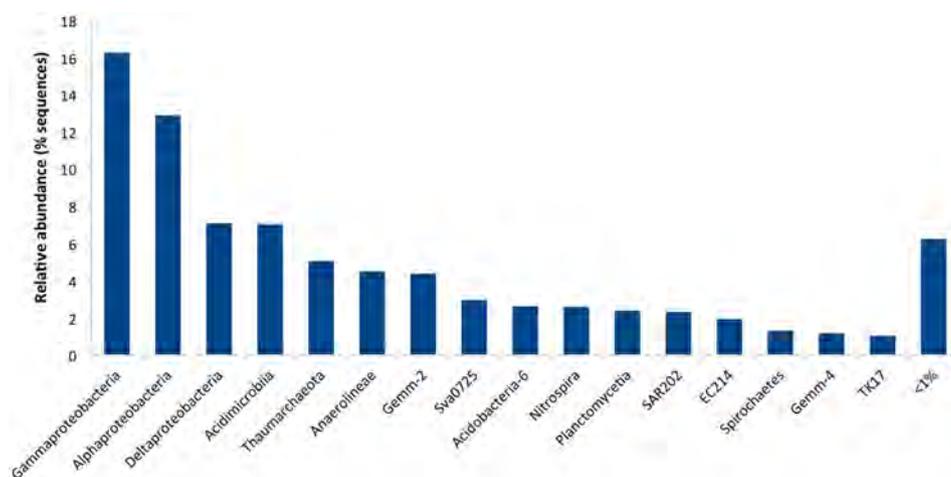


Figure 4. Distribution of most abundant microbial classes (relative abundance >1%) identified in the lithified biofilm. Remaining classes with low relative abundance have been grouped in the <1% bar.

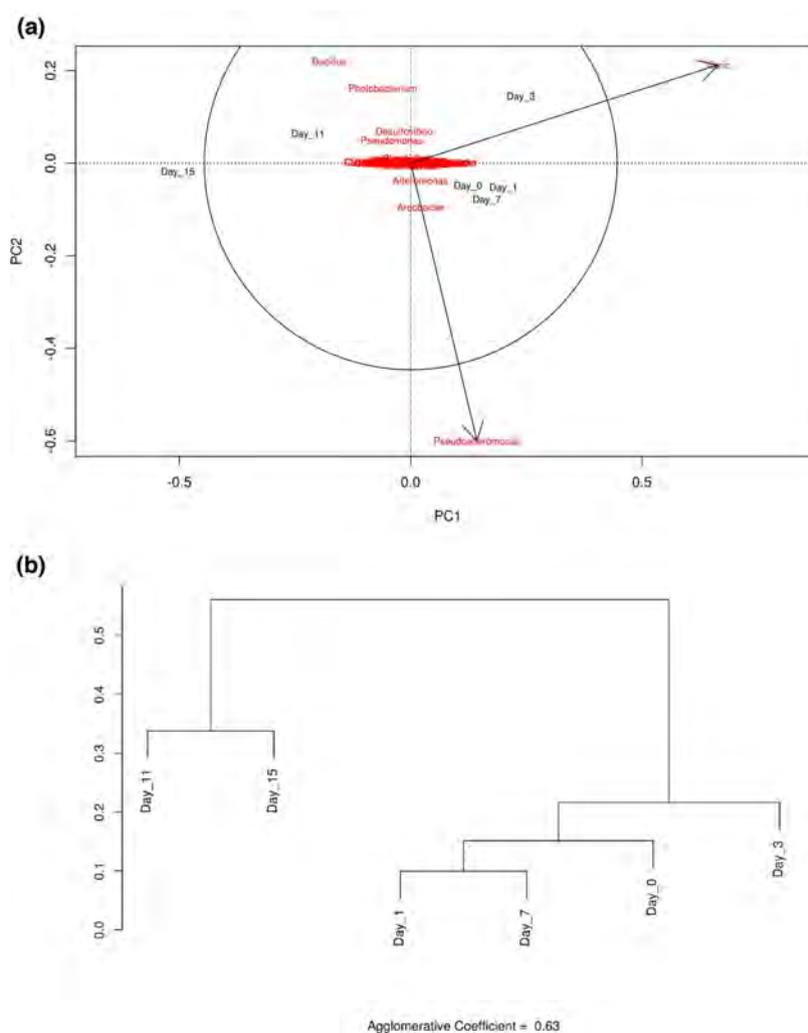
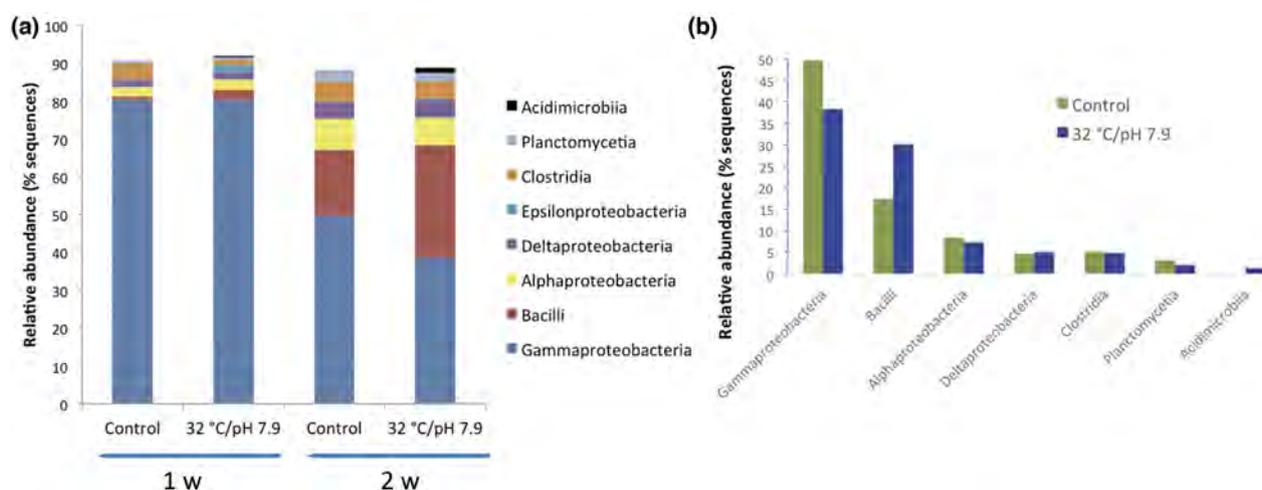


Figure 5. Bacterial diversity to genus level in the lithified biofilm representing different incubation times for the mesocosm condition with the combined effect of low pH and high temperature. (a) Principal components analysis (PCA) scaling to 1; the goodness of fit for the ordination was calculated by the percentage of variance explained for each day by the two first components, resulting in more than 70% per day (see Supplementary Table). An equilibrium contribution circle was drawn, where genera that contribute more to the ordination have vectors longer than the radius of the circle; the radius is equal to  $\sqrt{d/p}$ , where  $d$  is the number of dimensions and  $p$  is the total number of descriptors (Legendre and Legendre 1998). (b) Hierarchical clustering dendrogram by UPGMA (average linkage) method based on Bray–Curtis distance matrix, showing two principal groups for composition similarity; Day\_11, 15 and Day\_0, 1, 3, 7.



**Figure 6.** (a) Abundance distribution of the most representative classes (>1%) between the first and second week of incubation under control (pH 8.2/30 °C) and combined mesocosms conditions (pH 7.9/32 °C). (b) Class distribution in the second week between control and combined mesocosms conditions.

function and health, there are just a few published studies of how decrease of pH by increased CO<sub>2</sub> concentrations can impact these key ecosystem players (Witt et al. 2011; Lidbury et al. 2012).

Experimental studies have focused on the effects of high CO<sub>2</sub> concentrations on bacterial communities in marine mesocosms showing scarce changes in composition for late century (~1140 p.p.m. of CO<sub>2</sub>) scenarios (Liu et al. 2010; Witt et al. 2011; Lidbury et al. 2012; Roy et al. 2013). Roy and colleagues (2013) obtained a similar result on bacterial structure in pelagic communities using high-throughput 16S rRNA gene amplicon sequencing. Other works report no significant changes in microbial community structure (Tanaka et al. 2008; Newbold et al. 2012). Changes in the relative abundance of some phylotypes have been recorded under pCO<sub>2</sub> concentrations over 400 p.p.m. (Witt et al. 2011). A similar composition to that obtained in this study was reported in Arctic surface sediments exposed to different CO<sub>2</sub> concentrations, where some Proteobacterial classes, Chloroplasts and Planctomycetia dominated the microbial communities (Tait et al. 2013). Acidification experiments on Arctic microbial communities hint at shifts in taxa dominance and diversity under acidic conditions specifically for Acidimicrobiia (Monier et al. 2014). Some authors suggest that microorganisms associated with sediments are already adapted to low pH and fluctuating conditions experienced in microbial communities due to microbially mediated redox reactions (Zhu, Aller and Fan 2006; Joint, Doney and Karl 2011). Such has been the challenge of establishing the effect of acidification on microbial communities, where ongoing discussions hypothesize that since microbes already experience natural pH variations, processes other than calcification will not be fundamentally affected (Joint, Doney and Karl 2011); others argue that, based on meta-analysis, the rate of several microbial processes will be affected (Liu et al. 2010).

The response of the microbial composition associated with lithified rubble of *A. palmata* appears to support the hypothesis that predicted variations in pH and temperature will affect microbial colonization of altered coral reef ecosystems. In conclusion, this study represents the first attempt to characterize the biofilms that lithify *A. palmata* rubble, which consist of a secondary carbonate framework that could allow resilience of the substrate for further settlement of reef-builders including coralline algae and coral. Analysis of the response of microbial composition at elevated CO<sub>2</sub> levels indicates differences between current and projected conditions for the near future,

where predicted changes in pH and temperature appear relevant for these biofilms.

## SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available at FEMSEC online.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Sampling and mesocosms were conducted at UNAM's Coral Reef Academic Unit, in Puerto Morelos, Mexico. Technical support is acknowledged from O. Gaona, Susana Guzmán Gómez and F. Negrete-Soto. Mesocosm systems support is acknowledged from Dr W. Krämer and X-ray diffraction analysis support from Dr T. Pi Puig. This paper is part of the graduate degree requirements for YB, in the Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM. YB and DC-G are recipients of graduate studies fellowships (CONACyT). Funding was provided to LIF from SEP-CONACyT grant No. 0151796 and UNAM-PAPIIT grant No. 100212-3. All samples were collected under collector permit No. PPF/DGOPA-113/14 (LIF).

**Conflict of interest.** None declared.

## REFERENCES

- Ainsworth TD, Thurber RV, Gates RD. The future of coral reefs: a microbial perspective. *Trends Ecol Evol* 2010;**25**:233–40.
- Aronson RB, Precht WF. White-band disease and the changing face of Caribbean coral reefs. *Hydrobiologia* 2001;**460**:25–38.
- Arp G, Reimer A, Reitner J. Photosynthesis-induced biofilm calcification and calcium concentrations in phanerozoic oceans. *Science* 2001;**292**:1701–4.
- Blanchon P, Jones B, Kalbfleisch W. Anatomy of a fringing reef around Grand Cayman: storm rubble, not coral framework. *J Sediment Res* 1997;**67**:1–16.
- Bokulich NA, Subramanian S, Faith JJ et al. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat Methods* 2013;**10**:57–9.
- Braissant O, Cailleau G, Dupraz C et al. Bacterially induced mineralization of calcium carbonate in terrestrial environments: the role of exopolysaccharides and amino acids. *J Sediment Res* 2003;**73**:485–90.

- Budd AF. Diversity and extinction in the Cenozoic history of Caribbean reefs. *Coral Reefs* 2000;19:25–35.
- Camoin GF, Gautret P, Montaggioni LF et al. Nature and environmental significance of microbialites in Quaternary reefs: the Tahiti paradox. *Sediment Geol* 1999;126:271–304.
- Camoin GF, Iryu Y, McInroy DB. IODP expedition 310 reconstructs sea level, climatic, and environmental changes in the South Pacific during the last deglaciation. *Sci Drilling* 2007;5:4–12.
- Camoin GF, Seard C, Deschamps P et al. Reef response to sea-level and environmental changes during the last deglaciation: integrated Ocean Drilling Program Expedition 310, Tahiti Sea Level. *Geology* 2012;40:643–6.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 2010;7:335–6.
- Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J* 2012;6:1621–4.
- Centeno CM, Legendre P, Beltrán Y et al. Microbialite genetic diversity and composition relate to environmental variables. *FEMS Microbiol Ecol* 2012;82:724–35.
- Dupraz C, Reid RP, Braissant O et al. Processes of carbonate precipitation in modern microbial mats. *Earth Sci Rev* 2009;96:141–62.
- Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 2010;26:2460–1.
- Falcón LI, Magallón S, Castillo A. Dating the cyanobacterial ancestor of the chloroplast. *ISME J* 2010;4:777–83.
- Frias-Lopez J, Zerkle AL, Bonheyo GT et al. Partitioning of bacterial communities between seawater and healthy, black band diseased, and dead coral surfaces. *Appl Environ Microb* 2002;68:2214–28.
- Fujita Y, Taylor JL, Gresham TLT et al. Stimulation of microbial urea hydrolysis in groundwater to enhance calcite precipitation. *Environ Sci Technol* 2008;42:3025–32.
- Greenstein BJ, Pandolfi JM. Taphonomic alteration of reef corals: effects of reef environment and coral growth form II: the Florida Keys. *Palaios* 2003;18:495–509.
- Hammes F, Boon N, de Villiers J et al. Strain-specific ureolytic microbial calcium carbonate precipitation. *Appl Environ Microb* 2003;69:4901–9.
- Havemann SA, Foster JS. Comparative characterization of the microbial diversities of an artificial microbialite model and a natural stromatolite. *Appl Environ Microb* 2008;74:7410–21.
- Hoegh-Guldberg O, Mumby PJ, Hooten AJ et al. Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. *Science* 2007;318:1737–42.
- Hofmann HJ. Archean stromatolites as microbial archives. *Microbial Sedim* 2000, 315–27.
- Johnson VR, Brownlee C, Rickaby REM et al. Responses of marine benthic microalgae to elevated CO<sub>2</sub>. *Mar Biol* 2013;160:1813–24.
- Joint I, Doney SC, Karl DM. Will ocean acidification affect marine microbes? *ISME J* 2011;5:1–7.
- Legendre P, Legendre L. *Numerical Ecology*. Amsterdam: Elsevier Science BV, 1998.
- Ley RE, Harris JK, Wilcox J et al. Unexpected diversity and complexity of the Guerrero Negro hypersaline microbial mat. *Appl Environ Microb* 2006;72:3685–95.
- Lidbury I, Johnson V, Hall-Spencer JM et al. Community-level response of coastal microbial biofilms to ocean acidification in a natural carbon dioxide vent ecosystem. *Mar Pollut Bull* 2012;64:1063–6.
- Liu J, Weinbauer MG, Maier C et al. Effect of ocean acidification on microbial diversity and on microbe-driven biogeochemistry and ecosystem functioning. *Aquat Microb Ecol* 2010;61:291–305.
- Magoc T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* 2011;27:2957–63.
- Merino M, Otero L. *Atlas Ambiental Costero, Puerto Morelos-Quintana Roo, Chetumal, Mexico: Centro de Investigaciones de Quintana Roo*, 1991.
- Monier A, Findlay HS, Charvet S et al. Late winter under ice pelagic microbial communities in the high Arctic Ocean and the impact of short-term exposure to elevated CO<sub>2</sub> levels. *Front Microbiol* 2014;5:490.
- Newbold LK, Oliver AE, Booth T et al. The response of marine picoplankton to ocean acidification. *Environ Microbiol* 2012;14:2293–307.
- Nithyanand P, Pandian SK. Phylogenetic characterization of culturable bacterial diversity associated with the mucus and tissue of the coral *Acropora digitifera* from the Gulf of Mannar. *FEMS Microbiol Ecol* 2009;69:384–94.
- Pantos O, Bythell JC. Bacterial community structure associated with white band disease in the elkhorn coral *Acropora palmata* determined using culture-independent 16S rRNA techniques. *Dis Aquat Organ* 2006;69:79–88.
- Papineau D, Walker JJ, Mojzsis SJ et al. Composition and structure of microbial communities from stromatolites of Hamelin Pool in Shark Bay, Western Australia. *Appl Environ Microb* 2005;71:4822–32.
- Patterson KL, Porter JW, Ritchie KE et al. The etiology of white pox, a lethal disease of the Caribbean elkhorn coral, *Acropora palmata*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:8725–30.
- Perry CT, Hepburn LJ. Syn-depositional alteration of coral reef framework through bioerosion, encrustation and cementation: Taphonomic signatures of reef accretion and reef depositional events. *Earth Sci Rev* 2008;86:106–44.
- Precht WF, Bruckner AW, Aronson RB et al. Endangered acroporid corals of the Caribbean. *Coral Reefs* 2002;21:41–2.
- Price MN, Dehal PS, Arkin AP. FastTree 2—approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One* 2010;5:e9490.
- Pringault O, Duran R, Jacquet S et al. Temporal variations of microbial activity and diversity in marine tropical sediments (New Caledonia lagoon). *Microbiol Ecol* 2008;55:247–58.
- Rasser MW, Riegl B. Holocene coral reef rubble and its binding agents. *Coral Reefs* 2002;21:57–72.
- Riding R. Microbial carbonates: the geological record of calcified bacterial-algal mats and biofilms. *Sedimentology* 2000;47:179–214.
- Riding R. Biofilm architecture of Phanerozoic cryptic carbonate marine veneers. *Geology* 2002;30:31–4.
- Riding R. Reefal microbial crusts. In: Hopley D (ed.). *Encyclopedia of Modern Coral Reefs: Structure, Form and Process*. Dordrecht: Springer, 2011, 911–5.
- Riding R, Liang L, Braga JC. Millennial-scale ocean acidification and late Quaternary decline of cryptic bacterial crusts in tropical reefs. *Geobiology* 2014;12:387–405.
- Riding R, Martin JM, Braga JC. Coral-stromatolite reef framework, upper Miocene, Almería, Spain. *Sedimentology* 1991;38:799–818.
- Riding R, Tomas S. Stromatolite reef crusts, Early Cretaceous, Spain: bacterial origin of in situ-precipitated peloid microspar? *Sedimentology* 2006;53:23–34.

- Rodrigues S, Paillard C, Dufour A et al. Antibiofilm activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 against *Vibrio tapetis*, the causative agent of brown ring disease. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2015;7:45–51.
- Rodriguez-Martinez RE, Banaszak AT, Jordan-Dahlgren E. Necrotic patches affect *Acropora palmata* (Scleractinia: acroporidae) in the Mexican Caribbean. *Dis Aquat Organ* 2001;47:229–34.
- Rodríguez-Martínez RE, Banaszak AT, McField MD et al. Assessment of *Acropora palmata* in the Mesoamerican Reef System. *PLoS One* 2014;9:e96140.
- Rodriguez-Martinez RE, Ruiz-Renteria F, van Tussenbroek B et al. Environmental state and tendencies of the Puerto Morelos CARICOMP site, Mexico. *Rev Biol Trop* 2010;58:23–43.
- Rohwer F, Seguritan V, Azam F et al. Diversity and distribution of coral-associated bacteria. *Mar Ecol Prog Ser* 2002;243:1–10.
- Roy AS, Gibbons SM, Schunck H et al. Ocean acidification shows negligible impacts on high-latitude bacterial community structure in coastal pelagic mesocosm. *Biogeosciences* 2013;10:555–66.
- Stanley SM, Ries JB, Hardie LA. Low-magnesium calcite produced by coralline algae in seawater of Late Cretaceous composition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:15323–6.
- Tait K, Laverock B, Shaw J et al. Minor impact of ocean acidification to the composition of the active microbial community in an Arctic sediment. *Environ Microb Rep* 2013;5:851–60.
- Tanaka T, Thingstad TF, Lovdal T et al. Availability of phosphate for phytoplankton and bacteria and of glucose for bacteria at different pCO<sub>2</sub> levels in a mesocosm study. *Biogeosciences* 2008;5:669–78.
- Thornborough KJ, Davies PJ. Reef flats. In: Hopley D (ed.). *Encyclopedia of Modern Coral Reefs: Structure, Form and Process*. Dordrecht: Springer, 2011, 869–76.
- Tucker ME, Bathurst RG (eds). *Carbonate Diagenesis*, Vol. 1. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1990.
- Visscher PT, Reid RP, Bebout BM. Microscale observations of sulfate reduction: Correlation of microbial activity with lithified micritic laminae in modern marine stromatolites. *Geology* 2000;28:919–22.
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM et al. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microb* 2007;73:5261–7.
- Westphal H, Heindel K, Brandano M et al. Genesis of microbialites as contemporaneous framework components of deglacial coral reefs, Tahiti (IODP 310). *Facies* 2010;56:337–52.
- Williams DE, Miller MW. Coral disease outbreak: pattern, prevalence and transmission in *Acropora cervicornis*. *MEPS* 2005;301:119–28.
- Witt V, Wild C, Anthony KRN et al. Effects of ocean acidification on microbial community composition of, and oxygen fluxes through, biofilms from the Great Barrier Reef. *Environ Microbiol* 2011;13:2976–89.
- Zhou JZ, Bruns MA, Tiedje JM. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microb* 1996;62:316–22.
- Zhu Q, Aller RC, Fan Y. Two-dimensional pH distributions and dynamics in bioturbated marine sediments. *Geochim Cosmochim Acta* 2006;70:4933–49.