



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Afloramientos de cianobacterias marinas  
bentónicas en San Andrés, Providencia y las  
Islas del Rosario (Caribe colombiano):  
Caracterización y evaluación de su posible  
papel ecológico.**

**Julian Alberto Prato Valderrama**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Maestría Interfacultades En Microbiología  
Bogotá- Colombia  
2013



# **Afloramientos de cianobacterias marinas bentónicas en San Andrés, Providencia y las Islas del Rosario (Caribe colombiano): Caracterización y evaluación de su posible papel ecológico.**

**Julian Alberto Prato Valderrama**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Magister en Microbiología**

Directora:

Ph.D. Mónica Puyana Hegedus

Codirector:

Ph.D. Freddy Alejandro Ramos Rodriguez

Línea de Investigación:

Microbiología

Grupo de Investigación:

Bioprospección

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Maestría Interfacultades En Microbiología  
Bogotá- Colombia  
2013



A la vida y el océano.



# Agradecimientos

A la Profesora Mónica Puyana, maestra, madre, persona y gran profesional, quien ha tenido un papel primordial en la guía de mis pasos y quien además es la gestora de la iniciativa de estudiar las cianobacterias marinas arrecifales. Gracias por ser un gran ejemplo, compartir el conocimiento, enseñar, dar oportunidades y ayudarme a crecer.

Al profesor Freddy Ramos mi codirector, de quien he recibido orientación y diversas enseñanzas para la vida.

A mi madre Norma Valderrama por su apoyo incondicional, paciencia y compañía. A mi hermana Luana Prato por hacer su papel consanguíneo muy bien. A mi padre Henry Prato por su apoyo constante y consejos profundos. A mi mujer linda Diana CC por hacerme sentir más vivo.

A las profesoras Martha Fontanilla y Maria Teresa Reguero, por impulsar en mí el cultivo del amor y admiración por los microorganismos y sus capacidades metabólicas.

A las profesoras Elvira Alvarado, Valeria Pizarro, Johanna Santamaría, por su colaboración y enseñanzas para el desarrollo de los experimentos con embriones de corales y la identificación molecular.

A los profesores Valerie Paul, Sarath Gunasekera, Serguey Dobretsov, Michael Boyle y Theresa Meickle y Johnathan Craft, por darme la oportunidad de aprender de ellos en la estación marina del Smithsonian en Fort Pierce, su importante colaboración en la realización de los experimentos de inhibición del *quorum sensing*, antifúngicos con *D. salina*, fraccionamiento químico y aislamiento de los compuestos puros, identificación de los compuestos por RMN y MS, realización de los ensayos antiherbivoría con erizos, y sobretodo por actuar siempre con humildad y disposición para compartir el conocimiento.

A mis compañer@s Paola Pinzón y Daniela Rivera, Mario Alviar y el personal del Oceanario de Islas del Rosario, por colaboración para el desarrollo de los experimentos en las Islas del Rosario.

A Laura Rodriguez, Jairo Quintana, Lina Bayona, Paul Calderón, Liliana López paredes, Pedro, Daniel y Juliana Vanegas, por su colaboración y trabajo en equipo para realizar los experimentos con embriones de coral, obtención de los extractos orgánicos, desarrollo de las pruebas de toxicidad con *Artemia salina* e identificación molecular de las especies de cianobacterias.

A COLCIENCIAS por la financiación y la Fundación Mariano Ospina Pérez por su reconocimiento y presupuesto brindado a través del premio en Biotecnología 2010. Al CEINER y Rafael Vieira por su esencial colaboración en los experimentos y muestreos en Islas del Rosario.

A la Universidad Jorge Tadeo Lozano, por ofrecer la oportunidad de optar por ser Biólogo Marino.

A la Universidad Nacional de Colombia por permitirme profundizar en la microbiología y crecer como profesional a través de esta maestría, además de permitirme tener unos excelentes compañeros de quienes también he aprendido mucho.





## Resumen

En arrecifes coralinos de diversos lugares del mundo se han registrado afloramientos de cianobacterias bentónicas que traen consigo consecuencias ecológicas negativas, como por ejemplo efectos nocivos sobre los corales. En Colombia, no existen registros formales de la incidencia de estos afloramientos y sus características. Durante muestreos realizados de 2009 a 2011 en arrecifes de las Islas del Rosario, San Andrés y Providencia (Caribe colombiano), se observaron afloramientos de cianobacterias bentónicas, los cuales, son reportados y descritos en este trabajo de manera formal. Los afloramientos se manifestaron a manera de aglomeraciones o tapetes macroscópicos conformados por ensambles de más de una especie de cianobacterias del orden Oscillatoriales, de éstas, se identificaron 11 especies, de las cuales cinco (*Oscillatoria margaritifera*, *O. nigroviridis*, *O. acuminata*, *Phormidium gracile*, y *Blennothrix glutinosa*), son nuevos reportes para el Caribe colombiano. De otro lado, se observó una relación directa entre el aumento de temperatura y nutrientes en el agua, con la abundancia de cianobacterias. Usando extractos orgánicos obtenidos de los tapetes recolectados en los afloramientos, se encontró, que algunos fueron tóxicos para *Artemia salina*, otros, tuvieron efectos disuasorios del consumo por herbívoros marinos (opistobranquios (*Bursatella leachii*), erizos (*Lytechinus variegatus*), peces (*Stegastes planifrons*)), o presentaron efectos alelopáticos sobre corales adultos (*Madracis mirabilis*) y sus embriones (*Montastrea annularis*). Otros extractos, tuvieron la capacidad de inhibir el *quorum sensing* contra *Chromobacterium violaceum* (CV-17) o mostraron tener actividad antifúngica contra el hongo marino *Dendryphiella salina*. Adicionalmente, mediante aislamiento bioguiado siguiendo la actividad inhibitoria del crecimiento de *D. salina*, se lograron aislar los compuestos Caylobolido A (**1**) y ácido 7-metoxi-4-dodecenóico (**2**).

**Palabras clave:** Cianobacterias marinas bentónicas, afloramientos de cianobacterias, alelopatía, arrecifes de coral, ecología marina, herbivoría, antifúngico.

## Abstract

Benthic cyanobacterial blooms has been reported on coral reefs worldwide causing ecological problems as coral damage. In Colombian Caribbean these blooms haven't been formally registered. Here, benthic cyanobacterial blooms from reefs of San Andrés, Providencia and Islas del Rosario (Colombian Caribbean), were studied during surveys conducted from 2009 to 2011. These blooms were represented as macroscopic mats formed by assemblies of more than one cyanobacterial species which belong to the order Oscillatoriales. Eleven cyanobacteria species were identified and five of those are new reports for the Colombian Caribbean (*Oscillatoria margaritifera*, *Oscillatoria nigroviridis*, *Phormidium gracile*, *Oscillatoria acuminata* and *Blennothrix glutinosa*). Moreover, the results obtained suggest a direct relationship between water temperature variations, water nutrients levels and cyanobacterial abundance. Crude organic extracts were obtained from the cyanobacterial mats, some were toxic to *Artemia salina*; other showed feeding deterrence effects against marine grazers (opisthobranchs (*Bursatella leachii*), urchins (*Lytechinus variegatus*), fishes (*Stegastes planifrons*)) or allelopathic effects on adult corals (*Madracis mirabilis*) and their embryos (*Montastrea annularis*). Other extracts inhibited the *quorum sensing* (against *Crhormobacterium violaceum* CV-17), or had antifungal activity against the marine fungus *Dendryphiella salina*. Compounds **(1)** Caylobolide A and **(2)** 4-en-7methoxy-dodecenoic acid, were obtained by bioguided isolation through the growth inhibitory activity of *D. salina*.

**Keywords:** Marine benthic cyanobacteria, cyanobacterial bloom, allelopathy, coral reefs, marine ecology, herbivory, antifungal.

## Lista de figuras

	Pag.
<b>Figura 1.1.</b> Árbol filogenético obtenido a partir de la comparación de secuencias moleculares del RNA ribosomal 16S y 18S de representantes de los tres dominios, <i>Bacteria</i> , <i>Archaea</i> y <i>Eukarya</i> .	5
<b>Figura 1.2</b> Microfotografías electrónicas de células de <i>Synechococcus</i> sp.	7
<b>Figura 1.3</b> Microfotografías de representantes de cada una de las cinco subsecciones de las cianobacterias según su morfología y patrones de agregación y segmentación.	8
<b>Figura 1.4</b> Afloramientos de cianobacterias.	10
<b>Figura 1.5.</b> Estructura de sideróforos producidos por cianobacterias	13
<b>Figura 1.6.</b> Compuestos aislados de cianobacterias marinas del género <i>Lyngbya</i> que presentan actividad disuasora del consumo por parte de herbívoros.	13
<b>Figura 1.7.</b> Ejemplos de inhibidores de proteasas producidos por cianobacterias.	14
<b>Figura 1.8.</b> Estructuras de compuestos aislados de cianobacterias con efectos alelopáticos sobre otros organismos fotosintéticos.	15
<b>Figura 1.9.</b> Estructura de la dolastatina 10 ( <b>14</b> ), compuesto producido por la cianobacteria marina <i>Symploca hydroides</i> (Burja <i>et al.</i> , 2001), pero originalmente aislado de opistobranquios del género <i>Dolabella</i> .	16
<b>Figura 1.10.</b> Estructuras de los compuestos presentados en las Tablas 1.2 y 1.3.	20
<b>Figura 1.11.</b> Dermatitis causada por <i>Lyngbya majuscula</i> en una niña que nadaba en costas de Oahu, Hawaii	24
<b>Figura 2.1.</b> Mapa del mar Caribe mostrando el sistema de corrientes marinas superficiales	36
<b>Figura 2.2.</b> Ubicación de las tres localidades del Caribe colombiano estudiadas en el presente trabajo.	37
<b>Figura 2.3.</b> Estaciones de muestreo en las Islas de San Andrés (Izquierda), Providencia y Santa Catalina (Derecha).	40
<b>Figura 2.4.</b> Estaciones de muestreo en las Islas del Rosario.	41
<b>Figura 2.5.</b> Bolsas de velo suizo confeccionadas para la recolección en campo de los tapetes de cianobacterias marinas.	42
<b>Figura 2.6.</b> Tapetes de cianobacterias de filamentos gruesos y densos de color rojizo en la Isla de Providencia.	48
<b>Figura 2.7.</b> <b>A.</b> Tapetes rojizos de filamentos gruesos formados por <i>Lyngbya majuscula</i> y <i>Lyngbya sordida</i> creciendo sobre un octocoral (Islas del Rosario, Septiembre de 2010). <b>B.</b> Crecimiento masivo de tapetes conformados por <i>L. majuscula</i> y <i>L. sordida</i> en las Islas del Rosario.	49
<b>Figura 2.8.</b> Tapetes algodonosos conformados por <i>Symploca hydroides</i> y <i>Phormidium submembranaceum</i> sobre distintos tipos de sustrato en los Pináculos, Isla de Providencia (julio de 2010)	50
<b>Figura 2.9.</b> Morfología característica de los tapetes algodonosos en los Pináculos, Isla de Providencia (julio de 2010).	51
<b>Figura 2.10.</b> Tapetes algodonosos de coloración rojiza creciendo sobre el alga parda <i>Sargassum</i> sp. (Pináculos, Isla de Providencia, julio de 2010).	51

<b>Figura 2.11.</b> Tapete algodonoso creciendo sobre un coral hermatípico del género <i>Montastrea</i> . Al remover el tapete microbiano, fue evidente la amortalidad del tejido coralino.	52
<b>Figura 2.12.</b> Biopelículas marrones encontradas en Felipe's Place (Isla de Providencia en julio de 2010) creciendo sobre diferentes tipos de sustrato como arena, macroalgas y cascajo.	53
<b>Figura 2.13.</b> Imágenes características de las biopelículas rojizas de cianobacterias creciendo sobre diferentes tipos de sustratos como arena y otros organismos	54
<b>Figura 2.14. A y B.</b> Biopelículas rojizas creciendo sobre diferentes octocorales, el tejido del octocoral bajo la biopelícula se encontraba muerto y se deshacía fácilmente al contacto (Fotografías tomadas en Felipe's Place, Isla de Providencia, julio de 2010).	55
<b>Figura 2.15. A y B.</b> Aspecto característico de los tapetes de filamentos largos rojos encontrados en los Pináculos (Providencia, julio de 2010).	56
<b>Figura 2.16.</b> Microfotografía de los tapetes rojizos de filamentos gruesos conformados por ensambles de cianobacterias del género <i>Lyngbya</i> ( <i>L. majuscula</i> y <i>L. sordida</i> ) (Providencia, julio de 2010).	57
<b>Figura 2.17.</b> Detalles del extremo de un filamento (tricoma más la envoltura mucilaginoso) de <i>Lyngbya majuscula</i>	59
<b>Figura 2.18.</b> Porción apical de un filamento de <i>Lyngbya sordida</i> . Se aprecia claramente la vaina mucilaginoso transparente envolviendo el tricoma como una especie de "pitillo".	60
<b>Figura 2.19.</b> Fracción intermedia de un filamento de <i>L. sordida</i> . Se aprecian claramente las constricciones intertabiculares	61
<b>Figura 2.20.</b> Extremo de uno de los filamentos de <i>Lyngbya confervoides</i> . Se aprecia claramente la célula apical redondeada y sin caliptra.	62
<b>Figura 2.21.</b> Tricoma de <i>Oscillatoria margaritifera</i> con atenuaciones en su extremo.	63
<b>Figura 2.22.</b> Tricomos de la especie <i>O. nigroviridis</i> se aprecian las medidas del ancho celular y diferentes tipos de células apicales cónicas y redondeadas características de la especie	64
<b>Figura 2.23. A.</b> Filamentos de <i>Symploca hydroides</i> . <b>B.</b> Sección basal de los tapetes. <b>C.</b> Filamentos de la región apical de los fascículos.	65
<b>Figura 2.24.</b> Comparación de los filamentos de <i>Phormidium submembranaceum</i> y <i>Symploca hydroides</i> .	67
<b>Figura 2.25. A y B.</b> Filamentos de <i>Phormidium gracile</i>	68
<b>Figura 2.26.</b> Filamentos de <i>Spirulina subsalsa</i> .	69
<b>Figura 2.27.</b> Filamentos de <i>Blennothrix glutinosa</i> donde se observan claramente varios tricomas dentro de una misma vaina mucilaginoso.	70
<b>Figura 2.28.</b> Detalles de los filamentos de <i>Blennothrix glutinosa</i> .	71
<b>Figura 2.29.</b> Microfotografías de <i>Oscillatoria acuminata</i> donde se observan claramente características relevantes para su identificación taxonómica, como la presencia de células más largas que anchas, tricomas atenuados en los extremos y células apicales cónicas terminadas en punta	72
<b>Figura 2.30.</b> Filogenia a partir del método de <i>Neighbor-joining</i> con 1000 <i>Bootstrap</i> y el modelo de <i>Maximum Composite Likelihood</i> usando el <i>software</i> Mega 5.10 Beta 2.	75
<b>Figura 2.31.</b> Región superior del árbol filogenético correspondiente a la porción	76

número 1 encerrada en un óvalo rojo en la figura 2.30.	
<b>Figura 2.32.</b> Región media del árbol filogenético correspondiente a la porción número 2 encerrada en un óvalo verde en la figura 2.30.	77
<b>Figura 2.33.</b> Región inferior del árbol correspondiente a a porción número 3 encerrada en un óvalo azul en la figura 2.30.	78
<b>Figura 3.1.</b> Ensayo de toxicidad con <i>Artemia salina</i> realizado en una placa de 24 pozos.	92
<b>Figura 3.2.</b> Porcentaje (promedio $\pm$ error estándar) de cobertura de las diferentes categorías evaluadas en los sitios de muestreo nombrados a continuación. <b>BR.</b> Biopelículas rojas. <b>BM:</b> Biopelículas marrones. <b>N:</b> número de cuadrantes analizados.	95
<b>Figura 3.3.</b> Temperatura mensual promedio (°C) durante el periodo comprendido entre septiembre de 2009 a marzo de 2012 en: <b>(A)</b> Archipiélago de San Andrés y Providencia. <b>(B)</b> Las Islas del Rosario.	97
<b>Figura 4.1.</b> El opistobranquio <i>Bursatella leachii</i> . Se aprecian claramente los tentáculos orales y el par de rinóforos en la cabeza. También se observan las papilas alargadas y ramificadas a lo largo de todo su cuerpo, estructuras que le permiten esconderse y mimetizarse en sustratos cubiertos con algas. Longitud aproximada del animal: 12 cm.	117
<b>Figura 4.2.</b> Erizo verde <i>Lytechinus variegatus</i> .	118
<b>Figura 4.3.</b> Fotografía submarina de <i>Stegastes planifrons</i> (en el centro), Islas del Rosario.	119
<b>Figura 4.4.</b> Preparación de las dietas artificiales para el ensayos de disuasión de la alimentación con el gasterópodo <i>Bursatella leachii</i> .	121
<b>Figura 4.5.</b> Montaje del Ensayo de disuasión de la alimentación con el molusco <i>Bursatella leachii</i> .	122
<b>Figura 4.6.</b> Ensayos de disuasión de la alimentación con el opistobranquio <i>Bursatella leachii</i> .	122
<b>Figura 4.7.</b> Ensayo de disuasión del consumo por el erizo <i>Lytechinus variegatus</i> .	124
<b>Figura 4.8.</b> Ensayos de disuasión de la alimentación con el pez damisela <i>Stegastes planifrons</i> .	126
<b>Figura 4.9.</b> Resultados de los ensayos de disuasión de la alimentación con el opistobranquio <i>Bursatella leachii</i> .	127
<b>Figura 4.10.</b> Resultados de los ensayos de disuasión de la alimentación con los erizos <i>Lytechinus variegatus</i> .	129
<b>Figura 4.11.</b> Resultados de los ensayos de disuasión de la alimentación con los peces damisela <i>Stegastes planifrons</i> .	130
<b>Figura 5.1.</b> Dos tipos de tapetes de cianobacterias (coloraciones roja y marrón) formados por ensambles de <i>Oscillatoria</i> spp. y <i>Lyngbya</i> spp. creciendo masivamente sobre el sustrato. Se observa como el crecimiento masivo de las cianobacterias llega a sofocar a los corales <i>Porites porites</i> (señalados con flechas blancas).	141
<b>Figura 5.2. A y B</b> Biopelículas de cianobacterias creciendo sobre octocorales del género <i>Pseudopterogorgia</i> en arrecifes de la isla de Providencia.	142
<b>Figura 5.3.</b> Disposición de las trampas gaméticas sobre las colonias del coral <i>Montastrea annularis</i> durante las horas de la tarde del 18 de septiembre de 2011, en la estación Ministerio para la recolección de los paquetes gaméticos y	146

la posterior realización de las pruebas de toxicidad con extractos orgánicos de cianobacterias.	
<b>Figura 5.4.</b> Ensayos de toxicidad con embriones del coral <i>Montastrea annularis</i> .	147
<b>Figura 5.5.</b> Ensayo de retracción de pólipos con fragmentos del coral <i>Madracis mirabilis</i> .	148
<b>Figura 5.6.</b> Experimento de retracción de los pólipos en fragmentos del coral <i>Madracis mirabilis</i> . <b>A.</b> Fragmento de coral con los pólipos totalmente extendidos antes de ser expuesto a los extractos de cianobacterias. <b>B.</b> Fragmento de coral con los pólipos retraídos a los 210 minutos de haber sido expuesto al extracto 38 a una concentración de 11 mg/ml.	151
<b>Figura 6.1.</b> Actividad Inhibitoria del <i>quorum sensing</i> de extractos de cianobacterias bentónicas arrecifales contra <i>C. violaceum</i> CV-17.	167
<b>Figura 6.2.</b> Ensayo de actividad antifúngica de extractos de cianobacterias contra <i>Dendryphiella salina</i> .	168
<b>Figura 6.3.</b> Inhibición del crecimiento de <i>Dendryphiella salina</i> por extractos de cianobacterias marinas. Los extractos 36, 38, 41 y 43 presentaron una fuerte actividad inhibitoria del crecimiento del hongo a una concentración de 1 mg/mL	169
<b>Figura 6.4.</b> Ensayo de inhibición del crecimiento del hongo <i>Dendryphiella salina</i> . Las las fracciones 4 (encerrada en un óvalo) y 5 obtenidas del extracto 36 mostraron actividad inhibitoria.	170
<b>Figura 6.5.</b> Diagrama del fraccionamiento bioguiado del extracto 36 ( <i>Lyngbya</i> spp). Mediante el ensayo de inhibición contra el hongo marino <i>Dendryphiella salina</i> , se logró obtener finalmente el compuesto <b>(1)</b> .	171
<b>Figura 6.6.</b> Cromatograma de la separación de la fracción 5.4 mediante CLAE utilizando una columna Alltech Econosil RP-18 semipreparativa (250 x 10 mm, 5µm), sistema isocrático con MeOH/H <sub>2</sub> O (85:15), flujo 3 mL/min, inyección 50 µL).	172
<b>Figura 6.7.</b> Resultados de la evaluación de la actividad antifúngica contra <i>Dendryphiella salina</i> de las cinco fracciones obtenidas por HPLC a partir de la fracción F5.4 del extracto 36.	172
<b>Figura 6.8.</b> Estructura del caylobolido A (MacMillan y Molinski, 2002).	173
<b>Figura 6.9.</b> Ensayo de inhibición del crecimiento de <i>Dendryphiella salina</i> por las fracciones provenientes de lafracción 4 del extracto 30 en fase reversa.	174
<b>Figura 6.10.</b> Diagrama del fraccionamiento bioguiado del extracto 30 utilizando el hongo marino <i>Dendryphiella salina</i> <i>Lyngbya</i> spp. para obtener finalmente el compuesto <b>(2)</b> .	174
<b>Figura 6.11.</b> Estructura del ácido 7-metoxi-4-dodecenóico <b>(2)</b> , aislado en el presente trabajo a partir del extracto 32 obtenido a partir de un ensable de <i>Symploca hydroides</i> y <i>Phormidium submembranaceum</i> .	175
<b>Figura 6.12.</b> Comparación de la actividad antifúngica (promedio ± error estándar) de tres compuestos puros aislados de cianobacterias marinas contra el hongo marino <i>Dendryphiella salina</i> : <b>(2)</b> ácido 7 metoxi-4- dodecenóico asilado del extracto 32. <b>(MA)</b> malyngamida B. <b>(LA)</b> ácido lyngbico aislados de <i>Lyngbya majuscula</i> .	176

## Lista de tablas

	<b>Pag.</b>
<b>Tabla 1.1.</b> Subsecciones de la clasificación de las cianobacterias según su morfología y patrones de agregación y segmentación (Según Prescott, 2002)	7
<b>Tabla 1.2.</b> Principales toxinas aisladas de cianobacterias. El número corresponde a la estructura química presentada en la Figura 1.10.	17
<b>Tabla 1.3.</b> Principales productos naturales aislados de cianobacterias. El número corresponde a la estructura química presentada en la Figura 1.10.	19
<b>Tabla 2.1.</b> Descripción de las muestras de cianobacterias arrecifales utilizadas en las pruebas para la identificación molecular.	44
<b>Tabla 2.2.</b> Identidades obtenidas a través de BLAST de las secuencias del 16S rDNA de las muestras de cianobacterias.	74
<b>Tabla 3.1.</b> Valores de los parámetros fisicoquímicos determinados durante los muestreos para las estaciones ubicadas en el Archipiélago de San Andrés y Providencia y las Islas del Rosario.	96
<b>Tabla 3.2.</b> Resultados de los ensayos de toxicidad de los extractos de cianobacterias marinas contra <i>Artemia salina</i> a las 24 horas de exposición.	98
<b>Tabla 4.1.</b> Descripción de las muestras de cianobacterias bentónicas arrecifales utilizadas en los ensayos con el fin de evaluar su papel ecológico contra potenciales consumidores.	116
<b>Tabla 4.2.</b> Efecto disuasor del consumo por el molusco por parte de extractos de cianobacterias frente a el opistobranquio <i>Bursatella leachii</i> , el erizo <i>Lythechinus variegatus</i> y el pez <i>Stegastes planifrons</i> .	131
<b>Tabla 5.1.</b> Extractos de cianobacterias marinas utilizados en los experimentos para evaluar su papel alelopático contra corales adultos y embriones de coral.	143
<b>Tabla 5.2.</b> Letalidad de extractos de cianobacterias sobre embriones de <i>Montastrea annularis</i> (10 embriones por pozo, 3 réplicas por tratamiento).	150
<b>Tabla 5.3.</b> Porcentaje de retracción (promedio $\pm$ error estándar) de pólipos retraídos del coral <i>Madracis mirabilis</i> después de su exposición a dos concentraciones (2 mg/L y 11 mg/L) de extractos orgánicos de cianobacterias marinas y a controles de solución de sacarosa y etanol	151
<b>Tabla 6.1.</b> Descripción de las muestras de cianobacterias bentónicas arrecifales recolectadas en el Caribe colombiano utilizadas en los ensayos para evaluar actividad inhibitoria del <i>quorum sensing</i> y antifúngica.	164
<b>Tabla 6.2.</b> Resultados del ensayo de inhibición del <i>quorum sensing</i> para CV-17, los valores corresponden al valor promedio $\pm$ error estándar de la concentración mínima inhibitoria (CMI).	168
<b>Tabla 6.3.</b> Masa obtenida de las fracciones de los extractos 32, 36 y 42 obtenidas en el primer fraccionamiento mediante cromatografía en fase normal y porcentaje de inhibición de cada fracción sobre el crecimiento del hongo saprófito <i>D. salina</i> .	170

# Contenido

	Pag.
<b>RESUMEN</b> .....	<b>XVII</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XVIII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>XIX</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	<b>XXIII</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1. CAPÍTULO 1. BIOLOGÍA Y ECOLOGÍA DE LAS CIANOBACTERIAS</b> .....	<b>4</b>
1.1. CIANOBACTERIAS: GENERALIDADES, ESTRUCTURA Y CAPACIDADES METABÓLICAS .....	4
1.2. ECOLOGÍA DE LAS CIANOBACTERIAS .....	9
1.3. QUÍMICA Y ECOLOGÍA QUÍMICA DE LAS CIANOBACTERIAS.....	12
1.4. ESTUDIOS DE CIANOBACTERIAS MARINAS EN COLOMBIA .....	25
1.5. BIBLIOGRAFÍA .....	26
<b>2. CAPÍTULO 2. AFLORAMIENTOS DE CIANOBACTERIAS BENTÓNICAS ARRECIFALES EN EL CARIBE COLOMBIANO</b> .....	<b>35</b>
2.1. INTRODUCCIÓN.....	35
2.2. ÁREA DE ESTUDIO.....	36
2.2.1. Caribe colombiano. ....	36
2.2.2. Islas de San Andrés y Providencia. ....	37
2.2.3. Islas del Rosario.....	39
2.3. METODOLOGÍA.....	40
2.3.1. Sitios de muestreo.....	40
2.3.2. Recolección de las cianobacterias.....	41
2.3.3. Obtención de extractos orgánicos a partir de los tapetes de cianobacterias.....	42
2.3.4. Descripción de los afloramientos e identificación morfológica de las principales especies de cianobacterias presentes en los mismos.....	42
2.3.5. Identificación molecular de cianobacterias presentes en los afloramientos .....	43
2.4. RESULTADOS .....	47
2.4.1. Descripción de los afloramientos de cianobacterias bentónicas en las áreas de estudio 47	
2.4.2. Descripción microscópica de las principales especies de cianobacterias encontradas afloramientos .....	57
2.4.3. Identificación molecular de cianobacterias presentes en los afloramientos .....	73
2.5. DISCUSIÓN.....	78
2.6. BIBLIOGRAFÍA .....	81



<b>3. CAPÍTULO 3. ABUNDANCIA Y EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LOS AFLORAMIENTOS DE CIANOBACTERIAS.....</b>	<b>87</b>
3.1. INTRODUCCIÓN.....	87
3.1.1. Abundancia de los tapetes de cianobacterias marinas bentónicas y su relación con variables fisicoquímicas locales.....	88
3.1.2. Evaluación de la toxicidad de los afloramientos de cianobacterias del Caribe colombiano mediante en ensayo con <i>Artemia salina</i> .....	88
3.2. METODOLOGÍA.....	90
3.2.1. Abundancia de los tapetes de cianobacterias marinas bentónicas y su relación con variables fisicoquímicas locales.....	90
3.2.2. Evaluación de la toxicidad de los afloramientos de cianobacterias del Caribe colombiano mediante en ensayo con <i>Artemia salina</i> .....	91
3.3. RESULTADOS.....	93
3.3.1. Abundancia de los tapetes de cianobacterias marinas bentónicas y su relación con variables fisicoquímicas locales.....	93
3.3.2. Evaluación de la toxicidad de los afloramientos de cianobacterias del Caribe colombiano mediante en ensayo con <i>Artemia salina</i> .....	98
3.4. DISCUSIÓN.....	99
3.4.1. Abundancia de los tapetes de cianobacterias marinas bentónicas y su relación con variables fisicoquímicas locales.....	99
3.4.2. Evaluación de la toxicidad de los afloramientos de cianobacterias del Caribe colombiano mediante en ensayo con <i>Artemia salina</i> .....	104
3.5. BIBLIOGRAFÍA.....	106
<b>4. CAPITULO 4. EVALUACIÓN DEL POSIBLE PAPEL ECOLÓGICO DE LAS CIANOBACTERIAS MARINAS BENTÓNICAS ARRECIFALES: DISUASIÓN DE LA HERBIVORÍA.....</b>	<b>112</b>
4.1. INTRODUCCIÓN.....	112
4.2. ENSAYOS PARA EVALUAR LA DISUASIÓN DE LA ALIMENTACIÓN.....	114
4.2.1. Ensayo de disuasión del consumo con el gastrópodo Opistobranquio <i>Bursatella leachii</i> (Blainville, 1817).....	116
4.2.2. Ensayo de disuasión del consumo por parte de erizos <i>Lytechinus variegatus</i> (Lamarck, 1816).....	117
4.2.3. Ensayo de disuasión del consumo por peces herbívoros arrecifales <i>Stegastes planifrons</i> (Cuvier, 1830).....	119
4.3. METODOLOGÍA.....	120
4.3.1. Ensayo de disuasión del consumo con el gastrópodo Opistobranquio <i>Bursatella leachii</i> (Blainville, 1817).....	120
4.3.2. Ensayo de disuasión del consumo por parte de erizos <i>Lytechinus variegatus</i> (Lamarck, 1816).....	123
4.3.3. Ensayo de disuasión del consumo por peces herbívoros arrecifales <i>Stegastes planifrons</i> (Cuvier, 1830).....	125
4.4. RESULTADOS.....	126
4.4.1. Ensayo de disuasión del consumo con el gastrópodo Opistobranquio <i>Bursatella leachii</i> (Blainville, 1817).....	126
4.4.2. Ensayo de disuasión del consumo por parte de erizos <i>Lytechinus variegatus</i> (Lamarck, 1816).....	128

4.4.3. Ensayo de disuasión del consumo por peces herbívoros arrecifales <i>Stegastes planifrons</i> (Cuvier, 1830).....	130
4.4.4. Resultados generales .....	130
4.5. DISCUSIÓN .....	131
4.6. BIBLIOGRAFÍA.....	134
<b>5. CAPÍTULO 5. EVALUACIÓN DEL POSIBLE PAPEL ECOLÓGICO DE LAS CIANOBACTERIAS MARINAS BENTÓNICAS ARRECIFALES: INTERACCIONES ALELOPÁTICAS CON EMBRIONES DE CORAL Y CORALES ADULTOS.....</b>	<b>139</b>
5.1. INTRODUCCIÓN.....	139
5.2. EVALUACIÓN DEL EFECTO ALELOPÁTICO DE EXTRACTOS DE CIANOBACTERIAS CONTRA EMBRIONES DE CORAL Y CORALES ADULTOS.....	142
5.2.1. Ensayos de toxicidad contra embriones del coral <i>Montastrea annularis</i> (Ellis y Solander, 1786) .....	143
5.2.2. Evaluación del potencial alelopático de extractos orgánicos de cianobacterias sobre pólipos del coral <i>Madracis mirabilis</i> (=auretenra) (Locke, Weil y Coates, 2007).....	144
5.3. METODOLOGÍA.....	145
5.3.1. Ensayos de toxicidad contra embriones del coral <i>Montastrea annularis</i> (Ellis y Solander, 1786). .....	145
5.3.2. Evaluación del potencial alelopático de extractos orgánicos de cianobacterias sobre pólipos del coral <i>Madracis mirabilis</i> (=auretenra) (Locke, Weil y Coates, 2007).....	147
5.4 RESULTADOS.....	149
5.4.1 Ensayos de toxicidad contra embriones del coral <i>Montastrea annularis</i> (Ellis y Solander, 1786). .....	149
5.4.2 Evaluación del potencial alelopático de extractos orgánicos de cianobacterias sobre pólipos del coral <i>Madracis mirabilis</i> (=auretenra) (Locke, Weil y Coates, 2007).....	150
5.5 DISCUSIÓN .....	152
5.5.1 Ensayos de toxicidad contra embriones del coral <i>Montastrea annularis</i> (Ellis y Solander, 1786) .....	152
5.5.2 Evaluación del potencial alelopático de extractos orgánicos de cianobacterias sobre pólipos del coral <i>Madracis mirabilis</i> (=auretenra) (Locke, Weil y Coates, 2007).....	153
5.6 BIBLIOGRAFÍA .....	156
<b>6. INTERACCIONES DE EXTRACTOS DE CIANOBACTERIAS CON OTROS MICROORGANISMOS: INHIBICIÓN DEL QUORUM SENSING Y ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.....</b>	<b>161</b>
6.1. INTRODUCCIÓN.....	161
6.1.1. Inhibición del <i>quorum sensing</i> por extractos de cianobacterias.....	162
6.1.2. Evaluación de extractos de cianobacterias con actividad antifúngica.....	163
6.2. METODOLOGÍA.....	164
6.2.1. Inhibición del <i>quorum sensing</i> por extractos de cianobacterias.....	164
6.2.2. Evaluación de extractos de cianobacterias con actividad antifúngica.....	165
6.2.3. Aislamiento biodirigido de compuestos activos contra <i>D. salina</i> a partir de extractos de cianobacterias bentónicas arrecifales.....	166
6.3. RESULTADOS .....	167
6.3.1. Inhibición del <i>quorum sensing</i> por extractos de cianobacterias.....	167
6.3.2. Evaluación de extractos de cianobacterias con actividad antifúngica.....	168

---

6.3.3. Aislamiento biodirigido de compuestos activos contra <i>D. salina</i> a partir de extractos de cianobacterias bentónicas arrecifales .....	169
6.4. DISCUSIÓN .....	176
6.4.1. Inhibición del <i>quorum sensing</i> por extractos de cianobacterias.....	176
6.4.2. Evaluación de extractos de cianobacterias con actividad antifúngica .....	177
6.4.3. Aislamiento biodirigido de compuestos activos contra <i>D. salina</i> a partir de extractos de cianobacterias bentónicas arrecifales .....	178
6.5. BIBLIOGRAFÍA .....	179
<b>7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>183</b>



## Introducción

Las cianobacterias son bacterias con capacidades fotosintéticas que tienen una amplia distribución en ambientes terrestres, acuáticos e incluso formando relaciones simbióticas con diatomeas, esponjas, corales, líquenes, helechos y plantas superiores como las cicadáceas (Cox, *et al.*, 2003; Banack *et al.*, 2007; Usher, 2008; Paerl y Paul, 2012). En el medio marino, se encuentran en una gran cantidad de hábitats incluyendo litorales rocosos, playas arenosas, manglares, marismas y pantanos. En arrecifes coralinos, dada su abundancia durante ciertas épocas y en ciertas localidades, las cianobacterias pueden llegar a jugar un papel similar al de las algas en términos de producción primaria y relaciones con herbívoros (resumido en Paul *et al.*, 2001).

Las cianobacterias han demostrado ser una fuente excepcional de metabolitos con estructura inusual y potente actividad biológica (Burja *et al.*, 2001; Tan 2007; Berry *et al.*, 2008). Los metabolitos aislados de cianobacterias han mostrado tener propiedades icthiotóxicas (Thacker *et al.*, 1997), disuasoras de la herbivoría (Nagle y Paul, 1998; Cruz-Rivera y Paul, 2007), antimicrobianas (Issa, 1999; Valdor y Aboal, 2007; Martins *et al.*, 2008), molusquicidas (Pereira *et al.*, 2010) e irritantes por contacto (Osborne *et al.*, 2001; Werner *et al.*, 2012), sugiriendo que estos compuestos tienen un papel defensivo en contra del consumo y los competidores (Nagle y Paul, 1998, Osborne *et al.*, 2001). Adicionalmente, algunos de estos metabolitos han mostrado ser muy activos en pruebas *in vitro* como agentes antivirales, anti-HIV, anticáncer, antitumorales, antibióticos y antifúngicos, evidenciando de esta manera su potencial como fármacos, e incluso se ha evaluado su uso potencial como herbicidas. Algunos de los compuestos aislados de cianobacterias bentónicas, han dado origen a algunos derivados sintéticos que han mostrado ser muy activos en pruebas de citotoxicidad y han permitido el desarrollo de moléculas promisorias para el tratamiento de tumores sólidos, algunas de las cuales ya se hallan en fases clínicas avanzadas (Luesch *et al.*, 2002; Tan, 2007).

Numerosas especies de cianobacterias dulceacuícolas y recientemente algunas especies marinas han estado implicadas en eventos de afloramientos masivos tóxicos (CyanoHABs por sus siglas en inglés). Estos afloramientos se han reportado alrededor del mundo en lagos eutróficos, reservorios de agua y aguas costeras donde causan toxicidad en animales y riesgos a la salud humana (Miller *et al.*, 2010).

Las cianobacterias bentónicas que forman los afloramientos crecen sobre el sustrato formando biopelículas o gruesos tapetes de color oscuro, generalmente violeta-rojizo o marrón. El fenómeno se presenta estacionalmente y ha sido reportado en Florida (Paul *et al.*, 2005), en Bahamas, Belize y St. John en las Islas Vírgenes Americanas (Ritson-Williams *et al.*, 2005), Guam (Pennings *et al.*, 1997; Nagle y Paul, 1998; Thacker y Paul, 2001) y Australia (Dennison *et al.*, 1999), Micronesia y Hawaii (resumido en Kuffner *et al.*, 2006). Los afloramientos en Guam y Australia, por su extensión, persistencia y toxicidad, han ocasionado mortandad de peces, así como cuantiosas pérdidas económicas y problemas de salud en los habitantes o visitantes de las zonas costeras. Mamíferos y reptiles marinos como manatíes y tortugas, pueden también ser impactados directamente afloramientos de cianobacterias (Landsberg *et al.*, 1999; Arthur *et al.*, 2006; Harr *et al.*, 2008). Adicionalmente hay que destacar que las cianobacterias bentónicas son

con frecuencia, los organismos dominantes que colonizan el esqueleto coralino posterior al fenómeno de blanqueamiento (Díaz-Pulido y McCook, 2002).

Las causas de los CyanoHABs en aguas dulces y salobres han sido minuciosamente estudiadas (Paerl *et al.*, 2011; Paerl y Paul, 2012). Sin embargo, los afloramientos de cianobacterias bentónicas marinas no se comprenden del todo aún. Normalmente se producen en aguas poco profundas. Factores ambientales tales como altas temperaturas, bajo oleaje y la disponibilidad de nutrientes como fósforo, nitrógeno y hierro se han relacionado con la formación de los afloramientos (Kuffner y Paul, 2004; Albert *et al.*, 2005; Ahern *et al.*, 2007, 2008). La persistencia de éstos por su parte, se ha correlacionado con la producción de compuestos que disuaden el consumo y baja paladeabilidad de las cianobacterias a la mayoría de herbívoros generalistas, (Thacker *et al.* 1997, Nagle y Paul, 1998, Thacker y Paul, 2004, Kuffner *et al.*, 2006, Paerl *et al.* 2011). Las cianobacterias bentónicas marinas también muestran propiedades alelopáticas contra corales adultos (Ritson-Williams *et al.*, 2005; Titlyanov *et al.*, 2007) y pueden inhibir el reclutamiento de larvas de corales y octocorales (Kuffner y Paul, 2004; Kuffner *et al.*, 2006). Los afloramientos de cianobacterias marinas bentónicas se desarrollan rápidamente, cubriendo vastas zonas en un período de pocas semanas. Conforme avanza el afloramiento, las cianobacterias crecen sobre los organismos bentónicos, generando usualmente anoxia en los sedimentos y aguas adyacentes (Albert *et al.*, 2005). De esta manera, la gran cantidad de biomasa de cianobacterias y las grandes extensiones de sustrato cubiertas por las mismas durante los afloramientos, pueden constituir un riesgo para los corales y otros organismos arrecifales.

Los afloramientos de cianobacterias marinas bentónicas han aumentado en frecuencia y extensión en zonas costeras que reciben aportes importantes de nutrientes provenientes de aguas residuales, escorrentía y aguas subterráneas, así como resultado de alteraciones climáticas e hidrológicas a gran escala como el calentamiento global (resumido en Ahern *et al.*, 2008; Paerl, 2009). Géneros oportunistas como *Lyngbya* pueden dispersarse y colonizar tanto ambientes de agua dulce como marinos, compitiendo con otros organismos acuáticos y obteniendo ventajas que se derivan claramente de la eutrofización y el cambio climático (Paerl, 2009)

Aproximadamente dos tercios de los arrecifes coralinos del Caribe están amenazados por actividades humanas como el desarrollo costero, vertimiento de aguas residuales, aportes de sedimentos, contaminación y sobreexplotación de recursos pesqueros (Burke y Maidens, 2004). Si bien no se ha determinado el impacto económico del blanqueamiento coralino, las enfermedades de corales y los afloramientos de cianobacterias, es claro que éstos han provocado cambios significativos en las comunidades arrecifales de la región (Burke y Maidens, 2004). Por lo tanto, es importante evaluar el impacto de los afloramientos de cianobacterias a escalas locales con el fin de comprender mejor los factores ambientales que están relacionados con estos fenómenos, su dinámica temporal y sus implicaciones ecosistémicas.

En el Caribe Colombiano se han observado afloramientos de cianobacterias marinas bentónicas en zonas arrecifales de las Islas del Rosario, San Andrés y Providencia. Estos afloramientos se han vuelto comunes y frecuentes en dichas zonas, sin embargo, no existen reportes formales sobre estos eventos. Tampoco se conocen las especies dominantes de cianobacterias presentes en los afloramientos ni se tienen reportes de la intensidad en cuanto a la cobertura de los mismos. Además, es muy poco lo que se conoce en cuanto a la biodiversidad marina de este tipo de eubacterias en Colombia.

En el Caribe colombiano se han observado afloramientos de cianobacterias bentónicas en áreas arrecifales de las Islas del Rosario (Obs. pers.; Puyana, com. pers.), San Andrés y Providencia (Puyana, com. pers.) y Santa Marta (Pizarro com. pers.). Sin embargo, no existen registros formales de los afloramientos de cianobacterias marinas en el Caribe colombiano. Adicionalmente, existen muy pocos reportes de cianobacterias marinas arrecifales y hasta el momento sólo se han registrado 8 especies en el Caribe colombiano (Díaz-Pulido y Díaz-Ruiz, 2003; Díaz *et al.*, 2003), aunque recientemente, Reyes *et al.* (en prensa) reportaron recientemente para el archipiélago de San Andrés y Providencia las cianobacterias *Brachytrichia quoyi*, *Lyngbya penicilliformis*, *Calothrix confervicola*, *Phormidium dimorphum* y *Phormidium roseum*. Tales estudios no presentan información acerca de los afloramientos, las especies que los forman, su toxicidad o efectos ecológicos en los arrecifes.

Trabajos como los realizados por Quintana (2011) y Bayona (2012), constituyen los primeros aportes al conocimiento de la actividad biológica y toxicidad de las cianobacterias marinas encontradas en los afloramientos del Caribe colombiano. Los autores realizaron estudios químicos de tapetes de cianobacterias compuestos por *Oscillatoria nigroviridis* y ensamblajes de *Lyngbya* spp. encontrando para algunos de ellos actividad citotóxica muy promisoría.

Debido a lo anterior, y teniendo en cuenta el desconocimiento de la composición de especies que forman los afloramientos de cianobacterias bentónicas arrecifales, su abundancia, los efectos nocivos que los pueden tener sobre los corales, las ventajas ecológicas que les ofrece la producción de compuestos anti-herbivoría para lograr persistir y ser muy abundantes, además de la producción de compuestos que puedan cumplir un papel protectorio contra otros microorganismos, que a su vez pueden tener aplicaciones en la industria, surgió la necesidad de realizar este trabajo de tesis en el cual se estudiaron de manera formal los aspectos aquí mencionados.

Nota: Las referencias bibliográficas aquí citadas se encuentran dentro de la bibliografía del Capítulo 1.

# 1. Capítulo 1. Biología y ecología de las cianobacterias

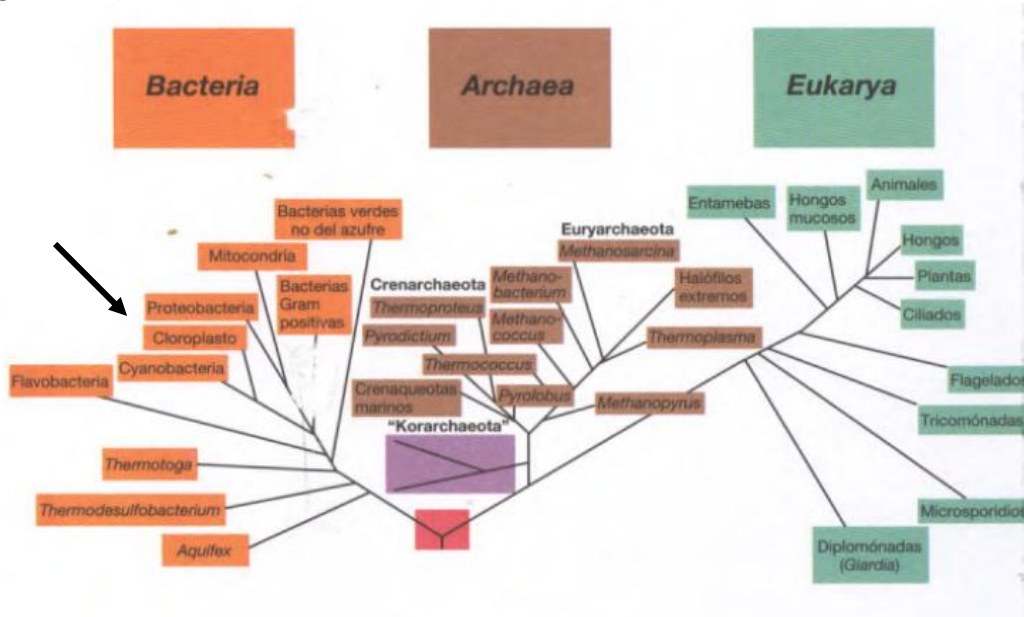
## 1.1. Cianobacterias: Generalidades, estructura y capacidades metabólicas

Las cianobacterias son eubacterias fotosintéticas oxigénicas que aparecieron en el planeta hace aproximadamente unos 3.400 millones de años, fecha de la que data el más antiguo microfósil de una posible cianobacteria (Schopf, 1993). Fue hasta hace 2.200 a 2.400 millones de años donde los niveles de oxígeno libre en la atmósfera aumentaron de  $10^{-5}$  a  $10^{-1}$  veces la concentración actual durante el “Gran Evento de Oxigenación” GOE (por sus siglas en inglés), momento en el cual la materia orgánica y el hierro (II) que habían capturado el oxígeno producido por cianobacterias durante 1.100 millones de años, se saturaron, permitiendo que el exceso de oxígeno libre se acumulara en la atmósfera (Goldblatt *et al.*, 2006). Gracias a los aportes de oxígeno libre proveniente de la fotosíntesis oxigénica de las cianobacterias, la atmósfera y las condiciones de los océanos cambiaron de ser reductoras y anóxicas a ser oxidantes y ricas en oxígeno (Czaja, 2010). Este evento causó una de las mayores extinciones en la historia del planeta, eliminando una gran cantidad de los habitantes anaeróbicos de la tierra. Sin embargo, la disponibilidad de oxígeno permitió también que la vida evolucionara en diversas formas, siendo la respiración aerobia uno de los metabolismos más eficientes en cuanto a la generación de energía (Madigan *et al.*, 2003).

De igual manera se le atribuye a las cianobacterias la aparición de las plantas superiores según la teoría de la endosimbiosis. La teoría plantea la fagocitosis o inclusión de una cianobacteria primitiva dentro del citoplasma del otro organismo. Finalmente, tras el establecimiento de una estrecha simbiosis y procesos de coevolución que tal vez tomaron cerca de 1.000 millones de años, la cianobacteria primitiva llegó a convertirse en un cloroplasto (Prescott, 2002; Gould *et al.*, 2008). La teoría de la endosimbiosis y la aparición de los cloroplastos a partir de cianobacterias es bastante consistente y siguen apareciendo cada vez más evidencias de tipo molecular y estructural que fortalecen esta idea (Hoiczyk y Hansel, 2000; Prescott, 2002; Madigan *et al.* 2003; Gould *et al.*, 2008). Los cloroplastos poseen ribosomas que tienen una velocidad constante de sedimentación en ultracentrífuga de 70S, carácter propio de los procariotas. Adicionalmente, a nivel de las secuencias del RNA ribosomal, los cloroplastos se sitúan en una cercana relación filogenética con las cianobacterias (Figura 1.1) (Madigan *et al.*, 2003). Tras las primeras secuenciaciones completas de cianobacterias, se demostraron nuevas homologías con los sistemas de translocación de péptidos de cloroplastos de arvejas y la evolución de los fitocromos a partir de moléculas similares en las cianobacterias (Hoiczyk y Hansel, 2000).



**Figura 1.1.** Árbol filogenético obtenido a partir de la comparación de secuencias moleculares del RNA ribosomal 16S y 18S de representantes de los tres dominios, Bacteria, Archaea y Eukarya. La flecha negra indica la ubicación de los cloroplastos y las cianobacterias. En el árbol se observa claramente la cercana posición filogenética entre cloroplastos y cianobacterias. Tomado de Madigan *et al.* (2003).



Usualmente las cianobacterias se han clasificado de acuerdo con las características de sus envolturas procariontas como Gram positivas o Gram negativas. Esta clasificación, sin embargo, simplifica la compleja y diversa estructura de las paredes y membranas celulares de estos microorganismos, las cuales presentan caracteres que combinan atributos de los dos grandes grupos (Hoiczyk y Hansel, 2000). La pared celular de las bacterias está formada por múltiples capas del polímero peptidoglicano y puede tener diferentes espesores. Las bacterias Gram negativas tienen paredes de 2-6 nm de espesor, mientras que las Gram positivas tienen paredes de 20-40 nm. Las cianobacterias presentan paredes de espesor variable, generalmente mayores que las Gram negativas y menores que las Gram positivas. Sin embargo, existe un amplio rango de variación en este aspecto ya que géneros como *Synechococcus* presentan paredes de 10 nm de espesor mientras que *Oscillatoria princeps* presenta una pared de 700 nm (Hoiczyk y Hansel, 2000).

De igual manera, el grado de entrecruzamiento de los polímeros de peptidoglicano en las paredes de las cianobacterias presenta valores intermedios muy cercanos a los de las bacterias Gram positivas. Al tiempo que, al igual que en el caso de las bacterias Gram negativas, las cianobacterias poseen membrana externa y muchas de ellas presentan capas S. Éstas corresponden a capas bien estructuradas compuestas generalmente de proteínas o glicoproteínas que se encuentran en la superficie de algunos procariontas, como las capas más externas asociadas a la membrana externa en bacterias Gram negativas o a la pared de peptidoglicano en las bacterias Gram positivas. Estas capas cumplen diversas funciones, sobretodo de protección contra el estrés ambiental o el ataque por otros organismos (Prescott, 2002). Las membranas externas de las cianobacterias contienen además componentes que no están usualmente presentes en las bacterias Gram negativas como por ejemplo carotenos y

algunos ácidos grasos inusuales como el ácido beta hidroxipalmitico (Hoiczky y Hansel, 2000). Dada la gran diversidad de las envolturas de las cianobacterias brevemente explicada aquí, los estudios para establecer la composición y características generales de las envolturas celulares propias para este grupo continúan en desarrollo en la actualidad (Hoiczky y Hansel, 2000; Smarda *et al.*, 2002).

De otro lado, Las cianobacterias poseen clorofila a como pigmento fotosintético principal, y presentan al igual que los eucariotas dos fotosistemas, por lo cual pueden utilizar el agua como donador de electrones a través del fotosistema II realizando fotosíntesis oxigénica (Prescott, 2002). El tener clorofila a, al igual que las plantas, hace a las cianobacterias diferentes de las demás bacterias fotosintéticas, que no presentan clorofila a y cuyo pigmento principal es la bacterioclorofila que presenta modificaciones en el sistema porfirínico (Prescott, 2002). Además de las clorofilas, la mayoría de especies de cianobacterias producen ficobilinas, pigmentos accesorios que confieren a las cianobacterias una ventaja competitiva frente a otros organismos fotosintéticos ya que pueden aprovechar otras longitudes de onda en el espectro de luz (Prescott, 2002; Lodish *et al.*, 2003; Madigan *et al.*, 2003). Las ficobilinas están formadas por un anillo de tetrapirrol unido a una proteína, siendo las más importantes la ficocianina y la ficoeritrina que dan un color azul o rojizo, respectivamente, y que transfieren energía al fotosistema II. Estos pigmentos absorben longitudes de onda diferentes a las de las clorofilas (620-640 nm para la ficocianina y 550 nm para la ficoeritrina, mientras que la clorofila a tiene picos de absorción a 665 y 430 nm y la clorofila b a 645 nm). Los pigmentos fotosintéticos de las cianobacterias y los componentes de la cadena de transporte de electrones están localizados en las membranas tilacoidales las cuales están alineadas con arreglos membranales llamados ficobilisomas (Prescott, 2002).

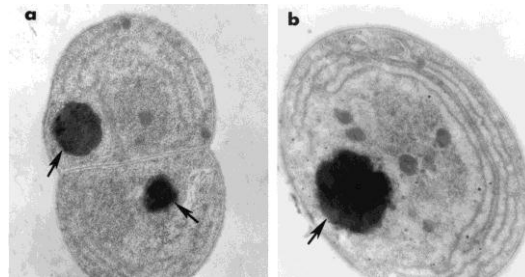
Aunque las cianobacterias son generalmente fotótrofas, algunas especies como *Oscillatoria limnetica* puede oxidar el sulfuro de hidrógeno en vez del agua para realizar fotosíntesis anoxigénica bajo condiciones anaeróbicas. Otras especies como *Microcoleus chthonoplastes* pueden oxidar algunos carbohidratos y crecer heterotróficamente (Prescott, 2002; Madigan *et al.*, 2003; Urmeneta *et al.*, 2003).

La fuente de carbono para las cianobacterias es el CO<sub>2</sub> el cual es fijado a través del ciclo de Calvin. La fijación del carbono se realiza en los carboxisomas, cuerpos de inclusión poliédricos, donde se encuentra la enzima ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa (rubisco) y otras proteínas utilizadas en el ciclo de Calvin. El carbono es almacenado en forma de glucógeno (Prescott, 2002). Además, las cianobacterias pueden usar el bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) como fuente de carbono inorgánico (Paerl y Paul, 2012).

Numerosas especies de cianobacterias tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (N<sub>2</sub>) mediante el complejo de enzimas nitrogenasas. Así pueden obtener este elemento en medios oligotróficos o limitantes del mismo y competir eficientemente contra otros organismos. La fijación de nitrógeno atmosférico es un proceso que debe realizarse en condiciones anóxicas ya que la enzima nitrogenasa es muy sensible al oxígeno. Algunas cianobacterias filamentosas pueden modificar algunas células de sus tricomas en heterocistos, células con paredes muy gruesas que previenen o disminuyen considerablemente la entrada de oxígeno y que carecen del fotosistema II. Por esta razón no se produce oxígeno dentro de ellas, aunque sí presentan el fotosistema I que aporta ATP fundamental para el proceso. El nitrógeno es transferido a las otras

células en forma de glutamina. Otras especies diazotróficas que no presentan heterocistos pueden fijar el nitrógeno en la noche o en las porciones anóxicas de los tapetes que conforman (Prescott, 2002; Madigan *et al.*, 2003; Berman-Frank *et al.*, 2003). En cianobacterias, el nitrógeno es usualmente almacenado como reserva en forma de gránulos de cianoficina (Figura 1.2), un polímero de arginina y ácido aspártico que al acumularse forma cuerpos de inclusión característicos, fácilmente observables por microscopía óptica (Prescott, 2002; Madigan *et al.*, 2003).

**Figura 1.2** Microfotografías electrónicas de células de *Synechococcus* sp. Las flechas muestran los gránulos de cianoficina (Tomado de Wingard *et al.*, 2002).

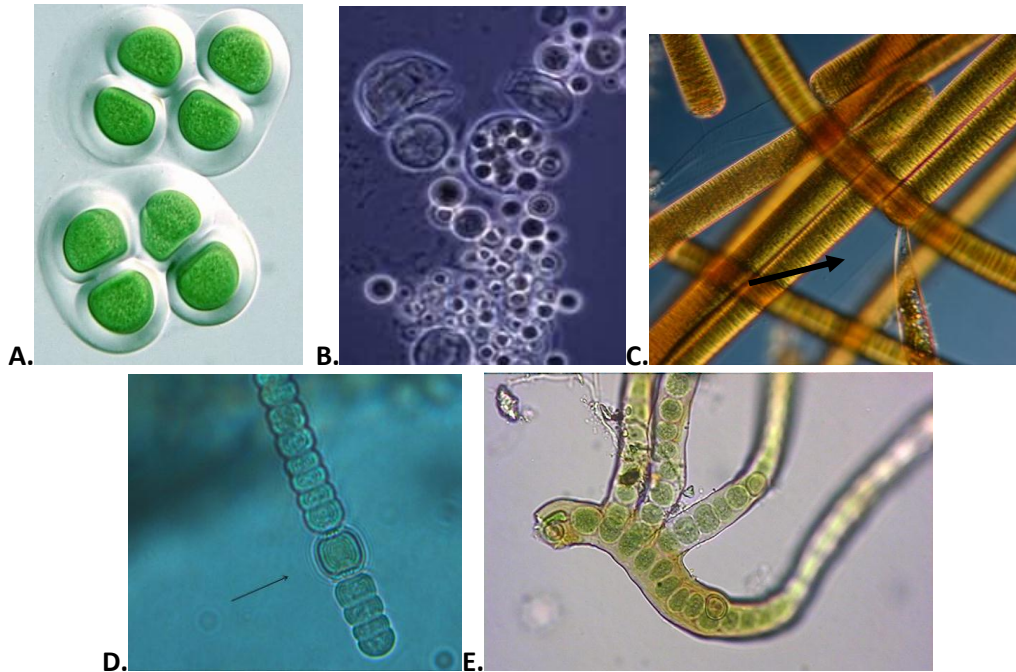


Las cianobacterias pueden ser unicelulares, formar filamentos ó aglomeraciones. Según su morfología, patrones de agregación y tipo de segmentación se pueden dividir en cinco subsecciones (Figura 1.3). Las principales características de las subsecciones se muestran en la Tabla 1.1.

**Tabla 1.1.** Subsecciones de la clasificación de las cianobacterias según su morfología y patrones de agregación y segmentación (Según Prescott, 2002). I Cocos o bacilos unicelulares, agregados no filamentosos. II Cocos o bacilos unicelulares unidos en agregados. III Filamentos sin ramificaciones con tricomas formados sólo por células vegetativas. IV Filamentos sin ramificaciones con células especializadas. V Filamentos ramificados y/o formados por más de una fila de células.

Sub-sección	Crecimiento y reproducción	Otras características	Géneros representativos
I	Fisión binaria, gemación	Casi siempre inmóviles, sin heterocistos	<i>Chroococcus, Gloeotheca, Gleocapsa, Prochloron</i>
II	Fisión múltiple para formar baeocitos o exoditos	Algunos baeocitos son móviles, sin heterocistos	<i>Pleurocapsa, Dermocapsa, Chamaesiphon</i>
III	Fisión binaria en un solo plano, fragmentación para formar hormogonias	Móviles, sin heterocistos	<i>Lyngbya, Oscillatoria, Prochlorothrix, Spirulina, Pseudoanabaena</i>
IV	Fisión binaria en un solo plano, fragmentación para formar hormogonias	Móviles, con heterocistos, pueden producir aquinetos	<i>Anabaena, Nostoc, Cyndrospermopsis, Aphanizomenon,</i>
V	Fisión binaria en más de un plano. Forman hormogonias	Pueden producir aquinetos, con heterocistos, gran complejidad y diferenciación	<i>Fischerella, Stigonema, Geitleria</i>

**Figura 1.3** Microfotografías de representantes de cada una de las cinco subsecciones de las cianobacterias según su morfología y patrones de agregación y segmentación. **A.** Subsección I. *Chroococcus* sp. Dimensiones 31 x 35  $\mu\text{m}$ . Imagen tomada de: URL: [http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/Images/Prokaryotes/Chroococcaceae/Chroococcus/sp\\_05g.jpg](http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/Images/Prokaryotes/Chroococcaceae/Chroococcus/sp_05g.jpg). **B.** Subsección II. *Dermocarpa* sp. imagen tomada de Madigan *et al.* (2003). **C.** Subsección III. *Lyngbya* sp. fotografía tomada para este trabajo. **D.** Subsección IV. *Anabaena* sp. fotografía tomada para este trabajo, la flecha muestra un heterocisto. **E.** Subsección V. *Stigonema* sp. Imagen tomada de [http://www.una.edu/faculty/pgdavison/stigonema\\_with\\_true\\_branching\\_an.htm](http://www.una.edu/faculty/pgdavison/stigonema_with_true_branching_an.htm)



Se considera que las cianobacterias poseen gran eficiencia para la captación y almacenamiento de nutrientes y energía (N, P, Fe, elementos traza y luz) (Paerl y Paul, 2012). Por ejemplo, las cianobacterias pueden capturar y almacenar eficientemente el hierro debido a la capacidad de producir hidroxamatos o compuestos como la anaquelina o la sinecobactina que son conocidos sideróforos (Prescott, 2002; Rastogi y Sinha, 2009).

Numerosas especies de cianobacterias tienen la capacidad de realizar migraciones verticales en la columna de agua modificando su flotabilidad mediante vesículas de gas. Esta capacidad les confiere una gran ventaja frente a otros organismos fotótrofos en el medio acuático ya que pueden alcanzar mejores condiciones de luz cerca de la superficie o tener acceso a aguas más profundas y ricas en nutrientes (Paerl y Paul, 2012). Otras tienen la capacidad de desplazarse sobre el sustrato mediante varios mecanismos, variando tensión superficial diferencial por secreción de limo o mucílago a través de un complejo de canales y poros conocido como *Junctional Pore Complex* JPC o la producción de ondas en la membrana externa (Hoiczky y Hansel, 2000; Prescott, 2002).

## 1.2. Ecología de las cianobacterias

Las cianobacterias se encuentran ampliamente distribuidas en todo el mundo tanto en ambientes terrestres como acuáticos, desde los polos hasta los desiertos y manantiales de aguas calientes (Madigan *et al.*, 2003; Paerl y Paul, 2012), en la superficie de rocas e incluso viviendo sobre o dentro de otros organismos en relaciones simbióticas muy estrechas (Usher, 2008). Se han encontrado simbiosis de cianobacterias con diatomeas, esponjas, corales, líquenes, el helecho de agua *Azolla* y algunas cicadáceas (Cox *et al.*, 2003; Madigan *et al.*, 2003; Banack *et al.*, 2007; Paerl y Paul, 2012).

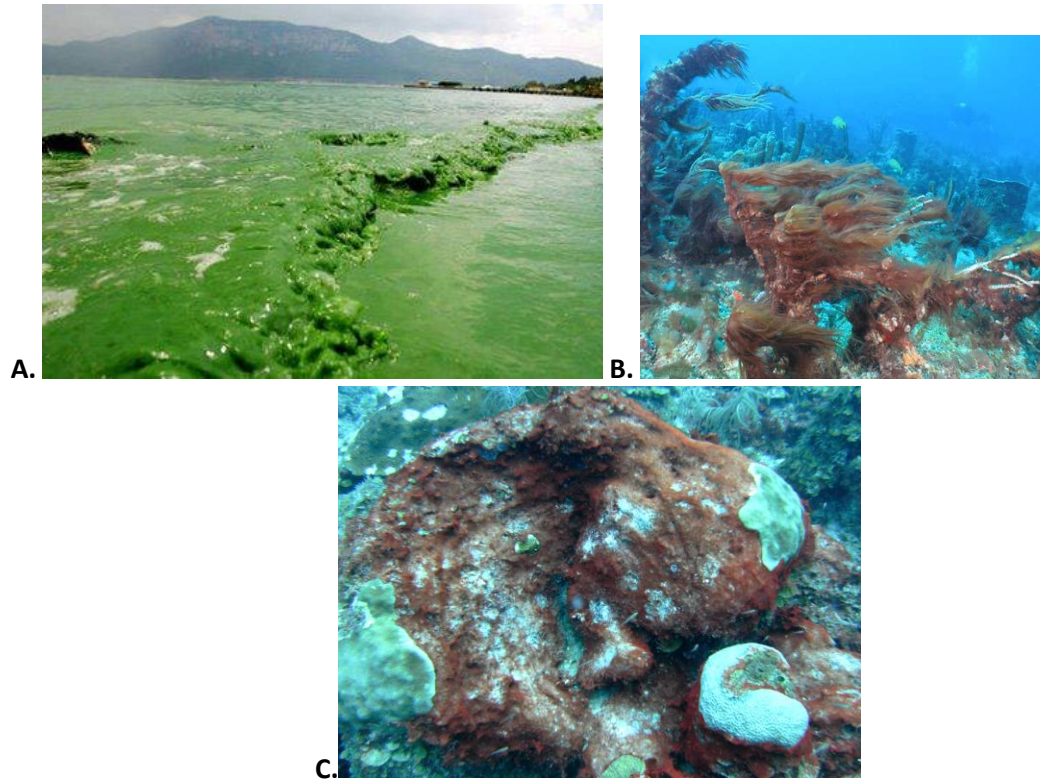
Las cianobacterias son muy importantes en ambientes acuáticos tanto marinos como de agua dulce y pueden encontrarse libres en la columna de agua (especies planctónicas) o sobre el sustrato como arena, rocas o sobre organismos como epibiontes (especies bentónicas). En arrecifes coralinos, dada su abundancia durante ciertas épocas del año y en algunas localidades, las cianobacterias bentónicas pueden llegar a jugar un papel similar y en ocasiones mucho más importante que las algas en términos de producción primaria, relaciones con herbívoros y competencia con otros organismos bentónicos como los corales (resumido en Paul *et al.*, 2001).

Las cianobacterias pueden generar fenómenos conocidos como afloramientos o *blooms* que son eventos temporales de duración variable, durante los cuales ocurre la reproducción y proliferación acelerada y masiva de estos microorganismos (Hernández y Méndez, 2007) (Figura 1.4). El presente trabajo se centró en los afloramientos de cianobacterias marinas bentónicas arrecifales del Caribe colombiano.

Además de las ventajas antes mencionadas que las cianobacterias presentan frente a otros organismos (su gran capacidad de adquirir y almacenar nutrientes, la fijación de nitrógeno, la producción de diversos pigmentos para aprovechar distintas longitudes de ondas del espectro de la luz, su capacidad de realizar migraciones verticales y ser más eficientes que las algas para captar el CO<sub>2</sub>), las cianobacterias producen una variedad de compuestos orgánicos a los cuales se les ha atribuido un papel defensivo frente a los herbívoros (Nagle y Paul, 1998; Paul *et al.*, 2001). Los herbívoros, al consumir selectivamente otros fotótrofos como las macroalgas, remueven posibles competidores de las cianobacterias permitiéndoles expandirse aún más y perdurar en el tiempo y el espacio (Paul *et al.*, 2005).

Actividades antropogénicas como la agricultura, el uso de fertilizantes, el vertimiento de aguas residuales producto del desarrollo urbano e industrial, aportan altas cantidades de nutrientes a los cuerpos de agua dulces y marinos (Paerl y Paul, 2012). Los aportes de nutrientes claves para el crecimiento de organismos fotótrofos como plantas, algas y cianobacterias, controlan en gran medida la producción primaria acuática tanto en ambientes dulceacuícolas (donde es más determinante el fósforo) como en ambientes marinos (donde es más determinante el nitrógeno). El sobre-enriquecimiento de nutrientes en los cuerpos de agua viene generando cada vez con mayor intensidad problemas de eutrofización y consecuentes afloramientos algales y de cianobacterias (Figura 1.4). Estos afloramientos, con la respiración durante las horas de oscuridad, generan anoxia y consecuente mortandad de peces y otros organismos acuáticos. Además, si las especies involucradas producen toxinas, éstas pueden generar intoxicaciones que afectan animales y humanos (Paerl, 2009).

**Figura 1.4** Afloramientos de cianobacterias en **A.** Ambientes dulceacuícolas, Lago Taihu (China) (Paerl y Paul, 2012). **B.** Ambientes marinos en las costas del condado de Broward, Florida (EEUU) (Tomado de Paul *et al.*, 2005). **C.** Ambientes marinos en la Isla de Providencia (Caribe colombiano) Fotografía tomada durante los muestreos del presente trabajo.



Uno de los factores preocupantes para los arrecifes de coral alrededor del mundo es la colonización masiva de estos ambientes por algas y cianobacterias bentónicas (resumido en Paul *et al.*, 2005). Existe una fuerte competencia por el espacio entre corales, algas y cianobacterias marinas que puede determinar la estructura, composición y abundancia de estos tres grupos (Díaz-Pulido y McCook, 2002). En eventos donde la abundancia de cianobacterias o macroalgas aumenta de manera masiva como en los afloramientos, aumentan los eventos de sobrecrecimiento de las mismas sobre los corales. Se ha demostrado que dicho sobrecrecimiento de macroalgas ó cianobacterias sobre los corales puede causar efectos deletéreos sobre la salud de los mismos (Kuffner y Paul, 2004; Kuffner *et al.*, 2006; Titlyanov *et al.*, 2007). La creciente ocurrencia, frecuencia e intensidad de los afloramientos de cianobacterias bentónicas constituye una gran amenaza para los arrecifes coralinos alrededor del mundo (Paul *et al.*, 2005). En arrecifes de Caribe colombiano se ha observado el crecimiento de diferentes tapetes de cianobacterias marinas bentónicas sobre diferentes especies de corales escleractíneos y corales duros, y en varias ocasiones es evidente la muerte del tejido coralino que está en contacto directo con dichos tapetes.

En términos generales, las cianobacterias son importantes productores de compuestos con actividad biológica, muchos de ellos tóxicos como por ejemplo las microcistinas, heptapéptidos producidos por especies de cianobacterias de agua dulce de los géneros *Microcystis*, *Anabaena*,

*Planktothrix*, *Anabaenopsis*, *Nostoc* y *Hapalosiphon*. Las microcistinas son potentes hepatotoxinas que pueden causar serios daños en el hígado, los riñones y finalmente la muerte a animales y el hombre a muy bajas concentraciones (Codd *et al.*, 2005; Wiegand y Pflugmacher, 2005). Otras toxinas muy potentes, también activas a concentraciones sumamente bajas, son las saxitoxinas y las anatoxinas producidas por cianobacterias de los géneros *Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Lyngbya*, *Cylindrospermopsis*. Éstas tienen efectos neurotóxicos causando parálisis y la muerte en vertebrados ya que bloquean los canales de sodio en las neuronas o se unen irreversiblemente a los receptores de acetilcolina (Wiegand y Pflugmacher, 2005; Aráoz, *et al.*, 2010).

En diferentes lagos del mundo como el lago Erie en Norteamérica, el lago Winnipeg en Canadá, el lago Victoria en África, los lagos Biwa y Kasimaguara en Japón y el lago Taihu en China, entre otros, se han presentado afloramientos de cianobacterias tóxicas, generando graves amenazas para los suministros de agua potable, para la sostenibilidad económica y ecológica y por ende para las poblaciones de dichos países (Paerl *et al.*, 2011). De igual forma se han reportado afloramientos de cianobacterias marinas bentónicas en diversas partes del mundo (Nagle y Paul, 1998; Paul *et al.*, 2005; Arthur *et al.*, 2006), y se ha documentado ampliamente el incremento de estos afloramientos que se han venido dando con mayor intensidad y frecuencia (Paerl y Paul 2012). La documentación de estos eventos ha permitido hacer el seguimiento de los afloramientos y sus consecuencias, así como la realización de estudios ecológicos y formular políticas ambientales para la contención de sus posibles efectos sobre los ecosistemas y sobre la salud humana (Paul *et al.*, 2005; Kuffner *et al.*, 2006; Paerl, 2009). En países como Australia (Albert *et al.*, 2005) y los Estados Unidos (Paul *et al.*, 2005), los afloramientos de la cianobacteria marina *Lyngbya majuscula* se han incrementado durante las últimas décadas generando graves problemas ecológicos sobre los arrecifes de coral y las praderas de pastos marinos, causando mortalidad masiva de peces y pérdidas para las pesquerías, el turismo y la salud de vertebrados marinos como manatíes (Harr *et al.*, 2008) y tortugas marinas (Landsberg *et al.*, 1999; Arthur *et al.*, 2006). *Lyngbya majuscula* puede también impactar la salud humana ya que puede producir toxinas muy irritantes a la piel (Osborne *et al.*, 2001; Werner *et al.*, 2012), los ojos y las vías respiratorias, adicionalmente tales toxinas son consideradas como promotoras de tumores (Landsberg *et al.*, 1999; Albert, *et al.*, 2005; Arthur *et al.*, 2006; Arthur *et al.*, 2008).

En diversas áreas arrecifales del Caribe colombiano se han observado afloramientos de cianobacterias bentónicas en áreas como las Islas del Rosario (Puyana com. pers.; Pizarro, com pers), San Andrés y Providencia (Puyana com. pers.) y Santa Marta (Pizarro, com pers). Sin embargo, estos afloramientos no han sido reportados formalmente aún y sólo se cuenta con reportes de la presencia de algunas especies de cianobacterias en el Caribe (Díaz-Pulido y Díaz-Ruiz, 2003; Díaz *et al.*, 2003), sin mencionar nada acerca de la ocurrencia temporal de los afloramientos, su extensión, composición, ni la evaluación de su posible toxicidad e implicaciones ecológicas sobre los arrecifes, datos que han empezado a ser aportados por los trabajos derivados del proyecto de investigación del cual hace parte esta tesis de maestría y los trabajos de Quintana (2011) y Bayona (2012).

### 1.3. Química y Ecología Química de las cianobacterias.

Un gran número de compuestos aislados a partir de cianobacterias presentan actividad biológica frente a diversos modelos biológicos. A algunos de estos compuestos se les ha atribuido un significado ecológico, pues podrían conferir ventajas para la supervivencia de las cianobacterias. Sin embargo, el papel ecológico de muchos otros compuestos no ha sido determinado aún (Hitzfeld *et al.*, 2000; Berry *et al.*, 2008). El papel que juega cada compuesto es dependiente de una gran cantidad de factores que en campo o en el laboratorio son difíciles de reproducir en su totalidad. Además, la evaluación de un solo compuesto en particular por sí solo es complicada, teniendo en cuenta que los compuestos no ocurren solos en condiciones naturales y también porque hay una gran cantidad de factores fisiológicos y medioambientales que actúan, sinérgica o antagónicamente, sobre los organismos involucrados en las interacciones. Esto hace que la investigación para esclarecer el papel ecológico de extractos y metabolitos de organismos marinos sea difícil. A pesar de lo anterior, existen diversos trabajos que han mostrado avances satisfactorios para esclarecer el papel ecológico de algunos de los extractos y compuestos aislados de cianobacterias marinas (Hay y Fenical, 1996; Nagle y Paul, 1998; Wiegand y Pflugmacher, 2005; Skindersoe *et al.*, 2008; Berry *et al.*, 2008; Meickle *et al.*, 2009; Matthew *et al.*, 2010). El estudio del papel ecológico de extractos y compuestos de organismos marinos debe ser enmarcado dentro de un contexto ecológico y demanda la realización de ensayos rigurosos y ecológicamente relevantes (Hay, 1996).

Se cree que la producción de algunos compuestos orgánicos por parte de las cianobacterias puede cumplir un papel defensivo frente los potenciales consumidores, patógenos o *fouling* (Skindersoe *et al.*, 2008), puede proveer ventajas ecológicas actuando como compuestos alelopáticos para competir eficientemente por espacio o nutrientes (Paul *et al.*, 2005; Valdor y Aboal, 2007; Titlyanov *et al.*, 2007), actuar como protectores frente al estrés ambiental (Sinha y Häder, 2008; Rastogi y Sinha, 2009) e incluso actuar como sustancias de reserva (Prescott, 2002).

En cuanto a la resistencia al estrés ambiental, se sabe que algunas cianobacterias producen pigmentos como scytoneminas, carotenoides y aminoácidos similares a las microsporinas (MAAs) los cuales ofrecen protección efectiva frente a la radiación ultravioleta (Sinha y Häder, 2008; Paerl y Paul, 2012). De igual manera, la producción de enzimas antioxidantes es también un ejemplo de compuestos con funciones protectoras ante variables ambientales adversas (Rastogi y Sinha, 2009).

También se ha reportado la producción de sideróforos, compuestos confieren ventajas ecológicas en la captación del hierro, elemento fundamental para el metabolismo de las cianobacterias (Prescott, 2002; Rastogi y Sinha, 2009). A continuación se presentan algunos sideróforos producidos por cianobacterias tales como las anaquelinas obtenidas de *Anabaena cylindrica* (Gademann, *et al.*, 2009) y las synecobactinas de *Synechococcus* sp. (Ito y Butler, 2005). (Figura 1.5).

En medios competitivos como los acuáticos, las cianobacterias pueden ser atacadas por virus (Shuttle y Chan, 1993; Sigee *et al.*, 1999), otras bacterias (Gumbo *et al.*, 2008; Sigee *et al.*, 1999), hongos (Puglisi *et al.*, 2007) y un amplio rango de consumidores, desde Protista (Sigee *et al.*, 1999) a invertebrados (Cruz-Rivera y Paul, 2000; Capper *et al.*, 2006a; Capper *et al.*, 2006b), peces

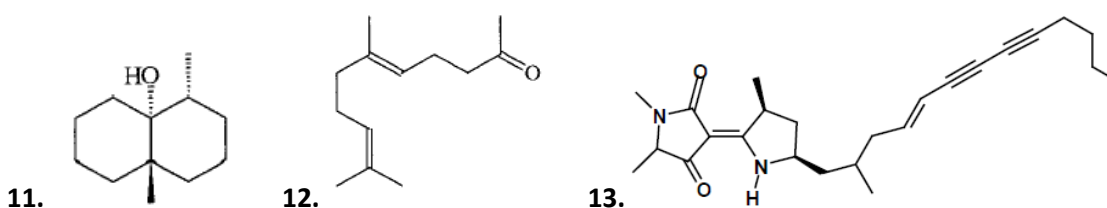






Existen también evidencias del efecto alelopático de extractos de cianobacterias sobre organismos bentónicos sésiles como los corales (Titlyanov *et al.*, 2007). Hay diversos reportes de tapetes de cianobacterias marinas que crecen sobre corales hermatípicos, octocorales, macroalgas y pastos marinos (Paul *et al.*, 2005; Ritson-Williams *et al.*, 2005; Arthur *et al.*, 2008), causando necrosis del tejido del coral o las macroalgas que están en contacto directo con éstas. La evidencia experimental sugiere que la producción de compuestos alelopáticos por parte de las cianobacterias les permite colonizar la superficie de los corales y macroalgas causando efectos deletéreos y ganando ese espacio como superficie de anclaje para su desarrollo con acceso a la luz. Al respecto, se ha evidenciado el efecto alelopático de la cianobacteria marina *Lyngbya majuscula* sobre el asentamiento y supervivencia de larvas de corales escleractíneos como *Acropora surculosa* y *Pocillopora damicornis* (Kuffner y Paul, 2004; Kuffner *et al.*, 2006). Otros aspectos relacionados con interacciones alelopáticas entre cianobacterias y corales serán tratados en más detalle en el Capítulo 5.

**Figura 1.8.** Estructuras de compuestos aislados de cianobacterias con efectos alelopáticos sobre otros organismos fotosintéticos. **11.** geosmina producida por varias especies de cianobacterias como *Anabaena* spp. *Lyngbya aestuarii* y *Oscillatoria amphibia* (Ikawa *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2008). **12.** geranilactona producida principalmente por cianobacterias del género *Microcystis* (Ikawa *et al.*, 2001). **13.** fischerelina A aislada de *Fischerella* sp. (Berry *et al.*, 2008).



Las cianobacterias también pueden encontrarse en relaciones simbióticas estrechas con diversos invertebrados marinos como esponjas y ascidias, o pueden ser parte de la dieta de organismos que finalmente incorporan o secuestran dichos compuestos (Paul y Pennings, 1991; Cruz-Rivera y Paul, 2000; Burja *et al.*, 2001). Por esta razón se ha encontrado un buen número de productos naturales marinos aislados inicialmente de invertebrados marinos, que tienen su origen en las cianobacterias (Burja *et al.*, 2001; Harrigan y Goetz, 2002; Usher, 2008).

Uno de los ejemplos más claros y conocidos de la incorporación de compuestos producidos por cianobacterias por parte de un invertebrado a través de la dieta, es el de las dolastatinas (Figura 1.9). Estos compuestos tienen una excelente actividad antineoplásica, llegando a etapas avanzadas de pruebas clínicas (Luesch *et al.*, 2002; Simmons *et al.*, 2005). Las dolastatinas fueron aisladas inicialmente del molusco opistobranquio *Dolabella auricularia* (Pettit *et al.*, 1997). Posteriormente varios análogos de las dolastatinas han sido aislados de diversas colecciones de las cianobacterias marinas bentónicas *Symploca hydroides* y ensambles de *Lyngbya majuscula* y *Schizothrix calcicola* en las Islas Marianas y en Hawái (resumido en Burja *et al.*, 2001; Harrigan y Goetz, 2002).



**Tabla 1.2.** Principales toxinas aisladas de cianobacterias. El número corresponde a la estructura química presentada en la Figura 1.10.

Nombre del compuesto	Tipo	Géneros y especies productoras	Actividad	Referencias
<b>15 microcistinas</b> Más de 70 variantes	Heptapéptido	Principalmente de agua dulce, también algunas marinas: <i>Microcystis</i> spp, <i>Anabaena</i> spp, <i>Planktothrix</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Anabaenopsis</i> , <i>Nostoc</i> y <i>Hapalosiphon</i>	Hepatotóxica Inhibidores de la serina/treonina fosfatasas 1 y 2 a nivel hepático Daños a nivel del ADN	Rao y Bhattacharya, 1996 Codd <i>et al.</i> , 2005 Rastogi y Sinha, 2009
<b>16 nodularinas</b> Alrededor de 6 variantes	Pentapéptidos	Especies de agua dulce: <i>Nodularia spumigena</i>	Inhibidores de la serina/treonina fosfatasas 1 y 2 a nivel hepático. Hepatotóxicas y promotoras de tumores	Codd <i>et al.</i> , 2005 Rastogi y Sinha, 2009
<b>17 cylindrospermopsina</b>	Alcaloide policétido	Principalmente de agua dulce: <i>Cylindrospermopsis</i> spp. <i>Aphanizomenon</i> , <i>Raphidiopsis</i> , <i>Umezakia</i> , <i>Anabaena</i>	Daños en el ADN, pérdida de cromosomas, mutagénico, carcinogénico, daños en el hígado y los riñones	Codd <i>et al.</i> , 2005 Rastogi y Sinha, 2009
<b>18 saxitoxina</b>	Alcaloide	Agua dulce: <i>Aphanizomenon</i> sp., <i>Anabaena</i> sp., <i>Lyngbya</i> sp. y <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	Neurotóxicas, bloquean los canales de Na <sup>+</sup> , causando parálisis, paro respiratorio en mamíferos e incluso la muerte	Rastogi y Sinha, 2009 Aráoz <i>et al.</i> , 2010
<b>19 anatoxina A</b>	Alcaloide	Diferentes especies agua dulce de los géneros <i>Aphanizomenon</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Lyngbya</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Cylindrospermum</i> , <i>Microcystis</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Planktothrix</i>	Neurotóxica, inhibe la acetilcolinesterasa, causa parálisis y puede causar la muerte	Rastogi y Sinha, 2009 Aráoz <i>et al.</i> , 2010
<b>20 β-metilamino-L- alanina (BMAA)</b>	Aminoácido no proteico	Numerosas especies terrestres, de aguas dulces y marinas de géneros como <i>Microcystis</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Lyngbya</i> , <i>Symploca</i> , <i>Nostoc</i> , , <i>Nodularia</i> , <i>Prochlorococcus</i>	Neurotóxico, relacionado como posible causa de enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis amiotrófica lateral y las enfermedades de Parkinson y Alzheimer	Cox, <i>et al.</i> , 2003 Cox <i>et al.</i> , 2005 Banack <i>et al.</i> , 2011

**Tabla 1.2.** Principales toxinas aisladas de cianobacterias. El número corresponde a la estructura química presentada en la figura 1.10. **Tabla 1.2.**

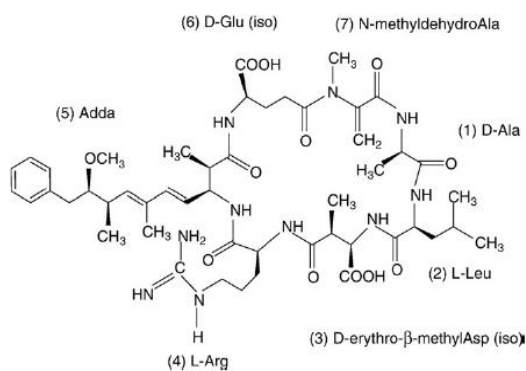
Principales toxinas aisladas de cianobacterias. El número corresponde a la estructura química presentada en la Figura 1.10. (Continuación).

#	Nombre del compuesto	Tipo	Géneros y especies productoras	Actividad	Referencias
21	debromoaplisiatoxina (10) aplisiatoxina (11)	Bilactonas fenólicas	Especies marinas: <i>Lyngbya majuscula</i> , <i>Oscillatoria nigroviridis</i> , <i>Schizothrix calcicola</i>	Dermatotóxicas, promotoras de tumores	Burja, <i>et al.</i> , 2001 Osborne <i>et al.</i> , 2001 Osborne <i>et al.</i> , 2007
22	lyngbyatoxina A	Alcaloides derivados del indol	Cianobacteria marina: <i>Lyngbya majuscula</i>	Dermatotóxicas, promotoras de tumores	Smith, <i>et al.</i> , 2008
23	ypaoamida	Lipopéptido	Cianobacteria marina: <i>Lyngbya majuscula</i>	Disuasor del consumo por herbívoros como pez loro <i>Scarus schlegeli</i> y pez conejo ( <i>Siganus argenteus</i> y <i>S. spinus</i> ), además de erizos de mar ( <i>Echinometra mathaei</i> )	Nagle <i>et al.</i> , 1996 Nagle y Paul, 1998
24	malyngamida A	Lipopéptido	Cianobacteria marina: <i>Lyngbya majuscula</i>	Disuasor del consumo por el pez loro <i>Scarus schlegeli</i> y el pez conejo <i>Siganus spinus</i>	Thacker <i>et al.</i> , 1997
25	malyngamida B	Lipopéptido	Cianobacteria marina: <i>Lyngbya majuscula</i>	Disuasor del consumo por el pez loro <i>Scarus schlegeli</i> y el pez conejo <i>Siganus spinus</i>	Thacker <i>et al.</i> , 1997
26	malyngolido	Lípido	Cianobacteria marina: <i>Lyngbya majuscula</i>	Disuasor del consumo por el pez loro <i>Scarus schlegeli</i> y el pez conejo <i>Siganus spinus</i> Disruptor del <i>quorum sensing</i> en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Thacker <i>et al.</i> , 1997 Dobretsov <i>et al.</i> , 2010
27	pitipeptólido	Depsipéptido cíclico	Cianobacteria marina: <i>Lyngbya majuscula</i>	Disuasor del consumo por herbívoros como los erizos <i>Echinometra mathaei</i> , los cangrejos <i>Menaethius monoceros</i> , los anfípodos <i>Parhyale hawaiiensis</i> y <i>Cymadusa imbroglia</i>	Cruz-Rivera y Paul, 2007

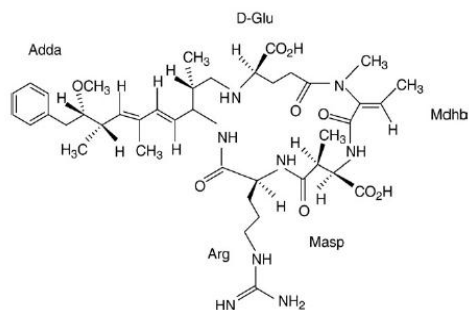
**Tabla 1.3.** Principales productos naturales aislados de cianobacterias. El número corresponde a la estructura química presentada en la Figura 1.10.

#	Nombre del compuesto	Tipo	Géneros y especies productoras	Actividad	Referencia
28	caylobolido	Macrolactona	Cianobacteria marina: <i>Lyngbya majuscula</i>	Toxicidad contra células de tumores del colon humano Actividad antifúngica	MacMillan y Molinsky, 2002 Presente investigación
29	curacina A	Lípido	Cianobacteria marina: <i>Lyngbya majuscula</i>	Toxicidad contra <i>Artemia salina</i> , Antimitótico, inhibidor de la tubulina. Actividad antiproliferativa y anti-cáncer. Varios análogos se prueban como candidatos para drogas anti-cáncer.	Rossi <i>et al.</i> , 1997 Tan, 2007
30	cianovirina N	Proteína	Cianobacterias de agua dulce: <i>Nostoc</i> spp.	Potente actividad contra el VIH mediante inhibición de la fusión del virus y las células humanas.	Burja <i>et al.</i> , 2001 Mori y Boyd, 2001
31	gallinamida a	Péptido	Cianobacterias marinas: <i>Schizothrix</i> sp.	Potente actividad antimalaria en ensayos con la cepa W2 resistente a la cloroquina del parásito <i>Plasmodium falciparum</i>	Linington <i>et al.</i> , 2009
32	dolastatina 15	Depsipéptido	Aislado de <i>Dolabella auricularia</i> (molusco), pero proviene de cianobacterias marinas que constituyen su dieta	Inhibición de la polimerización de la tubulina, efecto antimitótico. Potente actividad antiproliferativa y anti cáncer. Varios análogos se prueban como candidatos para drogas anti cáncer. Llegó sólo hasta fase II en pruebas clínicas debido a su toxicidad generalizada	Simmons <i>et al.</i> , 2005 Tan, 2010 Liu y Rein, 2010
33	syntadotina (ILX-651)	Péptido	Derivado sintético de la dolastatina 15	Potente actividad antiproliferativa y anti cáncer.	Simmons <i>et al.</i> , 2005 Tan, 2010 Liu y Rein, 2010

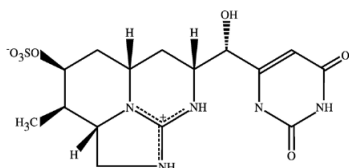
Figura 1.10. Estructuras de los compuestos presentados en las Tablas 1.2 y 1.3.



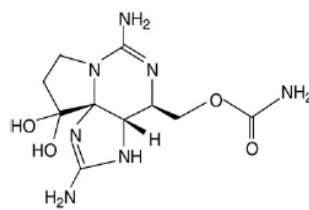
15. Microcistina-LR



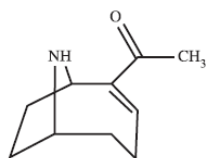
16. Nodularina



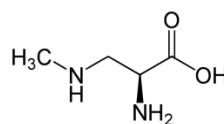
17. Cyindrospermopsina



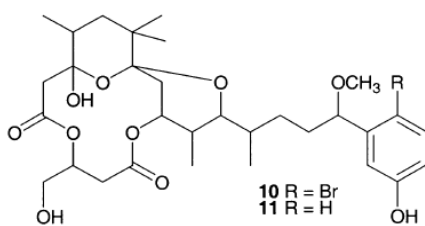
18. Saxitoxina



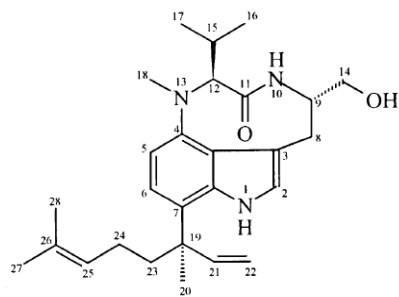
19. Anatoxina A



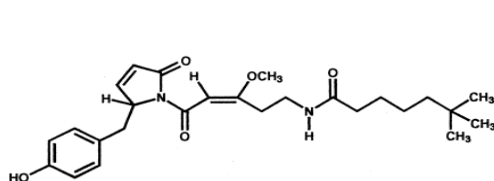
20. β-metilamino-L- alanina (BMAA)



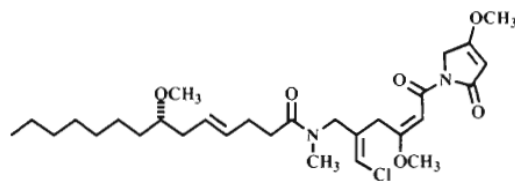
21. Debromoaplysiatoxina (10) y Aplysiatoxina (11)



22. Lyngbyatoxina A



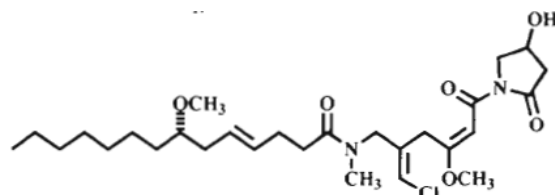
23. Ypaoamida



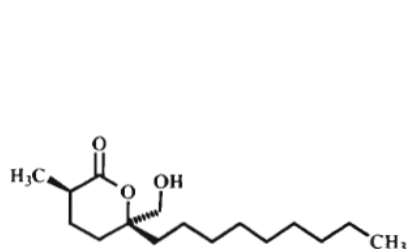
24. Malingamida A



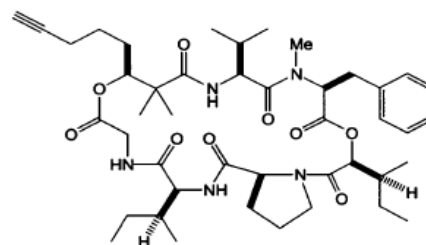
Figura 1.10. Estructuras de los compuestos presentados las Tablas 1.2 y 1.3. (Continuación).



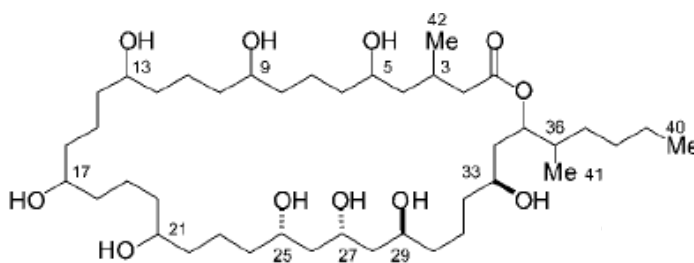
25. Malyngamida B



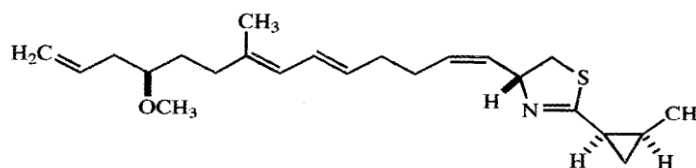
26. Malyngolido



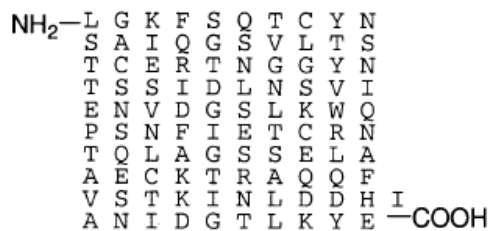
27. Pitipeptólido



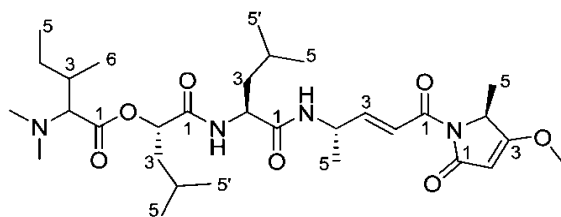
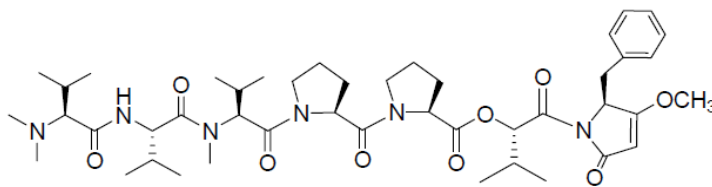
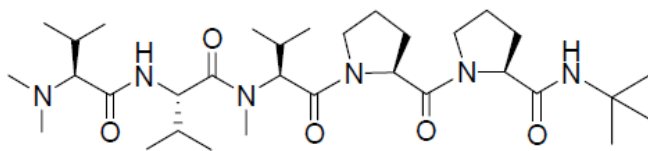
28. Caylobolido (estructura básica)



29. Cianovirina A



30. Cianovirina N

**Figura 1.10.** Estructuras de los compuestos presentados en las Tablas 1.2 y 1.3. (Continuación).**31. Gallinamida A****32. Dolastatina 15****33. Syntadotina (ILX-651)**

En ambientes dulceacuícolas, compuestos como las microcistinas, nodularinas, cilindroespermopsinas, anatoxinas y saxitoxinas, son protagonistas en intoxicaciones debido a su alta toxicidad (Smith *et al.*, 2008; Rastogi y Sinha, 2009). El problema se agrava al tener en cuenta que estas moléculas pueden bioacumularse, biomagnificarse y además son estables por lo cual pueden perdurar en el medio por largos periodos. Por ejemplo las microcistinas pueden ser liberadas al agua, e incluso después de procesos de filtración y esterilización éstas no se degradan afectando el agua para el consumo humano (Porfirio *et al.*, 1999; Carmichael *et al.*, 2001). Estas toxinas también se pueden acumular y perdurar en los sedimentos durante largos periodos de tiempo (Paerl *et al.*, 2011).

La estabilidad y persistencia de cianotoxinas en cuerpos de agua es preocupante. En 1996 en la población de Caruaru, Brasil, ocurrió un accidente en un centro de hemodiálisis donde 100 pacientes sufrieron fallas hepáticas agudas y 76 de ellos murieron. 56 de esas muertes fueron atribuidas a una afección hepática causada por cianotoxinas presentes en el agua que no fueron degradadas o removidas por los sistemas convencionales de tratamiento del agua (Porfirio *et al.*, 1999; Carmichael *et al.*, 2001). Las muertes se atribuyeron principalmente a tres variedades de microcistinas entre ellas la microcistina LR, que eventualmente fueron detectadas y cuantificadas en tejidos de hígado de 39 de las víctimas. El contenido de microcistinas en el agua sobrepasó 20 veces las concentraciones permitidas por la Organización Mundial de la Salud (Carmichael *et al.*, 2001).

Algunas toxinas de cianobacterias de ambientes dulceacuícolas pueden acumularse también en organismos marinos o estuarinos debido a las descargas de los ríos al mar. La acumulación de nodularinas y microcistinas ha sido ya evidenciada y se constituye en un peligro real para los consumidores de organismos que las acumulan como bivalvos (Codd *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2010). Las nodularinas por ejemplo, se acumulan fácilmente en los mejillones azules *Mytilus edulis* (Codd *et al.*, 2005). Miller *et al.* (2010) confirmaron la intoxicación hepática en mamíferos marinos causada por microcistinas, suministrando claras evidencias de la transferencia de toxinas de ambientes dulceacuícolas al mar a través de invertebrados marinos como vectores tróficos. Los autores reportaron la muerte de 21 nutrias marinas durante 2007 en la Bahía de Monterrey, California, como consecuencia de la intoxicación por microcistinas. Estos compuestos se detectaron y cuantificaron en muestras de hígado de los cadáveres de las nutrias. Mejillones y ostras consumidos por las nutrias, que también son consumidos por humanos, mostraron una bioacumulación de hasta 107 veces por encima de los niveles presentes en el agua.

Existen otras cianotoxinas con efectos neurotóxicos muy potentes, entre ellas las más conocidas son las saxitoxinas, anatoxinas y antillatoxinas (Aráoz *et al.*, 2010). Recientemente se caracterizó una neurotoxina producida por cianobacterias de diferentes géneros, tanto terrestres como dulceacuícolas y marinas, el aminoácido no protéico  $\beta$ -metilamino-L- alanina BMAA. Este compuesto que se acumula y biomagnifica a través de la red trófica puede afectar el cerebro humano. Los autores hipotetizan que el BMAA es una posible causa del complejo Parkinson-Demencia-Esclerosis Lateral Amiotrófica (Cox *et al.*, 2003; Banack *et al.*, 2007; O'Neil *et al.*, 2011).

Otros compuestos con menor toxicidad pero que generan grandes pérdidas económicas a la industria acuícola son los conocidos como "olorosos", dentro de los que se destacan la geosmina y el 2-metilsoborneol (MIB). Éstos generan sabores y olores desagradables a los productos

acuícolas (peces e invertebrados) y al agua potable haciéndolos indeseables para su consumo (Smith *et al.*, 2008).

Toxinas como la aplysiatoxina, debromoaplysiatoxina y lyngbyatoxina A, son producidas por cianobacterias marinas generalmente del género *Lyngbya*. Estas toxinas causan irritación del tejido epitelial (piel y mucosas) con consecuencias que varían dependiendo del sitio afectado en contacto con las toxinas (irritación de mucosas y dispnea por inhalación debido a la aerosolización de las toxinas, dermatitis por contacto directo). Además estas toxinas promueven la formación de tumores en animales de laboratorio (Codd *et al.*, 2005). Estas toxinas son las responsables de una condición conocida como *Swimmer's itch* o "piquiña del nadador" que presenta signos similares a quemaduras o dermatitis (Figura 1.11) (Osborne *et al.*, 2001). En el estado de la Florida EEUU, se ha observado la incidencia de dermatitis ulcerativa en manatíes que habitan en áreas donde afloran cianobacterias productoras de lyngbyatoxina A y debromoaplysiatoxina (Harr *et al.*, 2008).

**Figura 1.11.** Dermatitis causada por *Lyngbya majuscula* en una niña que nadaba en costas de Oahu, Hawaii. Los signos aparecieron un día después de la exposición a la cianobacteria (Werner *et al.*, 2012).



Por ser promotoras de tumores, la lyngbyatoxina A y debromoaplysiatoxina se han visto implicadas en la fibropapilomatosis de tortugas marinas. Esta enfermedad neoplásica se caracteriza por el crecimiento de tumores benignos que pueden aparecer como lesiones cutáneas externas y como masas viscerales internas. Los fibropapilomas son usualmente encontrados en los ojos, la piel blanda de la región inguinal, la boca o en órganos internos. Aunque los tumores son benignos, éstos pueden afectar el movimiento, la visión, la capacidad de alimentarse y el funcionamiento normal de los órganos afectados (Landsberg *et al.*, 1999; Arthur *et al.*, 2006; Arthur *et al.*, 2008).

La principal vía de exposición a las toxinas promotoras de tumores por parte de las tortugas marinas es la ingestión. La cianobacteria marina *Lyngbya majuscula* crece usualmente epífita sobre las macroalgas y pastos marinos que constituyen la fuente de alimento principal de la tortuga verde *Chelonia mydas* (Arthur *et al.*, 2006). Además del consumo incidental de *Lyngbya majuscula*, el consumo de grandes cantidades de lyngbyatoxina A y debromoaplysiatoxina puede ocurrir de manera incidental ya que las tortugas pueden ingerir accidentalmente opistobranquios *Stylocheilus striatus* que viven asociados a los tapetes de *L. majuscula* y que acumulan y magnifican dichas toxinas en sus tejidos (Paul y Pennings, 1991).

Debido a la diversidad y actividad biológica de los compuestos producidos por cianobacterias, este grupo se ha consolidado como uno de los más promisorios en la investigación y búsqueda de nuevos compuestos químicos con potencial farmacéutico (antiviral, citotóxico, antitumoral, anticáncer, antibiótico, antifúngico, antimalárico, antiinflamatorio y analgésico) y de uso industrial (agentes citotóxicos, biocidas, alguicidas, insecticidas, antimicóticos, como productos cosméticos, fuentes de nuevas endonucleasas y producción de compuestos para protección UV) (resumido en Harrigan y Goetz, 2002; Sekar y Paulraj, 2006 Rastogi y Sinha, 2009, Tan, 2010).

Cerca de 800 compuestos diferentes han sido aislados de cianobacterias marinas principalmente de los órdenes Oscillatoriales y Nostocales. Hasta el 2010, más de 300 compuestos que contienen nitrógeno han sido obtenidos únicamente a partir de especies marinas de los géneros *Lyngbya* y *Symploca* (Tan, 2010). Algunos de los usos de compuestos aislados de cianobacterias se encuentran ya en patentes de los Estados Unidos (Sekar y Paulraj, 2006), además, varios de los compuestos aislados de cianobacterias o sus análogos sintéticos, se encuentran en fases preclínicas y clínicas como tratamientos contra el cáncer (Simmons *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2012).

#### 1.4. Estudios de Cianobacterias marinas en Colombia

En el Caribe colombiano se han observado afloramientos de cianobacterias marinas en áreas como las Islas del Rosario (Obs. pers.; Puyana, com. pers.), San Andrés y Providencia (Puyana, com. pers.) y Santa Marta (Pizarro com. pers.). Sin embargo, existen muy pocos reportes de cianobacterias marinas bentónicas arrecifales y hasta el momento sólo se han reportado 8 especies en el Caribe colombiano (Díaz-Pulido y Díaz-Ruiz, 2003; Díaz *et al.*, 2003), aunque recientemente, Reyes *et al.* (en prensa) reportaron recientemente para el archipiélago de San Andrés y Providencia las cianobacterias *Brachytrichia quoyi*, *Lyngbya penicilliformis*, *Calothrix confervicola*, *Phormidium dimorphum* y *Phormidium roseum*. Tales estudios no presentan información acerca de los afloramientos, su toxicidad o efectos ecológicos en los arrecifes. De esta manera no existen registros formales de los afloramientos de cianobacterias marinas en el Caribe colombiano. Por esta razón surgió la necesidad de realizar un trabajo donde se estudiaran de manera formal los afloramientos de cianobacterias marinas del Caribe colombiano, sus posibles efectos sobre los ecosistemas arrecifales, potencial toxicidad y la composición de especies presentes en ellos.

Trabajos como los realizados por Quintana (2011) y Bayona (2012), constituyen los primeros aportes al conocimiento de la actividad biológica y toxicidad de las cianobacterias marinas encontradas en los afloramientos del Caribe colombiano. Los autores realizaron estudios químicos de tapetes de cianobacterias compuestos por *Oscillatoria nigroviridis* y ensamblajes de *Lyngbya* spp. encontrando para algunos de ellos actividad citotóxica muy promisoriosa.

Tal y como se estableció previamente, la gran cantidad de compuestos químicos producidos por las cianobacterias juega un importante papel en las interacciones de éstas con otros organismos, regulando procesos tan importantes como la herbivoría, o causando graves problemas ambientales como la mortalidad de peces y corales e intoxicaciones a mamíferos y reptiles marinos, entre otros. De otra parte las cianobacterias producen una gran variedad de compuestos que podrían constituir una fuente potencial de productos con aplicaciones farmacológicas o

biotecnológicas. Así pues, resulta muy importante aumentar el conocimiento que se tiene sobre la presencia de los afloramientos de cianobacterias marinas en Colombia, generar información acerca de los efectos que puedan tener sobre otros organismos marinos y aportar hacia el entendimiento de las posibles consecuencias de dichos afloramientos en zonas arrecifales.

El presente trabajo constituye el primer aporte al conocimiento de la ecología y composición de especies de los afloramientos de cianobacterias marinas arrecifales en el Caribe colombiano reportando por primera vez de manera formal su ocurrencia, el papel ecológico en ecosistemas arrecifales, su posible toxicidad y la composición de especies en dichos afloramientos, contribuyendo al conocimiento de la biodiversidad marina del país.

## 1.5. Bibliografía

- Ahern KS, Ahern CR, Udy JW. 2007. Nutrient additions generate prolific growth of *Lyngbya majuscula* (cyanobacteria) in field and bioassay experiments. *Harmful Algae*, 6: 134-151.
- Ahern KS, Ahern CR, Udy JW. 2008. In situ field experiment shows *Lyngbya majuscula* (cyanobacterium) growth stimulated by added iron, phosphorus and nitrogen. *Harmful Algae*, 7: 389-404.
- Albert S, O'Neil JM, Udy JW, Ahern KS, O'Sullivan CM, Dennison WC. 2005. Blooms of the cyanobacterium *Lyngbya majuscula* in coastal Queensland, Australia: disparate sites, common factors. *Marine Pollution Bulletin*, 51: 428-437.
- Aráoz R, Molgó J, Tandeau de Marsac N. 2010. Neurotoxic cyanobacterial toxins. *Toxicon*, 56: 813-828.
- Arthur KE, Limpus CJ, Roelfsema CM, Udy JW, Shaw GR. 2006. A bloom of *Lyngbya majuscula* in Shoalwater Bay, Queensland, Australia: An important feeding ground for the green turtle (*Chelonia mydas*). *Harmful Algae*, 5: 251-265.
- Arthur K, Limpus C, Balazs G, Capper A, Udy J, Shaw G, Keuper-Bennett U, Bennett P. 2008. The exposure of green turtles (*Chelonia mydas*) to tumor promoting compounds produced by the cyanobacterium *Lyngbya majuscula* and their potential role in the aetiology of fibropapillomatosis. *Harmful Algae*, 7: 114-125.
- Banack SA, Johnson HE, Cheng R, Cox PA. 2007. Production of the Neurotoxin BMAA by a Marine Cyanobacterium. *Marine Drugs*, 5: 180-196
- Banack SA, Metcalf JS, Spáčil Z, Downing TG, Downing S, Long A, Nunn PB, Cox PA. 2011. Distinguishing the cyanobacterial neurotoxin b-N-methylamino-L-alanine (BMAA) from other diamino acids. *Toxicon*, 57: 730-738.

- Bayona L. 2012. Estudio de compuestos con actividad citotóxica aislados de cianobacterias bentónicas del Caribe colombiano. Trabajo de grado para optar al título de Químico. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, 9 pp.
- Berman-Frank I, Pernilla L, Falkowski P. 2003. Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. *Research in Microbiology*, 154: 157-164.
- Berry JP, Gantar M, Perez MH, Berry G, Noriega FG. 2008. Cyanobacterial toxins as allelochemicals with potential applications as algacides, herbicides and insecticides. *Marine Drugs*, 6:117-146.
- Burja AM, Banaigs B, Abou-Mansour E, Grant Burgess J, Wright PC. 2001. Marine cyanobacteria-a prolific source of natural products. *Tetrahedron*, 57: 9347-9377.
- Burke L. and Maidens J. 2004. Reefs at Risk in the Caribbean. Executive Summary. World Resources Institute. Washington DC. 16 pp.
- Capper A, Cruz-Rivera E, Paul VJ, Tibbetts IR. 2006a. Chemical deterrence of a marine cyanobacterium against sympatric and non-sympatric consumers. *Hydrobiologia*, 553: 319-326.
- Capper A, Tibbetts IR, O'Neil JM, Shaw GR. 2006b. Feeding preference and deterrence in rabbitfish *Siganus fuscescens* for the cyanobacterium *Lyngbya majuscula* in Moreton Bay, south-east Queensland, Australia. *Journal of Fish Biology*, 68: 1589-1609.
- Carmichael WW, Azevedo SMFO, An JS, Molica RJR, Jochimsen EM, Lau S, Rinehart KL, Shaw GR, Eaglesham GK. 2001. Human Fatalities from Cyanobacteria: Chemical and Biological Evidence for Cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives*, 109(7): 663-668.
- Codd GA, Morrison LF, Metcalf JS. 2005. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203: 264-272.
- Costa M, Costa-Rodrigues J, Fernandes MH, Barros P, Vasconcelos V, Martins R. 2012. Marine Cyanobacteria Compounds with Anticancer Properties: A Review on the Implication of Apoptosis. *Marine Drugs*, 10: 2181-2207.
- Cox PA, Banack SA, Murch SJ. 2003. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(23): 13380-13383.
- Cox PA, Banack SA, Murch SJ, Rasmussen U, Tien G, Bidigare RR, Metcalf JF, Morrison LF, Codd GA, Bergman B. 2005. Diverse taxa of cyanobacteria produce N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(14): 5074-5078.

- Cruz-Rivera E, Paul VJ. 2000. Coral reef benthic cyanobacteria as food and refuge: Diversity, chemistry and complex interactions. Proceedings 9th International Coral Reef Symposium, Bali, Indonesia 23-27 October 2000, Vol. 1.
- Cruz-Rivera E, Paul VJ. 2007. Chemical deterrence of a cyanobacterial metabolites against generalized and specialized grazers. *Journal of Chemical Ecology*, 33: 213-217.
- Czaja, A. 2010. Microbes and the rise of oxygen. *Nature Geoscience*, 3: 522-523.
- Díaz-Pulido G, McCook LJ. 2002. The fate of bleached corals: patterns and dynamics of algal recruitment. *Marine Ecology Progress Series*, 232: 115-128.
- Díaz JM, Barrios LM, Gómez-López DI. 2003. Las praderas de pastos marinos en Colombia. Estructura y distribución de un ecosistema estratégico. Serie Publicaciones Especiales No. 10, Santa Marta, 160 pp.
- Díaz-Pulido G, Díaz-Ruiz M. 2003. Diversity of benthic marine algae of the Colombian Atlantic. *Biota Colombiana*, 4(2): 203-243.
- Dennison W.C.; O'Neil, J.M.; Duffy, E.J.; Oliver, P.E. y Shaw, G.R. 1999. Blooms of the cyanobacterium *Lyngbya majuscula* in coastal waters of Queensland, Australia. *Bulletin de l'Institut océanographique (Monaco)*, 19: 501-506.
- Dey B, Lerner DL, Lusso P, Boyd MR, Elder JH, Berger EA. 2000. Multiple antiviral activities of cyanovirin-N: blocking of human immunodeficiency virus type 1 gp120 interaction with CD4 and coreceptor and inhibition of diverse enveloped viruses. *Journal of Virology*, 74(10): 4562-4569.
- Dobretsov S, Teplitski M, Paul VJ. 2009. Mini-review: *quorum sensing* in the marine environment and its relationship to biofouling. *Biofouling*, 25 (5): 413-427.
- Dobrestsov S, Teplitski M, Alagely Ali, Gunasekera SP, Paul VJ. 2010. Malyngolide from the cyanobacterium *Lyngbya majuscula* interferes with *quorum sensing* circuitry. *Environmental Microbiology Reports*, 2(6): 739-744.
- Gademann K, Kobylinska J, Wach JY, Woods TM. 2009. Surface modifications based on the cyanobacterial siderophore anachelin: from structure to functional biomaterials design. *Biomaterials*, 22: 595-604
- Gilby BL, Burfeind DD, Tibbetts IR. 2011. *Lyngbya majuscula* blooms and the diet of small subtropical benthivorous fishes. *Marine Biology*, 158: 245-255
- Goldblatt C, Lenton TM, Watson AJ. 2006. Biostability of atmospheric oxygen and the great oxidation. *Nature Letters*, 443: 683-686.
- Gould SB, Waller RF, McFadden GI. 2008. Plastid evolution. *Annual Review of Plant Biology*. 59: 491-517.



- Gumbo RJ, Ross G, Cloete ET. 2008. Biological control of *Microcystis* dominated harmful algal blooms. *African Journal of Biotechnology*, 7(25): 4765-4773.
- Harr KE, Szabo NJ, Cichra M, Philips EJ. 2008. Debromoaplysiatoxin in *Lyngbya*-dominated mats on manatees (*Trichechus manatus latirostris*) in the Florida King's Bay ecosystem. *Toxicon*, 52: 385-388.
- Harrigan GG, Goetz G. 2002. Symbiotic and dietary marine microalgae as a source of bioactive molecules—experience from natural products research. *Journal of Applied Phycology*, 14: 103-108.
- Hay ME. 1996. Marine Chemical Ecology: What's known and what's next?. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 200: 103-134.
- Hay ME, Fenical W. 1996. Chemical ecology and marine biodiversity: Insights and products from the sea. *Oceanography*, 9(1): 10-20.
- Hernández R; Méndez M. 2007. Programa Florecimiento de Algas Nocivas. Servicios de Salud de Veracruz, Dirección de Regulación y Fomento Sanitario. España. 12 pp.
- Hitzfeld BC, Lampert CS, Spaeth N, Mountfort D, Kaspar H, Dietrich DR. 2000. Toxin production in cyanobacterial mats from ponds on the McMurdo Ice Shelf, Antarctica. *Toxicon*, 38: 1731-1748.
- Hoiczky E., Hansel A. 2000. Cyanobacterial Cell Walls: News from an Unusual Prokaryotic Envelope. *Journal of Bacteriology*, 182(5): 1191-1199.
- Ibelings BW, Chorus I. 2007. Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater “seafood” and its consequences for public health: A review. *Environmental Pollution*, 150: 177-192.
- Ikawa M, Sasner JJ, Haney JF, 2001. Activity of cyanobacterial and algal odor compounds found in lake waters on green alga *Chlorella pyrenoidosa* growth. *Hydrobiologia*, 443: 19-22.
- Issa AA. 1999. Antibiotic production by the cyanobacteria *Oscillatoria angustissima* and *Calothrix parietina*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 8: 33–37.
- Ito Y, Butler A. 2005. Structure of synechobactins, new siderophores of the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Limnology and Oceanography*, 50(6): 1918-1923.
- Kuffner IB, Paul VJ. 2004. Effects of the benthic cyanobacterium *Lyngbya majuscula* on larval recruitment of the reef corals *Acropora surculosa* and *Pocillopora damicornis*. *Coral Reefs*, 23: 455-458.
- Kuffner IB, Walters LJ, Becerro MA, Paul VJ, Ritson-Williams R, Beach KS. 2006. Inhibition of coral recruitment by macroalgae and cyanobacteria. *Marine Ecology Progress Series*, 323: 107-117.

- Landsberg JH, Balazs GH, Steidinger KA, Baden DG. 1999. The potential role of natural tumor promoters in marine turtle fibropapillomatosis. *Journal of Aquatic Animal Health*, 11: 199-210.
- Linnington RG, Clark BR, Trimble EE, Almanza A, Ureña LD, Kyle DE, Gerwick WH. 2009. Antimalarial peptides from marine cyanobacteria: Isolation and structural elucidation of Gallinamide A. *Journal of Natural Products*, 72: 14-17.
- Liu L, Rein KS. 2010. New Peptides Isolated from *Lyngbya* Species: A Review. *Marine Drugs*, 8: 1817-1837.
- Lodish H, Berk H, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky L, Darnell J. 2003. *Molecular Cell Biology*. 5th Ed. WH. Freeman y Co. EEUU. 973 pp.
- Luesch H, Harrigan GG, Goetz G, Horgen FD. 2002. The cyanobacterial origin of potent anticancer agents originally isolated from sea hares. *Current Medicinal Chemistry*, 9: 1791- 1806.
- MacMillan JB, Molinski TF. 2002. Caylobolide A, a unique 36-membered macrolactone from a bahamian *Lyngbya majuscula*. *Organic Letters*, 4(9): 1535-1538.
- Madigan M, Martinko J, Parker J. 1998 Brock: *Biología de los microorganismos*. 8a Ed revisada. Prentice Hall. Madrid. 986 pp.
- Martins RF, Ramos MF, Herfindal L, Sousa JA, Skarven K, Vasconcelos VM. 2008. Antimicrobial and Cytotoxic Assessment of Marine Cyanobacteria - *Synechocystis* and *Synechococcus*. *Marine Drugs*, 6(1): 1-11.
- Matthew S, Ratnayake R, Becerro MA, Ritson-Williams R, Paul VJ, Luesch H. 2010. Intramolecular Modulation of Serine Protease Inhibitor Activity in a Marine Cyanobacterium with Antifeedant Properties. *Marine Drugs*, 8: 1803-1816.
- Meickle T, Matthew S, Ross C, Luesch H, Paul, VJ. 2009. Bioassay-guided Isolation and Identification of Desacetyl-Microcolin B from *Lyngbya* cf. *polychroa*. *Planta Medica*, 75(13): 1427-1430.
- Miller MA, Kudela RM, Mekebri A, Crane D, Oates SC, Tinker MT, Staedler M, Miller WA, Toy-Choutka S, Dominik C, Hardin D, Langlois G, Murray M, Ward K, Jessup DA. 2010. Evidence for a Novel Marine Harmful Algal Bloom: Cyanotoxin (Microcystin) Transfer from Land to Sea Otters. *PLoS ONE*, 5(9): e12576. doi:10.1371/journal.pone.0012576.
- Mori T, Boyd M. 2001. Cyanovirin-N, a potent human immunodeficiency virus-inactivating protein, blocks both CD4-dependent and CD4-independent binding of soluble gp120 (sgp120) to target cells, inhibits sCD4-induced binding of sgp120 to cell-associated CXCR4, and dissociates bound sgp120 from target cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(3): 664-672.

- Nagle DG, Paul VJ, Roberts AM. 1996. Ypaoamide, a new broadly acting feeding deterrent from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. Tetrahedron Letters, 37: 6263-6266.
- Nagle DG, Paul VJ. 1998 Chemical defense of a marine cyanobacterial bloom. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 225: 29-38.
- O'Neil JM, Davis TW, Burford MA, Gobler CJ. 2011. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. Harmful Algae, doi:10.1016/j.hal.2011.10.027: 1-22.
- Osborne NJ, Shaw GR, Webb PM. 2007. Health effects of recreational exposure to Moreton Bay, Australia waters during a *Lyngbya majuscula* bloom. Environment International, 33: 309-314.
- Osborne NJT, Webb PM, Shaw GR. 2001. The toxins of *Lyngbya majuscula* and their human and ecological health effects. Environment International, 27: 381-392.
- Paerl HW. 2009. Controlling eutrophication along the freshwater-marine continuum: Dual nutrient (N and P) reductions are essential. Estuaries and Coast, 32: 593-601.
- Paerl HW, Xu H, McCarthy MJ, Zhu G, Qin B, Li Y, Gardner WS. 2011. Controlling harmful cyanobacterial blooms in a hyper-eutrophic lake (Lake Taihu, China): The need for a dual nutrient (N & P) management strategy. Water Research, 45: 1973-1983.
- Paerl HW, Paul, VJ. 2012. Climate change: Links to global expansion of harmful cyanobacteria. Water Research, 49(5): 1349-1363.
- Paul VJ, Cruz-Rivera E, Thacker R. 2001. Chemical mediation of macroalgal-Herbivore interactions. 227-265 pp. En: McClintock y Baker (eds.) Marine Chemical Ecology. CRC Press, Boca Raton, Florida, EEUU. 610 pp.
- Paul VJ, Thacker R, Banks K, Golubic S. 2005. Benthic cyanobacterial blooms impact the reef of south Florida (Broward County, USA). Coral Reefs, 24: 693-697.
- Paul VJ, Pennings SC. 1991. Diet-derived chemical defenses in the sea hare *Stylocheilus longicauda* (Quoy et Gaimard 1824). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 151: 227-243.
- Pennings, S.C.; Pablo, S.R. y Paul, V.J. 1997. Chemical defenses of the tropical benthic marine cyanobacterium *Hormothamnion enteromorphoides*: Diverse consumers and synergisms. Limnology and Oceanography, 42(5): 911-917.
- Pereira AR, McCue CF, Gerwick WH. 2010. Cyanolide A, a glycosidic macrolide with potent molluscicidal activity from the Papua New Guinea cyanobacterium *Lyngbya bouillonii*. Journal of Natural Products, 73: 217-220.

- Pettit GR, Xu JP, Hogan F, Williams MD, Doubek DL, Schmith JM, Cerny RL, Boyd MR. 1997. Isolation and structure of the human cancer cell growth inhibitory cyclodepsipeptide dolastatin 16. *Journal of Natural Products*, 60(8): 752-754.
- Porfirio Z, Ribeiro MP, Estevam CS, Houly RLS, Sant'Ana AEG. 1999. Hepatosplenomegaly caused by an extract of cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* bloom collected in the Menguaba Lagoon, Alagoas –Brazil. *Revista de Microbiología*, 30: 278-285.
- Prescott, L. 2002. *Microbiology*. 5th Ed. McGraw-Hill. Boston, Massachusetts. 1147 pp.
- Puglisi M, Engel S, Jensen P, Fenical W. 2007. Antimicrobial activities of extracts from Indo-Pacific marine plants against marine pathogens and saprophytes. *Marine Biology*, 150: 531-540.
- Quintana JI. 2011. Evaluación de la toxicidad y del potencial bioactivo de afloramientos de cianobacterias bentónicas arrecifales del Caribe colombiano. Trabajo de grado para optar al título de MSc en química. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, 112 pp.
- Rao PVL, Bhattacharya R. 1996. The cyanobacterial toxin microcystin-LR induced DNA damage in mouse liver in vivo. *Toxicology*, 114:29-36.
- Rastogi RP, Sinha RP. 2009. Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 27: 521-539.
- Reshef V, Carmeli S. 2001. Protease inhibitors from a water bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron*, 57: 2885-2894.
- Reyes V, Gavio B, Velasquez H (en prensa). Notes on the marine algae of the International Biosphere Reserve Seaflower, III. New records of Cyanophyta for the Caribbean coast of Colombia. *Nova Hedwigia*.
- Ritson-Williams R, Paul VJ, Bonito V. 2005. Marine benthic cyanobacteria overgrow coral reef organisms. *Coral Reefs*, 24: 629.
- Rossi JV, Roberts MA, Yoo HD, Gerwick WH. 1997. Pilot scale culture of the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula* for its pharmaceutically useful natural metabolite curacin A. *Journal of Applied Phycology*, 9: 195–204.
- Sano T, Kaya K. 1995. Oscillamide Y, a chymotrypsin inhibitor from toxic *Oscillatoria agardhii*. *Tetrahedron Letters*, 36(33): 5933-5936.
- Schopf JW. 1993. Microfossils of the Early Archean Apex Chert: New Evidence of the Antiquity of Life. *Science*, 260 (5108): 640-646.
- Sekar S, Paulraj P. 2006. Strategic mining of cyanobacterial patents from the USPTO patent database and analysis of their scope and implications. *Journal of Applied Phycology*, 19: 277-292.

- Shuttle C, Chan A. 1993. Marine cyanophages infecting oceanic and coastal strains of *Synechococcus*: abundance, morphology, cross-infectivity and growth characteristics. *Marine Ecology progress Series*, 92: 99-109.
- Sigee DC, Glenn R, Andrews MJ, Bellinger MG, Butler RD, Epton HAS, Hendry RD. 1999. Biological control of cyanobacteria: principles and possibilities. *Hydrobiologia*, 395/396: 161-172.
- Simmons TL, Andrianasolo E, McPhail K, Flatt P, Gerwick WH. 2005. Marine Natural Products as anticancer drugs. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4(2): 333-341.
- Sinha RP, Häder D-P. 2008. UV-protectants in cyanobacteria. *Plant Science*, 174: 278-289.
- Skindersoe ME, Ettinger-Epstein P, Rasmussen TB, Bjarnsholt T, de Nys R, Givskov M. 2008. *quorum sensing* antagonism from marine organisms. *Marine Biotechnology*, 10: 56-63.
- Smarda J, Smajs D, Komrska J, Krzyzanek V. 2002. S-layer on cell walls of cyanobacteria. *Micron*, 33: 257-277.
- Smith JL, Boyer GL, Zimba PV. 2008. A review of cyanobacterial odorous and bioactive metabolites: Impacts and management alternatives in aquaculture. *Aquaculture*, 280: 5-20.
- Thacker R, Nagle D, Paul VJ. 1997. Effects of repeated exposures to marine cyanobacterial secondary metabolites on feeding by juvenile rabbitfish and parrotfish. *Marine Ecology Progress Series*, 147: 21-29.
- Tan LT. 2010. Filamentous tropical marine cyanobacteria: a rich source of natural products for anticancer drug discovery. *Journal of Applied Phycology*, 22(5): 659-676.
- Titlyanov E, Yakovleva I, Titlyanova T. 2007. Interaction between benthic algae (*Lyngbya bouillonii*, *Dictyota dichotoma*) and scleractinian coral *Porites lutea* in direct contact. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 342: 282-291.
- Urmeneta J, Navarrete A, Huete J, Guerrero R. 2003. Isolation and characterization of Cyanobacteria from Microbial Mats of the Ebro Delta, Spain. *Current Microbiology*, 46: 199-204.
- Usher KM. 2008. The ecology and phylogeny of cyanobacterial symbionts in sponges. *Marine Ecology*, 29: 178-192.
- Valdor R, Aboal M. 2007. Effects of living cyanobacteria, cyanobacterial extracts and pure microcystins on growth and ultrastructure of microalgae and bacteria. *Toxicon*, 49: 769-779.
- Von Elert E, Oberer L, Merkel P, Huhn T, Blom JF. 2005. Cyanopeptolin 954, a chlorine-containing chymotrypsin inhibitor of *Microcystis aeruginosa* NIVA Cya 43. *Journal of Natural Products*, 68: 1324-1327

Werner KA, Marquart, Norton SA. 2012. *Lyngbya* dermatitis (toxic seaweed dermatitis). *International Journal of Dermatology*, 51: 59-62.

Wiegand C, Pflugmacher S. 2005. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203:201-218.

Wingard LL, Miller SR, Sellker JML, Stenn E, Allen MM, Wood AM. 2002. Cyanophycin production in a phycoerythrin-containing marine *Synechococcus* strain of unusual phylogenetic affinity. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4): 1772-1777.

## 2. Capítulo 2. Afloramientos de cianobacterias bentónicas arrecifales en el Caribe colombiano

### 2.1. Introducción

En el Caribe colombiano, las cianobacterias marinas componen un grupo de microorganismos poco estudiado y el conocimiento que se tiene acerca de la riqueza de especies de este grupo se limita a listados taxonómicos de la flora marina local (Díaz-Pulido y Díaz-Ruiz, 2003; Reyes *et al.*, en prensa). En varias localidades del Caribe colombiano se han observado afloramientos de cianobacterias de los cuales no hay reportes formales que aporten información sobre su incidencia, magnitud e implicaciones ecológicas sobre los ecosistemas marinos.

Los afloramientos de cianobacterias marinas, se manifiestan a manera de diferentes tipos de aglomeraciones macroscópicas formadas generalmente por grandes cantidades de filamentos de una especie de cianobacteria, estas aglomeraciones conocidas como tapetes o *mats* (en inglés), presentan caracteres macroscópicos que los identifican y diferencian (Komárek y Anagnostidis, 2005; Paul *et al.*, 2005; Charpy *et al.*, 2010). De esta manera la descripción y registro de los tapetes de cianobacterias son importantes aportes a su conocimiento. El uso de herramientas como la fotografía subacuática para registrar los afloramientos en los arrecifes, ofrece una mayor cantidad de información, un registro visual y posibilita la difusión del conocimiento de estos eventos a nivel mundial y particularmente en el Caribe colombiano.

La identificación de cianobacterias se ha realizado tradicionalmente con base en la evaluación de parámetros morfométricos (Thacker y Paul, 2001; Stiellow y Ballantine, 2003; Charpy *et al.*, 2010; Engene *et al.*, 2010). Dado que el tamaño de las cianobacterias del orden Oscillatoriales es relativamente grande, es posible realizar con microscopía óptica, la identificación de estos organismos a nivel de género y en ocasiones a nivel de especie, adicionalmente, algunos estudios recientes han reportado que existe en muchos casos una buena correlación entre las identificaciones morfológicas y moleculares para la mayoría de géneros y especies de cianobacterias (resumido en Engene *et al.*, 2010). Sin embargo, se ha encontrado que en ocasiones pueden realizarse identificaciones equívocas mediante este método (Engene *et al.*, 2012). Esto se ha evidenciado a partir de estudios moleculares y morfométricos de especies del género *Lyngbya* y en particular *L. majuscula*, especie caracterizada por la gran cantidad de compuestos bioactivos que se le atribuyen (Engene *et al.*, 2010; Engene *et al.*, 2011; Engene *et al.*, 2012). La aparente diversidad química y morfológica de *L. majuscula* puede ser ahora explicada a la asignación de dicha identidad a diferentes especies diferentes. Esto se planteó gracias a análisis moleculares que *Lyngbya majuscula* puede ser confundida en ocasiones con especies del género *Moorea* propuesto por Engene *et al.* (2012). Debido a lo anterior, se plantea

que para mejorar la exactitud en la identificación de las cianobacterias es bueno realizar análisis morfológicos y moleculares de manera conjunta (Sharp *et al.*, 2009).

Por estas razones, se realizaron descripciones de las características macroscópicas de los tapetes encontrados en los sitios de muestreo, complementadas con fotografías subacuáticas de los mismos. Además se realizó una identificación morfológica de las especies que componían los tapetes de cianobacterias, aportando así al conocimiento de los afloramientos en el Caribe colombiano y al conocimiento de nuestra biodiversidad.

## 2.2. Área de estudio

### 2.2.1. Caribe colombiano.

El Mar Caribe es un mar semicerrado delimitado por América Central y América del Sur, separado del Atlántico por las dorsales asociadas al arco de las Antillas. La zona se encuentra influenciada por los vientos Alisios del noreste y por la corriente marina del Caribe que fluye de oriente a occidente. La corriente del Caribe al encontrarse con la cordillera submarina conocida como elevación de Nicaragua, sufre una bifurcación hacia el suroccidente y al nororiente. Esta corriente, continúa al nororiente cruzando por el canal de Yucatán hacia el Golfo de México, mientras que la porción que es desviada hacia el suroccidente forma un giro en contra de las manecillas del reloj al encontrarse con la costa centroamericana conocido como Giro de Panamá-Colombia. A partir de este giro, se origina la Contracorriente Panamá-Colombia, que fluye como su nombre lo indica de occidente a oriente influyendo sobre todo en la zona más próxima al continente del país (García *et al.*, 2003; Lozano-Duque *et al.*, 2010) (Figura 2.1).

**Figura 2.1.** Mapa del mar Caribe mostrando el sistema de corrientes marinas superficiales (Flechas rojas). (Tomado y modificado de Lozano-Duque *et al.*, 2010). La flecha verde señala la ubicación aproximada del extremo oriental de la cordillera submarina “Elevación de Nicaragua”, punto en el que se bifurca la corriente del Caribe hacia el noroccidente y se forma el giro Panamá-Colombia.

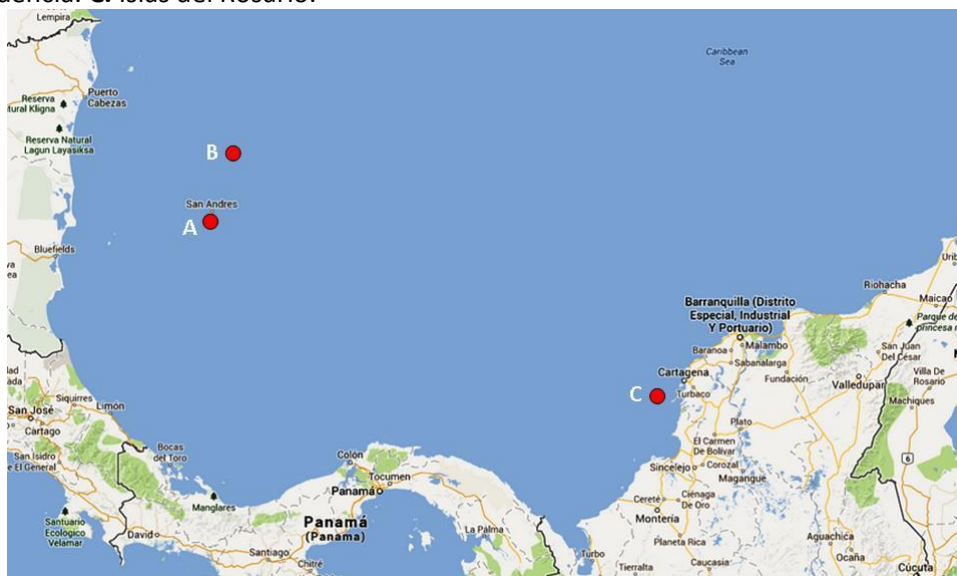




Cerca del 80% de las áreas coralinas del Caribe se concentran en el Caribe oceánico en el archipiélago de San Andrés y Providencia, lugares donde se observan los arrecifes más desarrollados y complejos de la zona (INVEMAR, 2005; INVEMAR, 2009). En el Caribe Continental, se destacan como las zonas arrecifales más importantes, las formaciones encontradas alrededor de los archipiélagos de San Bernardo y las Islas del Rosario (Díaz *et al.*, 2000).

Para la realización del presente trabajo, se efectuaron diferentes salidas de campo y muestreos de las cianobacterias marinas bentónicas arrecifales en tres sitios del Caribe colombiano, las Islas del Rosario, San Andrés y Providencia (Figura 2.2).

**Figura 2.2.** Ubicación de las tres localidades del Caribe colombiano estudiadas en el presente trabajo. Cada una de las localidades está señalada en la imagen con círculos rojos. **A.** San Andrés. **B.** Providencia. **C.** Islas del Rosario.



Los muestreos fueron realizados durante los meses de octubre de 2009 y julio de 2010 para el Archipiélago de San Andrés y Providencia. En las islas del Rosario fueron realizados en los meses de septiembre de 2010 y 2011 y en el mes de abril de 2012.

### 2.2.2. Islas de San Andrés y Providencia.

Las islas de San Andrés, Providencia y Santa Catalina, pertenecen al Archipiélago de San Andrés y Providencia, están ubicadas en el sector occidental del mar Caribe, al noreste del país. El archipiélago hace parte de una cordillera submarina llamada elevación de Nicaragua, que se extiende entre Nicaragua, Haití y República Dominicana. El archipiélago es mayormente de origen volcánico y está formado por tres islas mayores que son San Andrés (extensión de 45 Km<sup>2</sup>), Providencia (17,2 Km<sup>2</sup>) y Santa Catalina (1 Km<sup>2</sup>) y un grupo de cayos (con extensión total de 8,3 Km<sup>2</sup>) como Albuquerque, Serrana, Roncador, Quitasueño y *Three Brothers*, entre otros (Galeano *et al.*, 2010; Aguilera, 2010). El archipiélago, ubicado entre los meridianos 78° y 82° latitud oeste y los paralelos 12° y 16° longitud norte, fue declarado en el año 2000 como Reserva Mundial de la

Biósfera SEAFLOWER por la UNESCO lo cual aumenta la importancia del estudio, protección y conservación de esta área. (INVEMAR, 2005). Sin embargo, la extensión total del territorio se redujo en un 40% como resultado del litigio interpuesto por Nicaragua para definir los límites marítimos de ambos países (Bolaños y Acosta, 2013). Éste fue resuelto de manera desfavorable para Colombia por la Corte Internacional de la Haya el 19 de noviembre de 2012. La decisión replanteó el meridiano 82 como límite marítimo y otorgó a Nicaragua una extensión considerable de aproximadamente 96000 Km<sup>2</sup> del suelo marino del archipiélago a Nicaragua (Bolaños y Acosta, 2013), en franco detrimento de la comunidad raizal y otros pobladores del archipiélago que dependen de los recursos marinos de la zona.

Las islas del archipiélago presentan un clima tropical lluvioso. En la zona se presentan dos estaciones, una seca entre y abril y otra lluviosa entre mayo y diciembre siendo el mes de mayo un mes de transición, junio un mes de alta pluviosidad, julio y agosto moderadamente lluviosos y septiembre, octubre y noviembre los meses más lluviosos (García *et al.*, 2003). Las lluvias fluctúan entre 1500 y 2450 mm anuales. Los meses más lluviosos son octubre y noviembre con precipitaciones mensuales de 358 mm y el mes más seco es abril con precipitaciones de 22 mm (Aguilera, 2010). Las mareas de la zona características del mar Caribe, con una amplitud máxima de su nivel de 40 a 60 cm. Los vientos predominantes son los Alisios del nororiente. El archipiélago está influenciado por la corriente marina del Caribe que fluye de oriente a occidente impulsada por los vientos Alisios del nororiente (García *et al.*, 2003).

La isla de San Andrés ubicada entre los 12°28'58'' y 12°35'55'' N y 81°40'49'' y 81°43'23''W, tiene 12,6 Km de longitud y un ancho variable de hasta 5 Km. Presenta regiones de baja altitud sobre el nivel del mar en las regiones norte y sur de la isla, en la región central presenta una cadena de colinas de forma alargada dentro de las que se destacan por su altura *Brook Hills* y *May's Hills* de 78 msnm (Aguilera, 2010). La isla presenta un complejo arrecifal que es predominante en el costado nororiental donde tiene una longitud aproximada de 18 km y un ancho máximo de 10 km con un área total de 97,5 km<sup>2</sup>. Esta barrera protege la isla del fuerte oleaje del mar abierto y ha dado origen a arenas biogénicas calcáreas. En el costado occidental se encuentran también extensas praderas de pastos marinos (Díaz *et al.*, 2000).

La Isla de Providencia ubicada entre 13°19'23'' y 13°23'50'' N y 81°21'08'' y 81°23'58'' W, tiene 7 Km de largo y un ancho variable de hasta 4 Km. La isla presenta un relieve más pronunciado que San Andrés con fuertes pendientes y acantilados, se destacan las colinas *Patience Hill* y *The Peak Hill* por su altura máxima de 350 msnm. Al norte de la Isla de Providencia, se encuentra la Isla de Santa Catalina la cual presenta también un relieve quebradizo (Aguilera, 2010). Santa Catalina se encuentra separada de Providencia por un canal somero y estrecho, de origen también volcánico (INVEMAR, 2009).

La costa oriental de Providencia presenta un extenso arrecife de barrera de 32 Km que se extiende desde el costado suroriental de la isla y sobrepasa la Isla de Santa Catalina al nororiente. Esta barrera coralina es la más extensa de Colombia y la segunda más grande del Caribe después de la de Belice. Los ambientes marinos costeros alrededor de las islas comprenden litorales rocosos, playas arenosas, bosques de manglar, praderas de pastos marinos, arrecifes rocosos y de coral, fondos blandos y lagunas arrecifales de poca profundidad (García *et al.*, 2003).

### 2.2.3. Islas del Rosario.

Las Islas del Rosario se encuentran ubicadas dentro del archipiélago de Nuestra Señora del Rosario (Parque Nacional Natural Corales del Rosario y San Bernardo) entre los 10°15' y 9°35' N y los 75°47' y 75°50' W. El archipiélago comprende 30 islas, cayos e islotes de origen volcánico y presenta la formación coralina más extensa, desarrollada y diversa de la plataforma continental colombiana (Pineda *et al.*, 2006).

En la zona se presentan dos estaciones secas, verano mayor (diciembre a abril) y verano menor (julio a agosto), y un patrón bimodal de lluvias, con dos estaciones húmedas o lluviosas, la mayor (septiembre a noviembre) y la menor (mayo a junio). La región está influenciada por los vientos Alisios y las corrientes marinas del Caribe y la contracorriente Panamá-Colombia dependiendo de la oscilación norte-sur de la ZCIT durante el año. La Corriente del Caribe predomina durante las épocas secas con los vientos Alisios del noreste-este y durante la época lluviosa predomina la contracorriente Panamá-Colombia con los vientos del suroeste-oeste (Rojas, 1996; INVEMAR, 2001; Franco, 2005).

Las islas del Rosario se encuentran afectadas por las descargas de aguas continentales cargadas de sedimentos, altas concentraciones de materia orgánica y nutrientes provenientes del Canal del Dique a través de los caños Lequerica y Matunilla (Vivas-Aguas, 2010). Dependiendo de la época del año y de las corrientes, varían los efectos de estas descargas sobre las islas del Rosario. Durante la época seca, las descargas del Canal del Dique tienen un efecto leve debido a su bajo caudal y a la dirección suroccidente de las corrientes marinas por la influencia de los vientos Alisios y la influencia de la corriente del Caribe. Sin embargo, durante la época lluviosa el caudal del Canal del Dique aumenta considerablemente y la corriente marina tiene una dirección nororiental debido a que en dicha época la contracorriente Panamá-Colombia se extiende hasta la Guajira. Esto, dirige las descargas de Canal del Dique hacia las Islas del Rosario. Las descargas del Canal del Dique tienen un marcado efecto negativo sobre ecosistemas como los arrecifes coralinos presentes en las islas, aportando una gran cantidad de sólidos suspendidos y generando considerables incrementos en la concentración de nutrientes como nitratos y fosfatos en la zona, lo cual podría estimular la formación de afloramientos algales y de cianobacterias, (Pineda *et al.*, 2006; Vivas-Aguas 2010; Paerl *et al.*, 2011; Paerl y Paul, 2012 ).

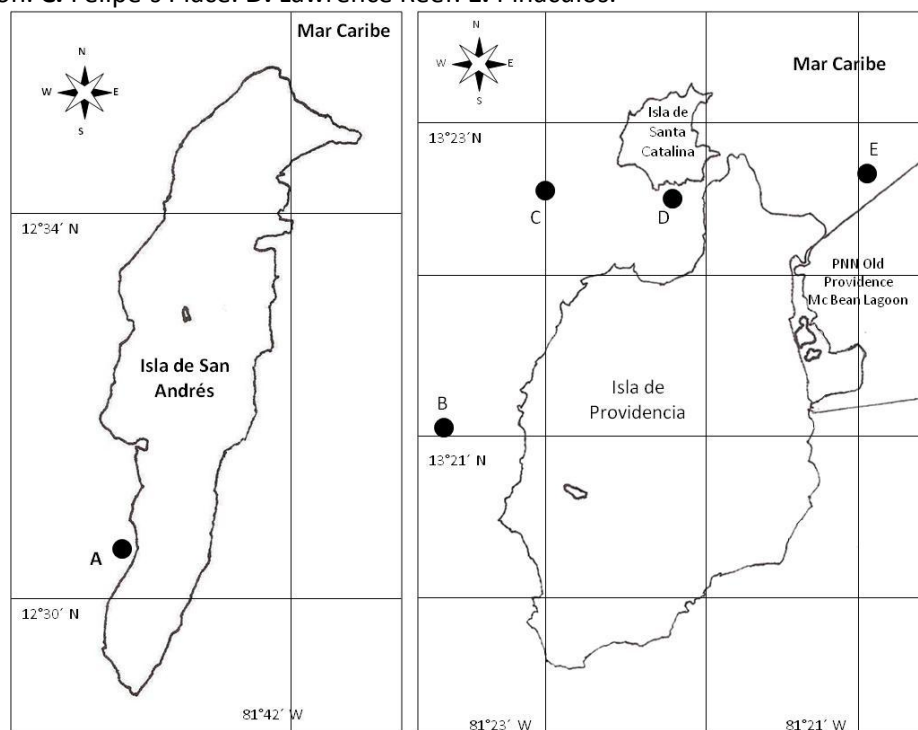
Los ecosistemas marinos de las Islas del Rosario se encuentran afectados también por otros factores como los vertimientos de aguas residuales, la sobrepesca, la pesca con dinamita y el transporte de embarcaciones. A esto se suman otras fuentes de contaminación de origen continental como la actividad portuaria, los dragados, el cultivo de camarones y la contaminación de la Bahía de Cartagena (Pineda *et al.*, 2006).

## 2.3. Metodología

### 2.3.1. Sitios de muestreo

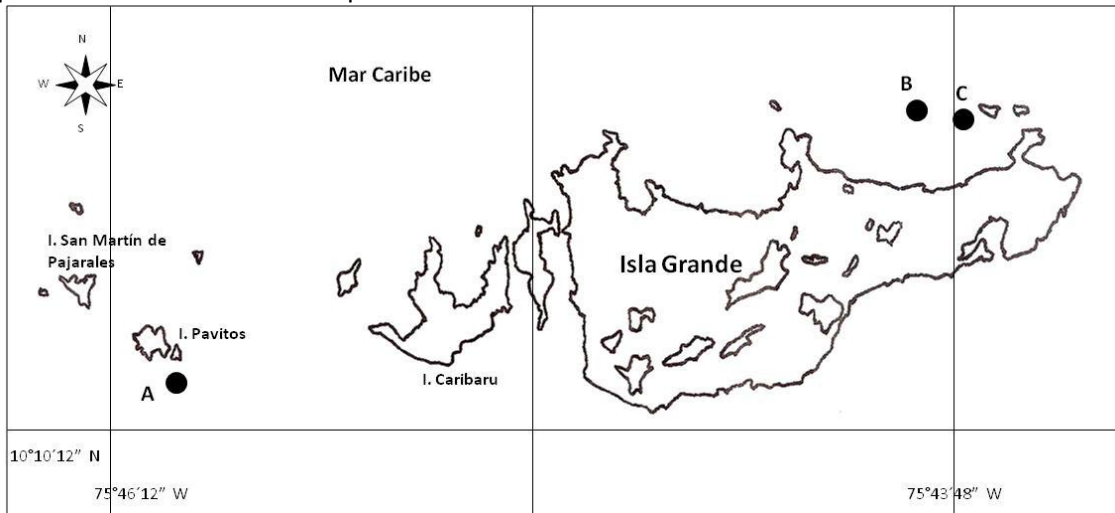
En la isla de San Andrés, los muestreos fueron realizados la estación del Faro a profundidades de 3 a 15 m. Esta estación fue seleccionada debido a los reportes por parte de instructores de buceo que observaron afloramientos de cianobacterias marinas. El sector ubicado en la región suroccidental de la isla está caracterizado presentar litorales rocosos y tener una plataforma continental menos extensa que el costado oriental (García *et al.*, 2003) (Figura 2.3). Los muestreos realizados en las Islas de Providencia y Santa Catalina fueron llevados a cabo en cinco estaciones diferentes con profundidades someras entre 3 y 25 m. Las estaciones muestreadas durante las salidas de campo fueron: Planchón y Felipe's Place ubicadas al nor-occidente de Providencia, Lawrence Reef ubicada al Sur de la Isla de Santa Catalina y Pináculos ubicada al nororiente de Providencia (Figura 2.3).

**Figura 2.3.** Estaciones de muestreo en las Islas de San Andrés (Izquierda), Providencia y Santa Catalina (Derecha). Las letras en mayúscula indican la posición de los sitios de muestreo. **A.** Faro. **B.** Planchón. **C.** Felipe's Place. **D.** Lawrence Reef. **E.** Pináculos.



Durante el presente trabajo, se realizaron muestreos dentro en las Islas del Rosario en tres estaciones diferentes, Isla Pavitos y en la costa norte de Isla Grande (estaciones Ministerio y Botellas de Daguét) (Figura 2.4). Los muestreos fueron realizados en los meses de septiembre de 2010 y 2011 y en el mes de abril de 2012.

**Figura 2.4.** Estaciones de muestreo en las Islas del Rosario. Las letras mayúsculas indican la posición de las estaciones respectivas. **A.** Pavitos. **B.** Ministerio. **C.** Botellas.



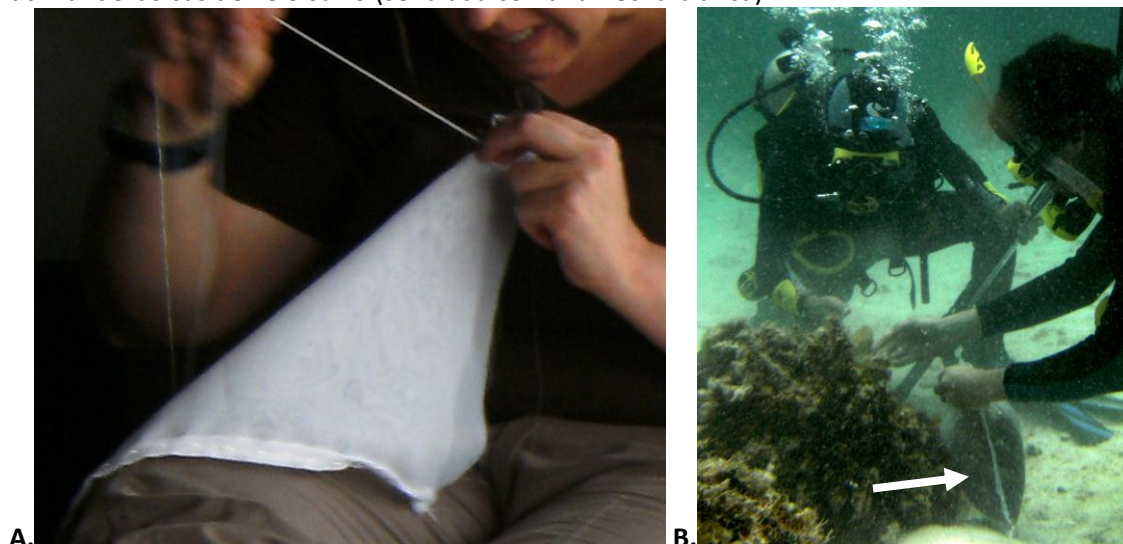
### 2.3.2. Recolección de las cianobacterias

En los diferentes sitios visitados, se recolectaron muestras de los afloramientos de cianobacterias que fueron utilizados para la obtención de extractos y la identificación de los principales *taxa* de cianobacterias presentes. Los extractos fueron utilizados en el presente trabajo para la realización de los ensayos de disuasión de la herbivoría (Capítulo 4), alelopatía con corales (Capítulo 5) e interacciones con otros microorganismos (Capítulo 6). También fueron empleados para los estudios químicos presentados en los trabajos de Quintana (2011) y Bayona (2012). Adicionalmente, durante los muestreos se realizaron observaciones de las características y abundancia de los afloramientos y se tomaron medidas de las variables fisicoquímicas del agua.

Los diferentes morfotipos de cianobacterias marinas bentónicas fueron recolectadas a mano mediante buceo autónomo. De cada morfotipo se recolectó aproximadamente 1 L. Para la recolección en campo, se utilizaron bolsas confeccionadas con la tela denominada “velo suizo” (Figura 2.5), la cual tiene poros muy pequeños que permiten la salida del agua pero retienen la biomasa de cianobacterias y arena, las cianobacterias fueron recolectadas a mano o utilizando brochas y espátulas.

De cada muestra se conservaron aproximadamente 10-20 g en una solución de formol en agua de mar al 4% para la identificación morfológica y 10 g se conservaron en etanol al 96% para análisis moleculares. El resto se congeló inmediatamente para su transporte y la posterior obtención de los extractos químicos y eventuales análisis moleculares.

**Figura 2.5.** Bolsas de velo suizo confeccionadas para la recolección en campo de las cianobacterias **A.** Confección manual de las bolsas de velo. **B.** Recolección de cianobacterias utilizando bolsas de velo suizo (señalada con una flecha blanca).



### 2.3.3. Obtención de extractos orgánicos a partir de los tapetes de cianobacterias

A partir de cada morfotipo de cianobacterias recolectado, se realizaron extractos empleando solventes orgánicos. Las muestras fueron escogidas teniendo en cuenta la abundancia local durante los afloramientos y la cantidad de biomasa disponible para las extracciones.

Las muestras congeladas fueron liofilizadas por 48 horas para ser posteriormente extraídas utilizando una mezcla de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (1:1) durante 24 horas en oscuridad. Las extracciones fueron realizadas a temperatura ambiente por triplicado renovando cada vez la mezcla de solventes. Los extractos fueron filtrados y concentrados al vacío a 40 °C utilizando un rotaevaporador. Los extractos concentrados fueron refrigerados a 4 °C para su posterior uso en los diferentes análisis y experimentos.

### 2.3.4. Descripción de los afloramientos e identificación morfológica de las principales especies de cianobacterias presentes en los mismos

Durante los afloramientos se observaron distintos tipos de tapetes de cianobacterias con características macroscópicas particulares como el color, la textura y el tipo de crecimiento. Los tapetes más característicos y abundantes durante los afloramientos fueron fotografiados en campo y descritos en detalle. De cada tipo de tapete particular recolectado, se realizó la identificación microscópica de los principales morfotipos que lo componían buscando llegar al nivel taxonómico más bajo posible. Las cianobacterias que forman los tapetes característicos en

los afloramientos presentan dimensiones que hacen posible su identificación mediante microscopía (Thacker y Paul, 2004; Komárek y Anagnostidis, 2005; Sharp *et al.*, 2009).

Las descripciones morfológicas de las especies de cianobacterias recolectadas durante los afloramientos, se basaron en las claves y descripciones taxonómicas propuestas por Komárek y Anagnostidis (2005).

Para realizar la identificación de los morfotipos de cianobacterias, se tomaron tres porciones de cada muestra almacenada en formol en agua de mar al 4% para ser analizadas bajo un microscopio óptico Nikon. El microscopio se acopló a una cámara digital, las imágenes captadas fueron analizadas utilizando el *software* NIS-Elements Br 2.30 Imaging Software de Nikon, el cual, permite realizar las mediciones necesarias para cada morfotipo usando varios aumentos, hasta 1000 magnificaciones.

Para la identificación morfológica, se tuvieron en cuenta varios caracteres taxonómicamente relevantes, como el ancho de los tricomas, longitud de las células, presencia de caliptra, isopolaridad en los filamentos, la forma de las células apicales, presencia de atenuaciones en los extremos de los tricomas, presencia de constricciones intertabulares y de vainas mucilaginosas que envuelven a los tricomas. Las medidas del ancho y longitud de las células de cada uno de los morfotipos fueron tomadas teniendo en cuenta realizar como mínimo 10 mediciones por carácter para cada morfotipo, posteriormente se determinaron los valores promedio de cada carácter para luego establecer los rangos promedio dentro de los cuales se encontraron las medidas características para cada morfotipo de acuerdo a Thacker y Paul (2004).

### **2.3.5. Identificación molecular de cianobacterias presentes en los afloramientos**

Se realizaron varios procedimientos para la identificación molecular de las cianobacterias presentes en los tapetes más representativos observados durante los afloramientos. Para ello se seleccionaron 13 muestras de los tapetes de cianobacterias marinas que fueron los más importantes usando como criterios de selección su abundancia local, la toxicidad de sus extractos orgánicos contra *Artemia salina*, su relevancia ecológica y los morfotipos observados en la identificación morfológica (Tabla 2.1). La identificación molecular de las cianobacterias fue realizada utilizando las secuencias parciales del gen de la subunidad 16s del rRNA ya que esta región ha sido la más utilizada en estudios filogenéticos de cianobacterias marinas arrecifales del orden Oscillatoriales (Thacker y Paul, 2004; Boutte *et al.*, 2006; Sharp *et al.*, 2009; Engene *et al.*, 2011).

Para la identificación molecular de los taxa de cianobacterias presentes en los tapetes, se utilizaron las muestras que se mantuvieron congeladas a -20°C y en algunos casos las muestras conservadas en etanol al 96%, dependiendo de los resultados en las extracciones de ADN genómico para cada muestra.

**Tabla 2.1.** Descripción de las muestras de cianobacterias arrecifales utilizadas en las pruebas para la identificación molecular.

Muestra #	Descripción morfológica y detalles de la colecta	Identificación morfológica *	CL <sub>50</sub> (ppm) 24 h contra <i>Artemia salina</i>	Abundancia local
1	Biopelículas marrones San Andrés, Faro octubre, 2009	<i>Lyngbya</i> spp. y <i>Oscillatoria margaritifera</i>	>1000	Muy Abundante
2	Tapetes rojizos de filamentos gruesos Islas del Rosario, Ministerio septiembre, 2010	<i>Lyngbya majuscula</i> y <i>Lyngbya sordida</i>	250	Muy Abundante
3	Cianobacteria roja incrustante Providencia, Lawrence Reef octubre, 2009	<i>Lyngbya majuscula</i> y <i>Lyngbya sordida</i>	400	Ocasional
4	Tapetes algodonosos Providencia, Pináculos julio, 2010	<i>Symploca hydnoides</i> y <i>Phormidium submembranaceum</i>	130	Muy Abundante
5	Cianobacteria Incrustante oscura Providencia, Lawrence Reef octubre 5, 2009	<i>Oscillatoria nigroviridis</i>	5	Ocasional
7	Tapetes de filamentos largos rojos Providencia, Pináculos julio, 2010	<i>Oscillatoria acuminata</i> <i>Spirulina subsalsa</i> .	>1000	Abundante
8	Tapetes rojizos de filamentos gruesos Providencia, Pináculos julio, 2010	<i>Lyngbya majuscula</i> y <i>Lyngbya sordida</i>	127	Ocasional
9	Biopelículas rojas San Andrés, Faro octubre, 2010	<i>Lyngbya</i> spp. y <i>Oscillatoria margaritifera</i>	NE	Muy Abundante
10	Biopelículas marrones San Andrés, Faro julio, 2010	Consorcio de <i>Lyngbya</i> spp. ( <i>Lyngbya</i> sp., <i>L. cf confervoides</i> y <i>L. cf majuscula</i> )	>1000	Muy Abundante
11	Biopelículas rojas Providencia, Planchón julio, 2010	Consorcio de <i>Lyngbya</i> spp. y <i>Oscillatoria</i> spp. ( <i>L.cf semiplena</i> , <i>L.cf majuscula</i> ) ( <i>O. nigroviridis</i> , <i>O. margaritifera</i> )	60	Muy Abundante
13	Tapetes algodonosos Providencia, Pináculos julio, 2010	<i>Symploca hydnoides</i> y <i>Phormidium submembranaceum</i>	130	Muy Abundante
14	Tapetes rojos sobre octocorales. San Andrés, Faro, julio, 2010	<i>Oscillatoria</i> spp. <i>Phormidium gracile</i> y <i>Lyngbya</i> sp.	NE	Ocasional
15	Biopelículas rojas San Andrés, Faro octubre, 2010	<i>Lyngbya</i> spp. y <i>Oscillatoria margaritifera</i>	274	Muy Abundante

(\*) Determinación taxonómica morfométrica tradicional siguiendo la clave de Komárek y Anagnostidis (2005). (NE) No ensayado frente a *A. salina*.

El ADN genómico fue extraído a partir de aproximadamente 0,8 g de cada muestra de tapete de cianobacterias. Las muestras fueron cortadas muy finamente con escalpelos de cirugía estériles en cajas de petri individuales estériles. La extracción de ADN se realizó utilizando el kit UltraClean® Soil DNA extraction (MO BIO Laboratories Inc.) siguiendo las instrucciones del



fabricante. Para mejorar la extracción se realizó una lisis celular mediante choque térmico antes de agregar las diferentes soluciones sugeridas en el Kit. El choque térmico consistió en congelar por 10 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$  las muestras previamente introducidas en los tubos del kit, para luego ser puestas de inmediato a baño de maría a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos. Posteriormente, se continuó con el protocolo especificado por el fabricante. Debido al alto contenido de pigmentos en las muestras de cianobacterias, se realizó una segunda modificación al protocolo, la cual consistió en hacer una extracción de los pigmentos y otras impurezas agregando  $500\ \mu\text{l}$  de fenol concentrado al sobrenadante obtenido después de centrifugar el producto de la lisis química realizada con la solución 1 más el removedor de inhibidores de la PCR (Solución IRS). El fenol y el sobrenadante fueron mezclados con agitación manual vigorosamente. Posteriormente se centrifugó a  $6000\ \text{g}$  durante 1 minuto. El sobrenadante obtenido con menor contenido de pigmentos y otras impurezas, fue empleado para continuar con los pasos posteriores para la extracción y purificación del ADN indicados en el Kit.

Para confirmar una extracción exitosa del ADN genómico, los productos de extracción fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% con tinción de bromuro de etidio. Como control, se extrajo ADN con el mismo kit el ADN de un cultivo de *E. coli*. La presencia de una banda bien definida y con intensidad suficiente para su visualización confirmó una buena extracción. Sin embargo, en algunas ocasiones la concentración de ADN fue baja y no se pudo visualizar una banda clara con la tinción de bromuro de etidio, a pesar de esto, después de realizar la PCR como se indica a continuación, fue posible la amplificación exitosa del gen de interés.

La amplificación del gen de la subunidad 16s del rRNA se realizó mediante PCR utilizando los *primers* específicos para cianobacterias CYA 106F (CGG ACG GGT GAG TAA CGC GTG A) y una mezcla equimolar de los *primers* CYA 781R(a) (GAC TAC TGG GGT ATC TAA TCC CAT T) y 781R(b) (GAC TAC AGG GGT ATC TAA TCC CTT T) diseñados por Nübel *et al.* (1997).

Se utilizaron dos tipos de *primers* reversos (CYA 781R a y b), éstos difieren entre sí en las posiciones 7 y 23 (en sentido 5' a 3'). Estos *primers* reversos fueron utilizados en conjunto debido a que según estudios *in silico* realizados por Boutte *et al.* (2006) de 346 secuencias diferentes de cianobacterias filamentosas sin heterocistos, incluyendo los géneros *Oscillatoria*, *Lyngbya*, *Symploca* y *Phormidium* entre otros, el 69,3% se alineó con el *primer* CYA 781R(a), el 24,6% con el *primer* CYA 781R(b), mientras que el 6,1% restante no se alineó con ninguno de los dos *primers* reversos. De esta manera, al usar los dos *primers* reversos al tiempo, se aumentó la probabilidad de amplificar la mayor parte de secuencias de cianobacterias presentes en las muestras. El producto de amplificación presentó un tamaño de 675 pb.

Las reacciones de PCR fueron realizadas para obtener un volumen final de  $50\ \mu\text{l}$ . Las concentraciones y volúmenes empleados para la reacción fueron  $1\ \mu\text{l}$  de ADN templado (aprox.  $50\ \text{ng}$  y  $<250\ \text{ng}$ ),  $1\ \mu\text{l}$  de mezcla de dNTP ( $10\ \text{mM}$  de cada uno),  $10\ \mu\text{l}$  de buffer TBE ( $5\times$ ),  $0,5\ \mu\text{l}$  del *primer* CYA 106F (para concentración final de  $200\ \text{nM}$ ),  $0,3\ \mu\text{l}$  cada uno de los *primers* CYA 781R(a) y (b) (para  $200\ \text{nM}$  de concentración final),  $0,2\ \mu\text{l}$  de Taq ADN polimerasa ( $5\ \text{U}/\mu\text{l}$ ),  $4\ \mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2$  ( $25\ \text{mM}$ ),  $2\ \mu\text{l}$  de BSA ( $10.000\ \text{ng}/\mu\text{l}$ ) y  $30,8\ \mu\text{l}$  de agua ultrapura desionizada.

Las condiciones de temperatura de la PCR previamente estandarizadas utilizando diferentes gradientes de temperatura según lo sugerido por Nübel *et al.* (1997). Las PCR fueron realizadas en

un termociclador MultiGene de LabNet, siguiendo el siguiente programa, denaturación inicial (4 min a 94°C), 37 ciclos de amplificación (50 seg a 94°C, 45 seg a 50°C y 35 seg a 72°C) y 4 min de elongación final a 72°C.

Dado que las muestras de los tapetes de cianobacterias encontradas durante los afloramientos estaban conformados por más de una especie de cianobacteria, los productos de PCR fueron clonados usando el kit TOPO® TA Cloning® (Invitrogen) con la finalidad de obtener secuencias individuales dentro de cada clon. Los productos de amplificación del 16S rDNA fueron insertados dentro del vector pCR™4-TOPO® (Invitrogen). Los vectores fueron insertados en células de *Escherichia coli* químicamente competentes One Shot® TOPO® (Invitrogen). La transformación de las células se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante agregando 1,5 µl del producto de PCR.

Las células transformadas fueron cultivadas en cajas de petri con agar y medio LB con 50 µl/ml de ampicilina. En la superficie del medio de cultivo de cada una de las cajas se agregaron 20 µl de X-gal (40 mg/mL) resuspendido en dimetilformamida (DMF), con el fin de poder diferenciar las colonias de clones con el inserto de interés (colonias con el inserto de 16S rDNA, coloración blanca) de las que no tenían el inserto (coloración azul).

El volumen del inóculo de células transformadas agregado a cada caja de petri fue escogido dentro del rango propuesto por el fabricante del kit de clonación. Para lograr definir la cantidad de inóculo exacta a agregar a los medios, se realizaron varias pruebas preliminares ensayando diferentes volúmenes de inóculo. De esta manera se logró encontrar el volumen de inóculo adecuado que permitió obtener suficientes colonias que a su vez se crecieran convenientemente separadas entre sí para evitar obtener colonias superpuestas. Finalmente, el volumen de inóculo utilizado fue de 35 µl, el cual fue agregado a 3 cajas de petri diferentes para cada uno de los productos de transformación las cuales fueron incubadas a 37°C durante una noche.

De cada transformación se escogieron de 8 a 16 clones o colonias blancas que fueron sembradas por agotamiento en diferentes cajas de petri con el medio descrito anteriormente (LB + Ampicilina + X-gal). El criterio para escoger 8 o 16 clones por muestra fue la cantidad de morfotipos encontrados en los análisis de identificación morfológica, de manera que a mayor cantidad de morfotipos observados se escogía un mayor número de clones. Los cultivos realizados por agotamiento a partir de cada clon fueron cultivados de nuevo a 37°C durante toda la noche. Posteriormente, de cada cultivo obtenido por agotamiento se tomó una colonia aislada y se resembró de la misma manera en agar LB, incubando de nuevo durante toda la noche. Esto se realizó por triplicado para evitar cualquier posible contaminación por colonias oportunistas sin resistencia al antibiótico que crecieran en cercanía a los clones deseados o por la superposición de colonias originadas a partir de más de un clon diferente. Finalmente, se seleccionó una colonia aislada y se realizó un cultivo masivo en cajas de petri con agar LB, dejando incubar toda la noche a 37°C para realizar la posterior extracción del ADN plasmídico en el cual se encontró el inserto del 16S rDNA de interés. El ADN plasmídico fue obtenido de cada clon usando el kit PureLink™ Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se obtuvieron 86 insertos que fueron secuenciados en el laboratorio de extensión de la Universidad Nacional de Colombia usando el kit DYEnamic ET Dye Terminator (MegaBACE) en un secuenciador MegaBACE 1000 (GE Amersham). Las secuencias de estos insertos fueron editadas

con el programa Sequencher V 1.4, con el objetivo de eliminar los extremos ya que éstos generalmente no se pueden secuenciar adecuadamente, para su posterior comparación con las secuencias disponibles en las bases de datos. La identidad de las secuencias obtenidas en este trabajo fue confirmada comparando la secuencia de nucleótidos con la base de datos del GeneBank del National Center of Biotechnology (NCBI) usando la herramienta BLAST.

Finalmente, se construyeron diferentes árboles filogenéticos que permitieron organizar y entender de mejor manera las asociaciones entre las secuencias obtenidas y las disponibles en las bases de datos. Dentro de los análisis se incluyeron secuencias de referencia obtenidas a partir de las bases de datos de las especies *Lyngbya majuscula*, *L. sordida*, *L. confervoides*, *Symploca hydroides*, *Phormidium subليفة*, *Phormidium* sp ARKK2, *P. animale*, *P. pseudopriestleyi*, *P. tenue*, *Moorea bouillonii*, *M. producta*, *Oscillatoria acuminata*, *O. margaritifera*, *O. nigroviridis*, *Oscillatoria* sp. PAB-21, *Spirulina subsalsa*, y como *outgroups* se utilizaron las secuencias de *Alivibrio fisheri* y *Pseudomonas* sp. AMF 1075. Los números de acceso del GenBank se pueden observar dentro del árbol presentado en la Figura 2.30. Para la realización de los análisis filogenéticos, las secuencias editadas y las de referencia fueron alineadas con la aplicación Muscle dentro del software Mega 5.10 Beta 2. Luego, se generó un árbol filogenético utilizando método estadístico de *Neighbor-joining* con 1000 réplicas de *Bootstrap* y el modelo de *Maximum Composite Likelihood* usando el software Mega 5.10 Beta 2.

## 2.4. Resultados

### 2.4.1. Descripción de los afloramientos de cianobacterias bentónicas en las áreas de estudio

Durante los afloramientos fue posible observar distintos tipos de tapetes de cianobacterias con características macroscópicas particulares como el color, textura y el tipo de crecimiento. Los tapetes de cianobacterias más comunes, frecuentes y abundantes se denominaron de acuerdo con sus características más notorias como (a) tapetes rojizos de filamentos gruesos, (b) tapetes algodonosos, (c) biopelículas marrones y rojo-púrpura, (d) tapetes de filamentos largos rojos y (e) Tapetes rojos sobre octocorales. Todos los tapetes resultaron estar compuestos por más de una especie de cianobacteria. Los tapetes se describen a continuación incluyendo información sobre las localidades y fechas donde fueron detectados, se presentan también fotografías subacuáticas *in situ* de los tapetes, las cuales constituyen importantes aportes gráficos complementados con información taxonómica del los afloramientos en el Caribe colombiano. Posteriormente se incluye una descripción de cada una de las especies que se pudo identificar plenamente en los diferentes tapetes.

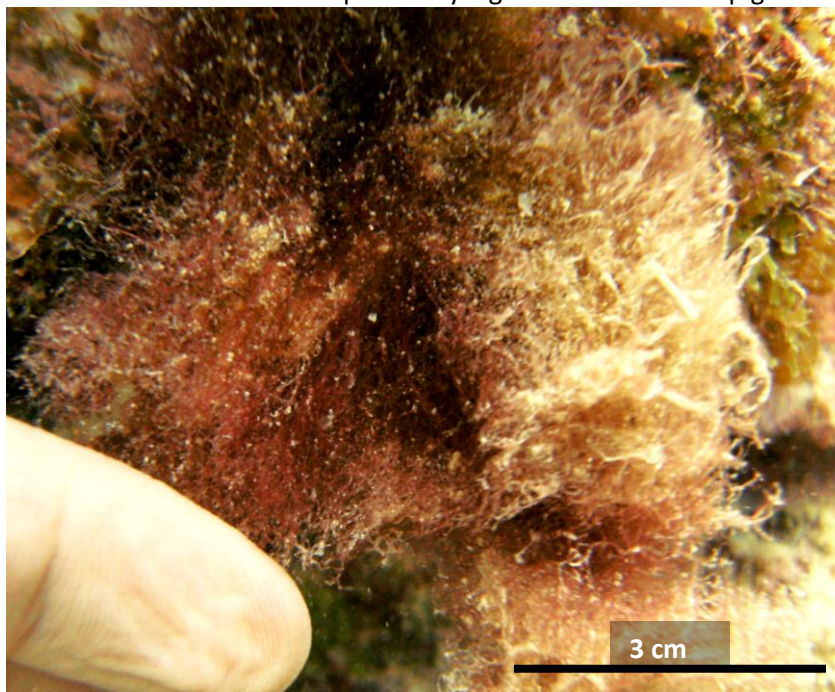
### 2.4.1.1. Tapetes rojizos de filamentos gruesos (Figura 2.6)

Isla de Providencia: Pináculos (octubre 2009, julio 2010), Felipe's Place (julio 2010)

Islas del Rosario: Botellas, Ministerio y Pavitos (septiembre 2010, septiembre 2011)

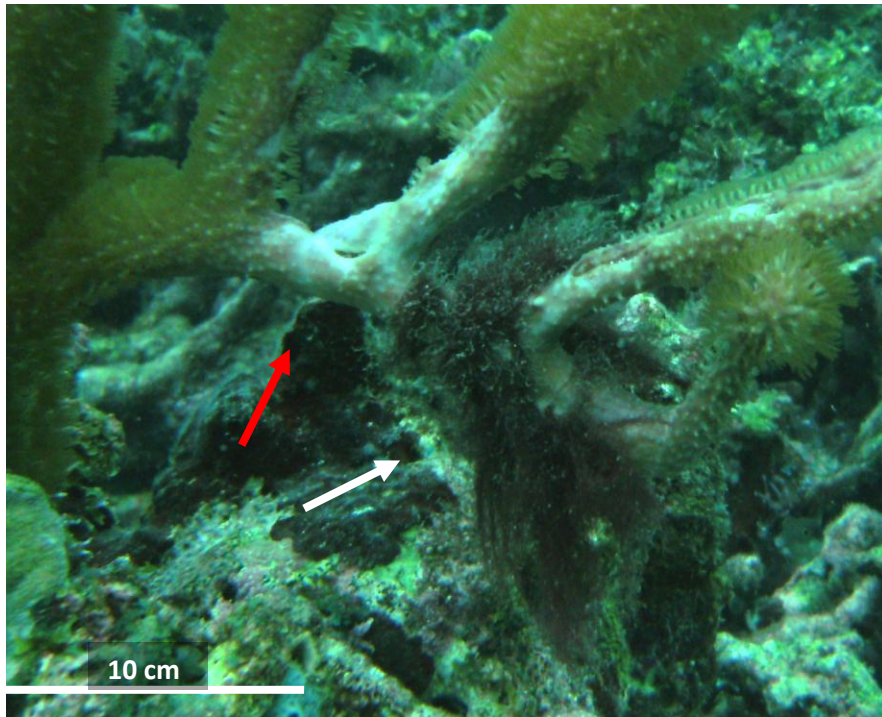
Tapetes conformados por marañas de filamentos más o menos ondulados, muy gruesos y fuertes, notables a simple vista. Coloración variable de rojo a púrpura oscuro, ocasionalmente marrón (Figura 2.6). Durante los afloramientos más notorios, estos tapetes llegaron a cubrir de hasta 5 m<sup>2</sup> de extensión y tener hasta 30 cm de espesor. Se encontraron generalmente adheridos a diferentes superficies de anclaje como macroalgas, fragmentos de coral muerto, rocas y ocasionalmente esponjas, corales y octocorales. En numerosas oportunidades se observó que estos tapetes, al crecer masivamente sobre organismos como corales y octocorales, los sofocaron resultando en daño y necrosis del tejido coralino. Este tipo de tapete de cianobacterias estuvo conformado por ensambles de las especies *Lyngbya majuscula* y *Lyngbya sordida*. Las características en cuanto al tamaño y color de los filamentos de cada especie presente, puede variar según las condiciones ambientales y ecológicas que estén actuando durante cada afloramiento (Sharp *et al.*, 2009).

**Figura 2.6.** Tapetes de cianobacterias de filamentos gruesos y densos de color rojizo en la Isla de Providencia. Se notan los filamentos a simple vista y algunas secciones despigmentadas.

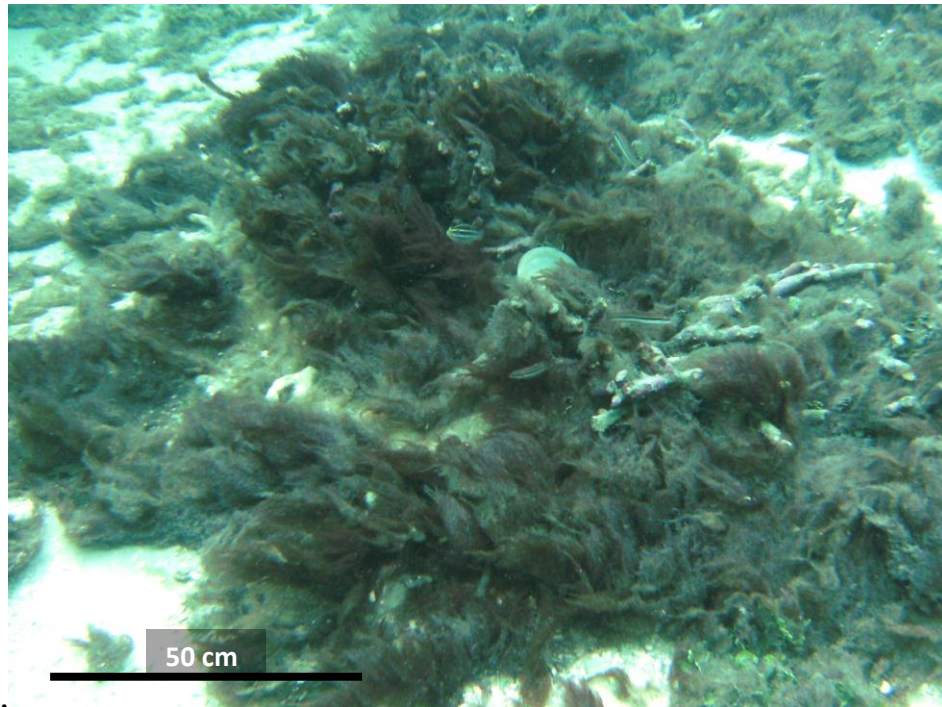


La abundancia de estos tapetes fue variable según el sitio y época del año (Capítulo 3). Durante los afloramientos más conspicuos, estos tapetes llegaron a cubrir varios metros cuadrados del fondo y tener hasta 30 cm de espesor (Figura 2.7).

**Figura 2.7.** A. Tapetes rojizos de filamentos gruesos formados por *Lyngbya majuscula* y *Lyngbya sordida* creciendo sobre un octocoral (Islas del Rosario, septiembre de 2010). La imagen muestra el tejido muerto de coral después de remover el tapete de cianobacterias (flecha roja). Porción remanente del tapete sobre el octocoral (flecha blanca). B. Crecimiento masivo de tapetes conformados por *L. majuscula* y *L. sordida* en las Islas del Rosario. Los peces loro que se observan al centro de la fotografía miden aproximadamente 15 cm de longitud, así se aprecia la magnitud del afloramiento.



A.



B.

Se encontraron generalmente adheridos a diferentes tipos de sustrato que les aportaba una superficie de anclaje, como por ejemplo macroalgas, fragmentos de coral muerto, rocas y otros organismos bentónicos como esponjas, corales y octocorales. En afloramientos observados en las Islas del Rosario en septiembre de 2010, estos tapetes resultaron ser muy abundantes. En numerosas ocasiones, se observó densos tapetes sofocando a otros organismos como octocorales al crecer masivamente sobre ellos, observándose efectos negativos como la muerte del tejido que estaba en contacto con las cianobacterias (Figura 2.7). Durante los no se observó que los peces consumieran estos tapetes, tampoco se observó ningún otro tipo de macro-herbívoro consumiendo estos tapetes.

#### 2.4.1.2. Tapetes algodonosos (Figura 2.9)

Isla de Providencia: Pináculos (octubre 2009, julio 2010).

Islas del rosario: Pavitos, Botellas, Ministerio, (septiembre de 2010, septiembre 2011 y abril de 2012).

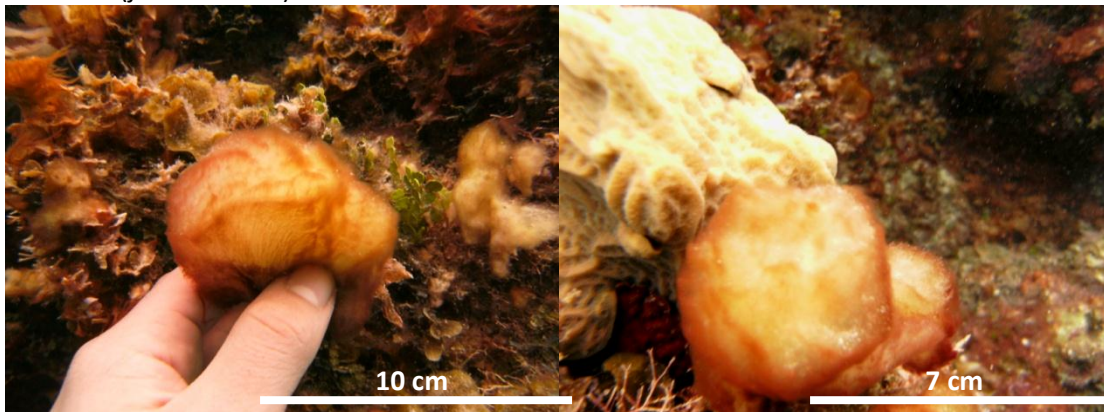
Se encontraron tapetes algodonosos en todas las localidades estudiadas de San Andrés, Providencia y las Islas del Rosario, incluso cuando no había afloramientos conspicuos. Sin embargo, este tipo de tapetes fue particularmente abundante en el sector de los Pináculos (Isla de Providencia) (Figura 2.8).

**Figura 2.8.** Tapetes algodonosos conformados por *Symploca hydroides* y *Phormidium submembranaceum* sobre distintos tipos de sustrato en los Pináculos, Isla de Providencia (julio de 2010), lugar en el cual fueron muy abundantes.



Los tapetes algodonosos se encontraron creciendo en grandes aglomeraciones formando lechos de 3 a 10 cm de espesor y cubriendo áreas continuas de hasta más de un metro cuadrado en colonias independientes. Generalmente estos tapetes, de apariencia algodonosa, se caracterizaron por estar bien pigmentados (amarillo, rojo, violeta) (Figura 2.9) en la parte superior del tapete mientras que su base solía estar despigmentada (color blanco). El análisis microscópico reveló que la mayoría de los tricomas se disponía hacia las regiones apicales de los tapetes posiblemente por fototaxis, mientras que la parte basal de los mismos estaba compuesta principalmente por vainas mucilaginosas vacías.

**Figura 2.9.** Morfología característica de los tapetes algodonosos en los Pináculos, Isla de Providencia (julio de 2010).



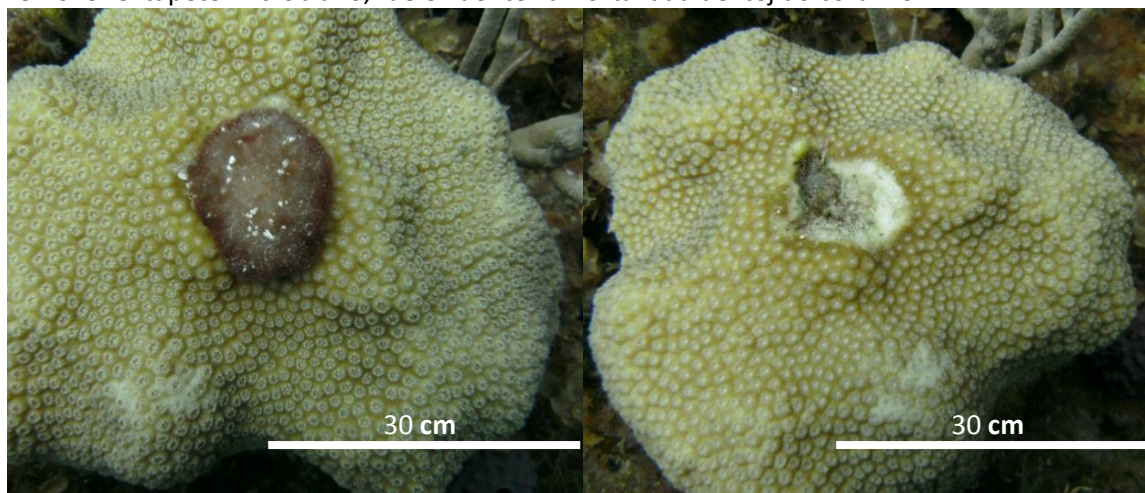
Los tapetes algodonosos crecían sobre una gran variedad de sustratos como macroalgas (principalmente *Sargassum*, *Dictyota*, *Padina* y *Turbinaria*), rocas y en muy escasas ocasiones sobre arena. La forma de crecimiento de estos tapetes estuvo influenciada principalmente del tipo sustrato, adaptando formas verticales alargadas al crecer sobre talos de macroalgas (Figura 2.10).

**Figura 2.10.** Tapetes algodonosos de coloración rojiza creciendo sobre el alga parda *Sargassum* sp. (Pináculos, Isla de Providencia, julio de 2010).



Ocasionalmente se evidenció blanqueamiento y necrosis de corales y octocorales que estaban cubiertos por este tipo de tapetes. Los tapetes algodonosos estuvieron compuestos principalmente por *Symploca hydroides* y *Phormidium submembranaceum*, como especies dominantes. En los tapetes de crecimiento horizontal se encontraron ocasionalmente filamentos de otras cianobacterias como *Oscillatoria acuminata*, *Lyngbya* spp. y *Oscillatoria* spp. En algunas ocasiones se encontraron tapetes algodonosos creciendo sobre corales y octocorales, al ser retirados, los corales presentaron evidencia de blanqueamiento y necrosis (Figura 2.11).

**Figura 2.11.** Tapete algodonoso creciendo sobre un coral hermatípico del género *Montastrea*. Al remover el tapete microbioano, fue evidente la mortalidad del tejido coralino.



#### 2.4.1.3. Biopelículas marrones (Figura 2.12)

Isla de Providencia: Planchón (octubre 2009), Felipe's Place (octubre 2009, julio 2010)

Isla de San Andrés: Faro (octubre 2009, julio 2010)

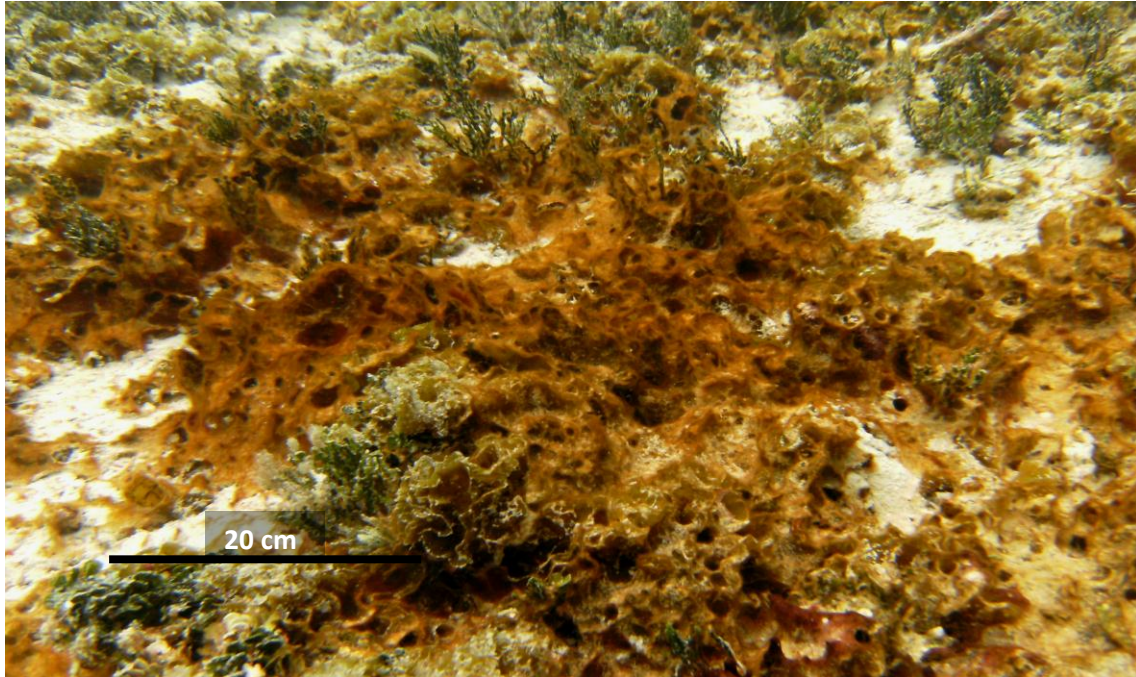
Estos tapetes crecían sobre el sustrato formando delgadas biopelículas de color marrón de menos de 3 mm de espesor (Figura 2.12). Por esta razón eran muy frágiles y se desprendían y desintegraban fácilmente al contacto. Estos tapetes se observaron creciendo sobre arena, cascajo coralino y macroalgas como *Padina*, *Lobophora* y *Dictyota*. Estas biopelículas fueron más densas y gruesas en ciertos puntos notándose una coloración marrón más definida, mientras que en otras zonas fueron más delgadas y por ende el tapete se veía más tenue casi traslúcido.

La composición de las biopelículas marrones varió según el sitio y fecha de recolección. Sin embargo, en general se caracterizaron por estar formadas por un ensamble de más de una especie del género *Lyngbya* con filamentos isopolares de 18-25  $\mu\text{m}$  de ancho envueltos en vainas mucilaginosas independientes. Los distintos filamentos presentaron tres tipos de variaciones morfológicas en las células apicales, lo cual, hizo que la determinación de las especies en este caso fuera complicada. Según las características morfológicas de los filamentos se sugiere la presencia de la especie *Lyngbya confervoides* entre otras especies de *Lyngbya*. En algunos casos



se encontró también la especie *Oscillatoria margaritifera* formando parte importante (cerca del 60% de los filamentos) del ensamble de cianobacterias que conformaba estas biopelículas.

**Figura 2.12.** Biopelículas marrones encontradas en Felipe's Place (Isla de Providencia en julio de 2010) creciendo sobre diferentes tipos de sustrato como arena, macroalgas y cascajo.



#### 2.4.1.4. Biopelículas rojas (Figura 2.13)

Isla de Providencia: Lawrence Reef, Santa Catalina (octubre 2009), Planchón y Felipe's Place (julio 2010)

Isla de San Andrés: Faro (octubre de 2009, julio 2010)

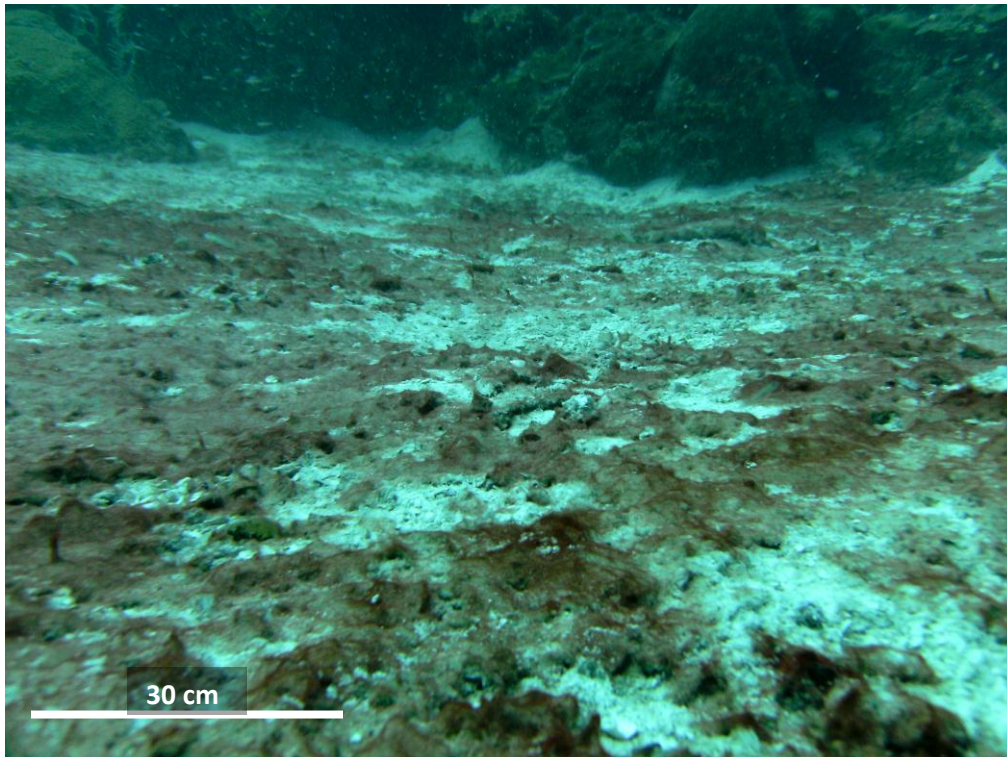
Estos tapetes de cianobacterias crecían a manera de biopelículas delgadas y frágiles al contacto, generalmente de color rojo intenso, en ocasiones a púrpura. Estas biopelículas fueron encontradas creciendo sobre diversos sustratos incluyendo arena, cascajo, roca, macroalgas, esponjas, corales hermatípicos y octocorales. Estos tapetes fueron muy comunes y abundantes en el sector del Faro en San Andrés (Figura 2.13) y en Felipe's place (Providencia).

El análisis microscópico reveló que las biopelículas rojas estuvieron compuestas por especies de *Oscillatoria* y *Lyngbya* en proporciones variables desde un 20% al 70% aproximados para cada género. Ocasionalmente se encontraron algunos filamentos (sin sobrepasar el 10% aproximado) del género *Phormidium*. En estos tapetes se pudo confirmar la presencia de *Oscillatoria margaritifera*, *O. nigroviridis*, *Lyngbya confervoides* y *Phormidium gracile*.

**Figura 2.13.** Imágenes características de las biopelículas rojizas de cianobacterias creciendo sobre diferentes tipos de sustratos como arena y otros organismos. **A.** Faro, San Andrés, julio de 2009. **B.** Crecimiento típico de biopelículas rojizas sobre la arena en Felipe's Place, Providencia, julio de 2010.



A.



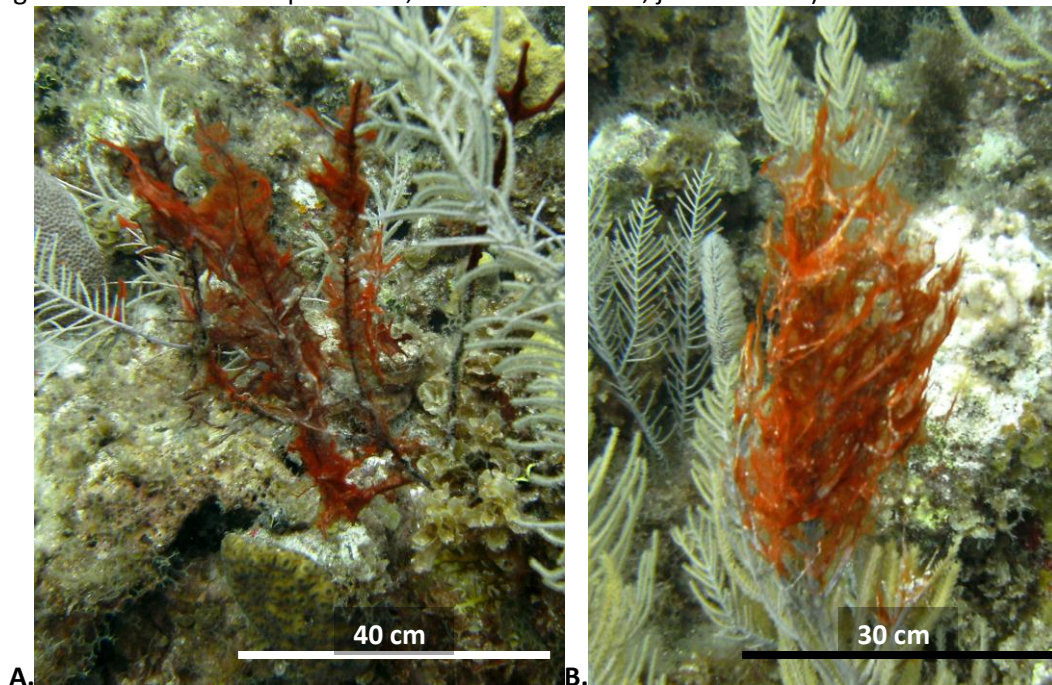
B.

### 2.4.1.5. Biopelículas rojas sobre octocorales (Figura 2.14)

Isla de Providencia: Planchón y Felipe's Place, Lawrence Reef, Santa Catalina (octubre 2009), Planchón y Felipe's Place (julio 2010)

Estas biopelículas muy finas de consistencia frágil y coloración rojo intenso a violeta oscuro, se encontraron creciendo sobre octocorales y corales hermatípicos en varias localidades. Para los octocorales en particular, se pudo constatar que bajo las áreas sobre las cuales crecía la biopelícula, el tejido estaba muerto y el eje de gorgonina expuesto con subsecuente *fouling*.

**Figura 2.14. A y B.** Biopelículas rojizas creciendo sobre diferentes octocorales, el tejido del octocoral bajo la biopelícula se encontraba muerto y se deshacía fácilmente al contacto (Fotografías tomadas en Felipe's Place, Isla de Providencia, julio de 2010).



Estas biopelículas mostraron estar conformados por complejos ensambles microbianos de hasta cinco especies sin predominio de alguna especie en particular, pero a diferencia de las biopelículas rojas, estos tapetes presentaron una significativa representación de *Oscillatoria* spp., seguida de *Phormidium gracile* (hasta un 35% aproximado de los filamentos) en menor grado y ocasionalmente algunos filamentos de *Lyngbya* spp.

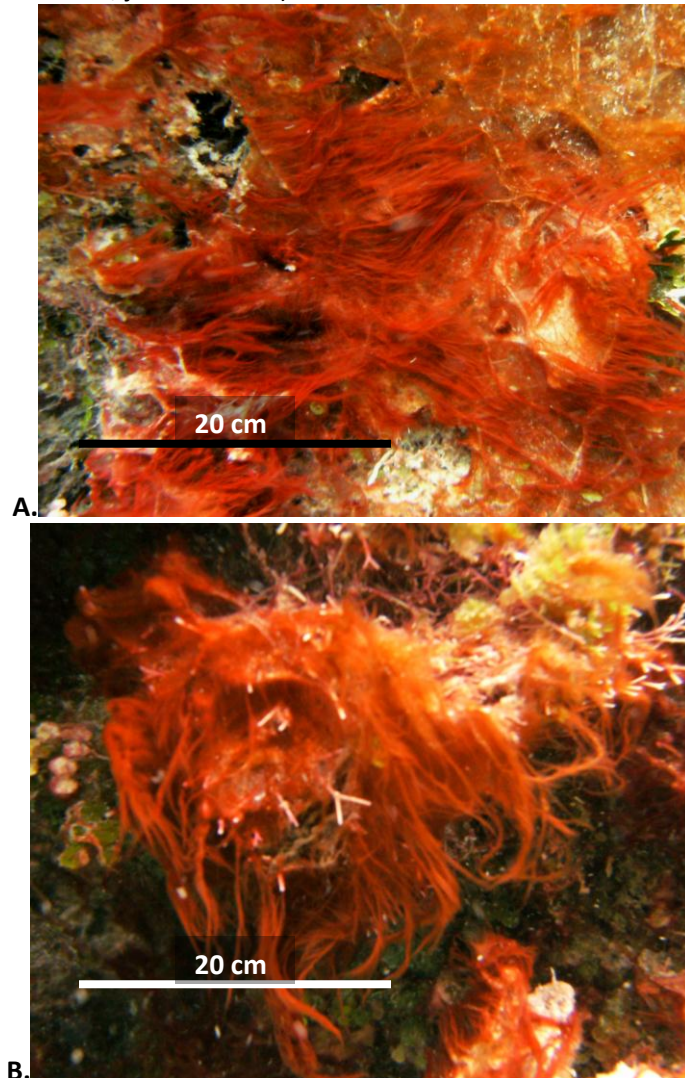
### 2.4.1.6. Tapetes de filamentos largos rojos (Figura 2.15)

Isla de Providencia: Pináculos (octubre 2009, julio de 2010)

Estos tapetes se encontraron únicamente en los Pináculos, isla de Providencia sobre superficies arrecifales verticales o muy inclinadas en zonas con baja incidencia de luz. De un color rojo muy

intenso, este tipo de tapetes presentó largos y delgados filamentos macroscópicos de hasta 40 cm de longitud. Los filamentos tenían una textura suave y delicada, sin embargo no se desintegraban al contacto. Al crecer sobre macroalgas, estos tapetes no causaron efectos negativos aparentes sobre las mismas. Los tapetes de cianobacterias con estas características estuvieron compuestos principalmente por filamentos rectos, lisos y muy largos sin vaina mucilaginosa que los recubriera, agrupados en fascículos a manera de cabellos. En su mayoría (cerca de un 98%), los filamentos del tapete correspondieron a *Oscillatoria acuminata* y el 2% restante correspondió a *Spirulina subsalsa*.

**Figura 2.15. A y B.** Aspecto característico de los tapetes de filamentos largos rojos encontrados en los Pináculos (Providencia, julio de 2010).



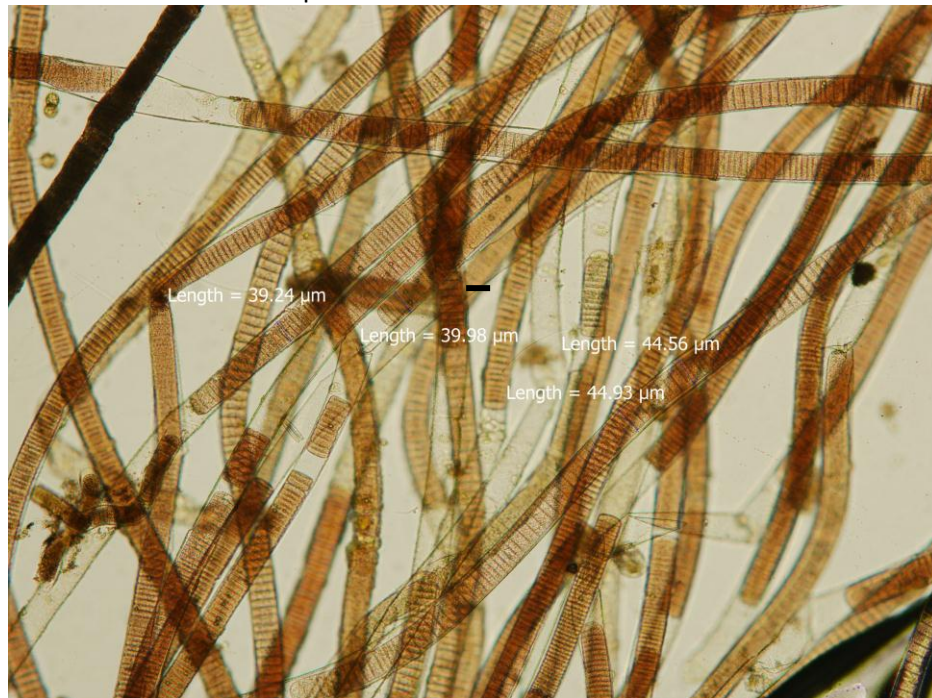
## 2.4.2. Descripción microscópica de las principales especies de cianobacterias encontradas afloramientos

En total se identificaron plenamente 11 especies de cianobacterias marinas que se describen a continuación. Se incluyen también microfotografías que muestran los caracteres taxonómicos más importantes para su identificación. Cinco de las 11 especies identificadas se reportan desde los estudios realizados en este trabajo, por primera vez para el país: *Oscillatorira margaritifera*, *Oscillatoria nigroviridis*, *Phormidium gracile*, *Oscillatoria acuminata* y *Blennothrix glutinosa*.

### 2.4.2.1. *Lyngbya majuscula* Harvey ex Gomont 1892

Esta cianobacteria forma talos ampliamente expandidos de varios tamaños por lo general bastante grandes y extensivos, de apariencia similar a pelos gruesos enredados con coloración variable, generalmente rojiza o morada oscura, en ocasiones marrón. Sus filamentos bastante gruesos y fuertes son visibles a simple vista y hacen que estos tapetes de cianobacterias sean bastante característicos. En este trabajo se encontró a *L. majuscula* formando consorcios con *Lyngbya sordida*, como los tapetes rojizos de filamentos (Figura 2.16).

**Figura 2.16.** Microfotografía de los tapetes rojizos de filamentos gruesos conformados por ensambles de cianobacterias del género *Lyngbya* (*L. majuscula* y *L. sordida*) (Providencia, julio de 2010). Los números blancos corresponden a medidas del ancho de los tricomas.



Las especies del género *Lyngbya* se caracterizan por presentar células discoidales más anchas que largas, formando tricomas sin ramificaciones envueltos en vainas mucilaginosas, con un solo tricoma por cada vaina (Komárek y Anagnostidis, 2005).

*Lyngbya majuscula* se caracteriza por presentar filamentos bastante largos, usualmente ondulados o curvos de 15 a 80  $\mu\text{m}$  de ancho (Figura 2.17). En el presente estudio se encontraron dos morfotipos que se ajustaron muy bien a la descripción de esta especie. Uno de ellos con tricomas 22-26  $\mu\text{m}$  de ancho y el segundo que fue mucho más abundante, de 40-43  $\mu\text{m}$  de ancho (Figura 2.17). Los tricomas se caracterizan por no presentar constricciones en los tabiques intercelulares (Figura 2.17) y carecen de granulaciones. Los tricomas son isopolares, cilíndricos, sin atenuaciones. Estos presentan una vaina mucilaginosa generalmente transparente de hasta 15  $\mu\text{m}$  de espesor. Las células son claramente más anchas que largas, según Komárek y Anagnostidis la longitud característica se encuentra entre 2 y 8  $\mu\text{m}$ . En este trabajo se encontraron células de hasta 14  $\mu\text{m}$  de longitud. Las células apicales son redondeadas y sin caliptra .

Esta especie comparte características morfológicas con la especie recientemente descrita *Moorea producens* (Engene *et al.*, 2012). A pesar de esto, estas dos especies se pueden diferenciar morfológicamente ya que los tricomas de *L. majuscula* no presenta constricciones intertabiculares mientras que *Moorea producta* si las presenta (Komárek y Anagnostidis, 2005; Engene *et al.*, 2012).

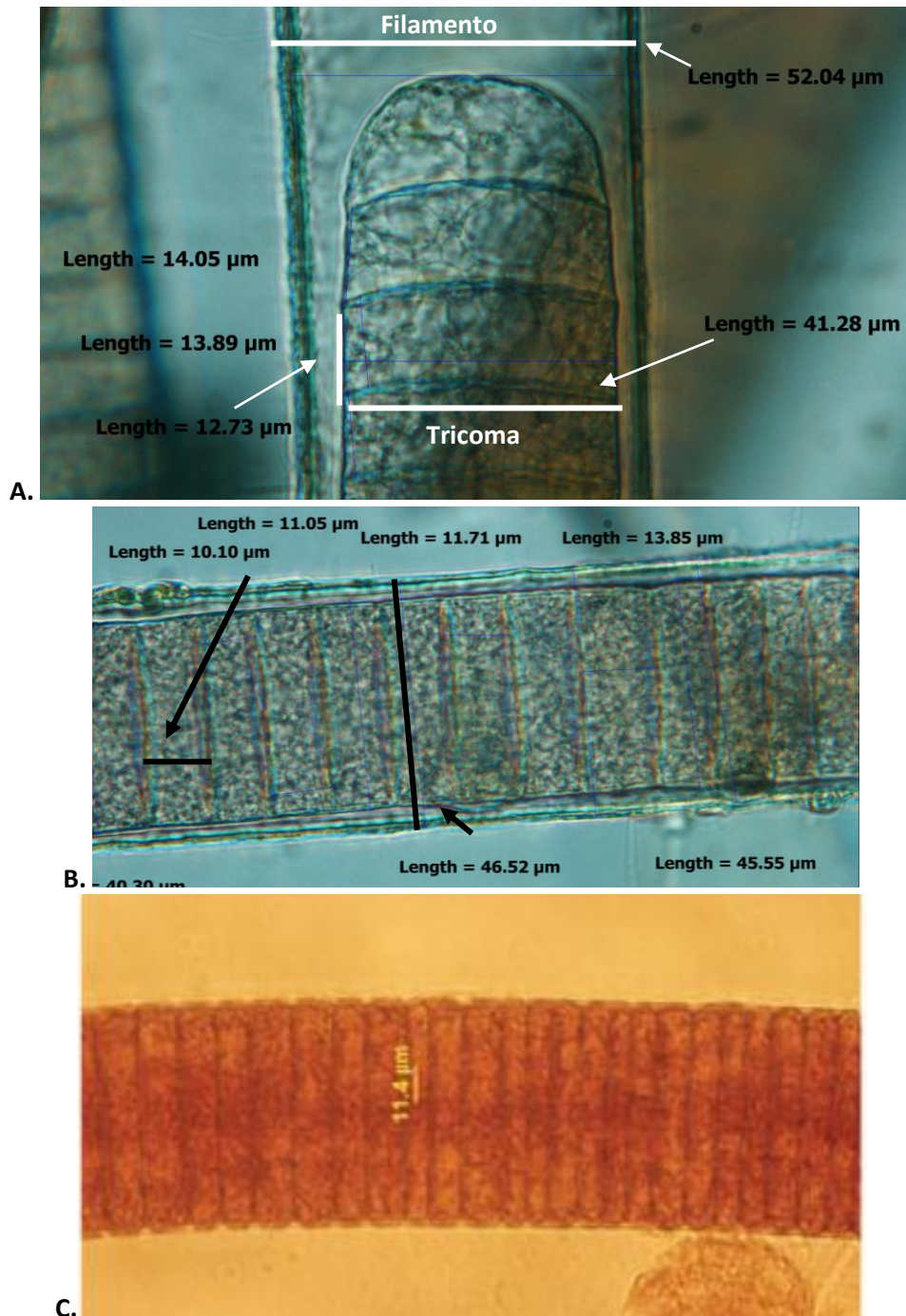
*L. majuscula* se encuentra ampliamente distribuida alrededor del mundo (resumido en Guiry y Guiry, 2012) y se ha reportado en Gran Bretaña (Lipkin y Silva, 2002), Rumania (Caraus, 2012), España (Bárbara *et al.*, 2005, Cires-Rodríguez y Cuesta-Moliner, 2010), Islas Canarias (Anon., 2011), Djibouti, Kenya, Madagascar, Mauritius, Mozambique y Tanzania (Silva *et al.*, 1996; Charpy *et al.*, 2012), Islas Aldabra, Comoros y Mayotte, Islas Laccadivas , Archipiélago de Chagos, Maldivas, Réunion, Seychelles (Silva *et al.*, 1996), Australia (Bostock y Holland 2010; Osborne *et al.*, 2001; Huisman *et al.*, 2009), Micronesia (Tsuda, 2006), Guam (Nagle *et al.*, 1996; Charpy *et al.*, 2012), Samoa (Coles *et al.*, 2003), Filipinas (Silva *et al.*, 1987) y las Islas Marianas (Tsuda, 2003).

Para la región asiática y del Medio Oriente existen reportes en India (Ghosh y Keshri, 2011), Iran, Kuwait y Sri Lanka (Silva *et al.*, 1996), Japón (Titlyanov *et al.*, 2006), Indonesia y Malasia (Silva *et al.*, 1996).

En las Américas *Lyngbya majuscula* se ha reportado en la Florida (EEUU) (Littler *et al.*, 2008), la región Caribe (Littler y Littler, 2000), Venezuela (Ganesan, 1990), Panamá (Littler y Littler, 2010), Puerto Rico (Stielow y Ballantine; 2003), Brasil (Werner, 2010) y México (Carney, 2005).

La especie fue reportada para el Caribe colombiano por Díaz-Pulido y Díaz-Ruiz (2003). En el presente estudio hallamos *L. majuscula* en los Pináculos (octubre de 2009), Pináculos y Felipe's Place (julio de 2010) en la Isla de Providencia. En las Islas del Rosario, reportamos la presencia de esta especie en las localidades Botellas, Pavitos e Isla Grande (septiembre de 2010 y septiembre de 2011).

**Figura 2.17.** **A.** Detalles del extremo de un filamento (tricoma más la envoltura mucilaginosa) de *Lyngbya majuscula*. Se aprecia claramente la forma redondeada sin caliptra de la célula apical del tricoma (conjunto de células en fila sin tener en cuenta la envoltura mucilaginosa). Las medidas presentes corresponden al ancho y longitud de las células, indicadas con flechas. **B.** Detalles de una sección media de un filamento de *L. majuscula* indicando las medidas del ancho y longitud de las células. Es claro que el tricoma no presenta constricciones intertabiculares. **C.** Microfotografía de *Morea producens* se aprecian las constricciones intertabiculares que la diferencia de *L. majuscula* (Imagen tomada de Engene *et al.*, 2012).

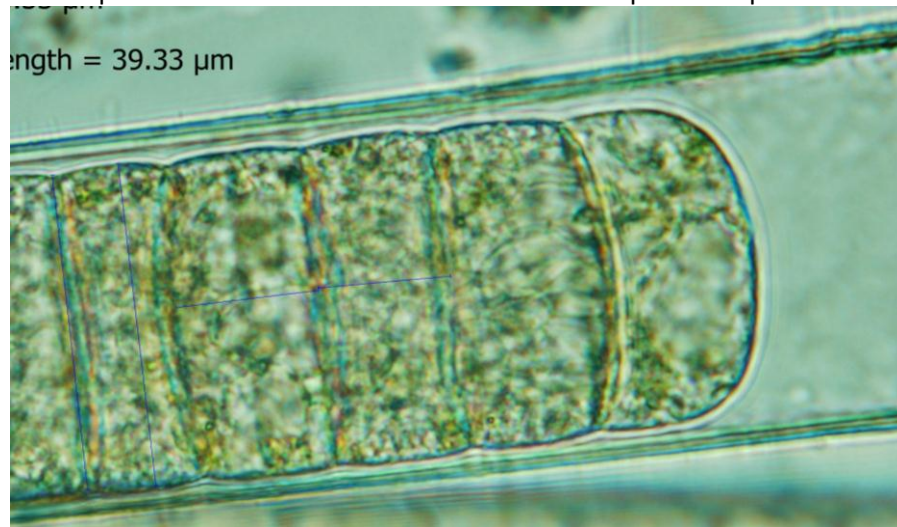


#### 2.4.2.2. *Lyngbya sordida* Gomont 1892

Esta especie forma tapetes con filamentos enredados entre sí de coloraciones variables, generalmente rojizas. En este estudio se encontró formando tapetes rojizos de filamentos gruesos asociada a la especie *Lyngbya majuscula*.

*Lyngbya sordida* se caracteriza por tener filamentos largos y fuertes más o menos rectos con vainas mucilaginosas transparentes, lisas y delgadas. Los tricomas son cilíndricos, isopolares, y a diferencia de *L. majuscula*, tienen claras constricciones intertabiculares (Figura 2.18 y 2.19). Sus células son más anchas que largas, miden de 13 a 65  $\mu\text{m}$  de ancho y de 4 a 10  $\mu\text{m}$  de longitud, las células apicales son redondeadas y no presentan caliptra (Komárek y Anagnostidis, 2005). En este estudio se encontraron algunos filamentos con las características de la especie pero con células de hasta 70  $\mu\text{m}$  de ancho y 17  $\mu\text{m}$  de longitud, algunos filamentos llegaron a medir hasta 90  $\mu\text{m}$  de ancho. Las medidas más frecuentes de las células encontradas en este estudio, correspondieron a un ancho celular de 40-45  $\mu\text{m}$  y longitud de 4-15  $\mu\text{m}$ . (Figura 2.19).

**Figura 2.18.** Porción apical de un filamento de *Lyngbya sordida*. Se aprecia claramente la vaina mucilaginosa transparente envolviendo el tricoma como una especie de “pitillo”.



*L. sordida* se caracteriza por presentar claras constricciones intertabiculares (Figura 2.19) lo cual la diferencia de *Lyngbya majuscula*. Sin embargo, recientemente se describió una nueva especie denominada *Moorea producens* (Engene *et al.*, 2012), ésta presenta características morfológicas muy similares a *L. sordida* como por ejemplo las medidas de las células y las constricciones intertabiculares. A pesar de esto, las dos son especies que se pueden diferenciar morfológicamente ya que los tricomas de *L. sordida* no son atenuados en los extremos y los de los tricomas de *Moorea producta* sí lo son (Komárek y Anagnostidis, 2005; Engene *et al.*, 2012).

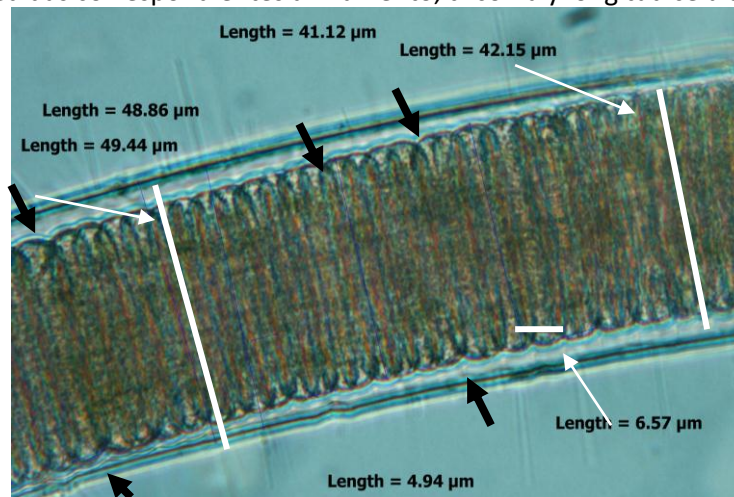
*L. sordida* tiene una distribución cosmopolita (resumido en Guiry y Guiry, 2012) y se ha reportado en España (Cires-Rodríguez y Cuesta-Moliner, 2010), Islas Canarias (Anon, 2011), Madagascar e islas Mauricio (Silva *et al.*, 1996). En la región de Australia, Océano Índico y Océano Pacífico existen reportes de las Islas Aldabra, (Silva *et al.*, 1996), Samoa (Littler y Littler, 2003), Filipinas



(Silva *et al.*, 1987), Micronesia (Tsuda, 2006), India, Sri Lanka (Silva *et al.*, 1996), y Japón (Titlyanov *et al.*, 2006). En la región Caribe fue reportada por Littler y Littler (2000).

*Lyngbya sordida* fue reportada en el Archipiélago de San Andrés y Providencia, Caribe colombiano por la profesora Brigitte Gavio en 2011 (tomado de <http://www.agenciadenoticias.unal.edu.co/detalle/article/censo-de-algas-marinas-arroja-85-nuevos-registros-en-san-andres.html>). En el presente estudio hallamos *Lyngbya sordida* en los Pináculos (octubre de 2009), Pináculos y Felipe's Place (julio de 2010) en la Isla de Providencia. En las Islas del Rosario, reportamos la presencia de esta especie en las localidades Botellas, Pavitos e Isla Grande (septiembre de 2010 y septiembre de 2011).

**Figura 2.19.** Fracción intermedia de un filamento de *L. sordida*. Se aprecian claramente las constricciones intertabulares (señaladas con flechas negras gruesas). Las flechas blancas indican algunas de las medidas correspondientes al filamento, tricoma y longitud celular.



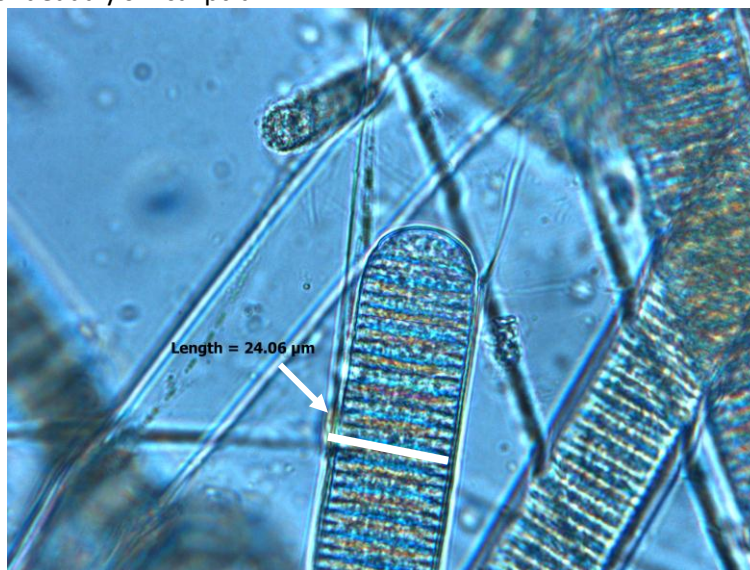
#### 2.4.2.3. *Lyngbya confervoides* C. Agardh ex Gomont 1892

Los tapetes de *Lyngbya confervoides* pueden variar macroscópicamente, siendo cespitosos o fasciculados, con grandes variaciones en la coloración. En este trabajo se encontraron tapetes que crecían como películas de color rojo intenso, rojo oscuro y marrón, formando parte de complejos ensambles con otras *Lyngbya* spp. así como con otras de los géneros *Oscillatoria* y *Phormidium*.

Los filamentos tienen una vaina mucilaginosa transparente, pueden medir de 12-30 µm de ancho. Los tricomas son cilíndricos sin constricciones intertabulares con células de 8 a 25 µm de ancho y de 2-4 µm de longitud. Las células apicales son redondeadas sin caliptra (Komárek y Anagnostidis, 2005). En las muestras analizadas en este trabajo se encontraron filamentos de 23-25 µm de ancho con células de 2-5 µm de longitud (Figura 2.20).

En el presente trabajo se encontraron numerosos filamentos con todas las características descritas previamente pero que presentaban caliptra. Por esta razón, dichos morfotipos fueron identificados como *Lyngbya* sp.

**Figura 2.20.** Extremo de uno de los filamentos de *Lyngbya confervoides*. Se aprecia claramente la célula apical redondeada y sin caliptra.



*Lyngbya confervoides* se encontró creciendo sobre arena, cascajo de coral, macroalgas, octocorales y ocasionalmente sobre corales hermatípicos.

Esta especie tiene una distribución cosmopolita (resumido en Guiry y Guiry, 2012), y se ha reportado en España (Cires-Rodríguez y Cuesta-Moliner, 2010), Islas Canarias (Haroun *et al.*, 2003; Anon., 2011), Rumania (Caraus, 2012), Turquía (Aysel *et al.*, 2006) y Portugal (Araújo *et al.*, 2009). Para África hay reportes provenientes de Djibouti, Mozambique, Sudáfrica, Tanzania, Madagascar, Islas Mauricio (Silva *et al.*, 1996) y Eritrea (Lipkin y Silva, 2002). En la región de Australia, Océano Índico y Océano Pacífico existen reportes de Australia (Huisman, 2004; Bostock y Holland, 2010), Samoa (Coles *et al.*, 2003), Filipinas (Silva *et al.*, 1987) Micronesia (Tsuda, 2006), Islas Marianas (Tsuda, 2003), Islas Aldabra, Archipiélago de Chagos, Islas Laccadivas y Seychelles (Silva *et al.*, 1996). *Lyngbya confervoides* también se ha reportado en Bangladesh, India, Kuwait y Arabia Saudita (Silva *et al.*, 1996).

En las Américas *Lyngbya confervoides* se ha reportado en Brasil (Crispino y Sant'Anna, 2006), la región Caribe (Littler y Littler, 2000) y Florida (EEUU) (Littler *et al.*, 2008).

La especie fue reportada para el Caribe colombiano por Díaz-Pulido y Díaz-Ruiz (2003). En el presente estudio hallamos *L. confervoides* en Lawrence Reef (octubre de 2009), Planchón y Felipe's Place (julio de 2010) en la Isla de Providencia. En la Isla de San Andrés, reportamos la presencia de esta especie en la localidad del Faro (octubre de 2009 y julio de 2010).

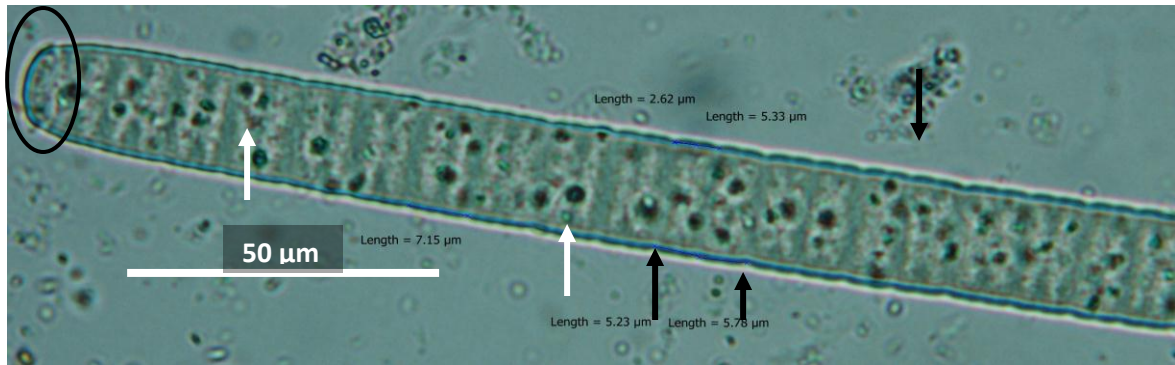
#### **2.4.2.4. *Oscillatoria margaritifera* Kützing ex Gomont 1892**

Los tapetes de *Oscillatoria margaritifera* se caracterizan por ser extensos, delgados y mucilaginosos con distintas coloraciones rojas, cafés, verdes y casi negras (Komárek y

Anagnostidis, 2005). *O. margaritifera* se encontró frecuentemente conformando biopelículas de color rojo, rojo oscuro o café.

Los tricomas no presentan vaina mucilaginosa, tienen células de 14-30  $\mu\text{m}$  de ancho y de 3-6  $\mu\text{m}$  de longitud. Pueden ser más o menos ondulados o rectos, un poco arqueados y atenuados hacia los extremos, presentan notables constricciones intertabiculares y generalmente tienen granulaciones. Las células apicales en ocasiones tienen una caliptra no muy notoria (Komárek y Anagnostidis, 2005). En el presente trabajo se encontraron tricomas con células de 13 a 14  $\mu\text{m}$  de ancho y de 5-8  $\mu\text{m}$  de longitud y otros tricomas de 19-22  $\mu\text{m}$  de ancho y células de 2-5  $\mu\text{m}$  de longitud (Figura 2.21).

**Figura 2.21.** Tricoma de *Oscillatoria margaritifera* con atenuaciones en su extremo. Se aprecian las constricciones intertabiculares indicadas con flechas negras y varias granulaciones oscuras indicadas con flechas blancas, se aprecia también una tenue caliptra en la célula apical del tricoma encerrado en un óvalo.



*Oscillatoria margaritifera* tiene una distribución cosmopolita (resumido en Guiry y Guiry, 2012) y se ha reportado en España (Alvarez-Cobelas y Gallardo, 1988; Bárbara *et al.*, 2005), Islas Canarias (Haroun *et al.*, 2003; Anon., 2011), Portugal y Francia (En: <http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Oscillatoria+margaritifera>). Para la región de Australia, Islas del Océano Índico y del Océano Pacífico hay reportes de Australia (Bostock y Holland, 2010), Filipinas (Silva *et al.*, 1987), Micronesia, Islas Marianas y Seychelles (Silva *et al.*, 1996). También se ha reportado en Bangladesh, India y Sri Lanka (Silva *et al.*, 1996).

Para la región de las Américas, *O. margaritifera* se ha reportado en Venezuela (Ganesan 1990), Panamá (Littler y Littler, 2010), Costa Rica y Florida (EEUU) (En: <http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Oscillatoria+margaritifera>).

Este se constituye en el primer reporte de *Oscillatoria margaritifera* para el Caribe colombiano. En el presente estudio hallamos *Oscillatoria margaritifera* en los Pináculos (octubre de 2009), Pináculos y Felipe's Place (octubre de 2009 y julio de 2010) en la Isla de Providencia. En la Isla de San Andrés, reportamos la presencia de esta especie en la localidad del Faro (octubre de 2009 y julio de 2010).

#### 2.4.2.5. *Oscillatoria nigroviridis* Thwaites in Harvey 1846

Los tapetes de *Oscillatoria nigroviridis* presentaron coloraciones variables y distintos tipos de crecimiento. Esta especie estuvo presente en diferentes muestras recolectadas en este trabajo, generalmente en tapetes que crecían como delgadas películas oscuras-negras sobre el sustrato arenoso y rocoso.

Los filamentos de *O. nigroviridis* son isopolares, sin vaina mucilaginosa, con células más anchas que largas y pueden presentar ocasionalmente células necríticas (para la división de tricomas). Los tricomas son rectos o levemente ondulados, con constricciones intertabiculares. Los extremos en ocasiones están levemente atenuados y pueden verse un poco arqueados. Las células apicales de los tricomas son generalmente redondeadas a cónicas sin caliptra. Las células miden de 7 a 13  $\mu\text{m}$  de ancho y de 2 a 6  $\mu\text{m}$  de longitud (Komáček y Anagnostidis, 2005). En este trabajo se encontraron filamentos de *O. nigroviridis* con células de 11,5-13  $\mu\text{m}$  de ancho y 2,5-5  $\mu\text{m}$  de longitud. La especie es similar a *O. margaritifera* y a *O. bonnemaisonii*, sin embargo *O. nigroviridis* presenta tricomas más pequeños y delgados que las otras dos especies (Figura 2.22).

Si bien *Oscillatoria nigroviridis* se distribuye principalmente en mares cálidos (resumido en Guiry y Guiry, 2012), se ha reportado en prácticamente todo el mundo incluyendo España (Cires-Rodríguez y Cuesta-Moliner, 2010), Francia (Anon., 2012) y las Filipinas (Silva *et al.*, 1987).

Para la región de las Américas, *O. nigroviridis* se ha reportado en Brasil (Crispino y Sant'Anna, 2006; Werner, 2010), y los estados de Maine (Van Guelpen *et al.*, 2005) y la Florida (Littler *et al.*, 2008) en los EEUU.

En el presente estudio hallamos *Oscillatoria nigroviridis* en Lawrence Reef, Santa Catalina (octubre de 2009), Planchón y Felipe's Place (julio de 2010) en la Isla de Providencia.

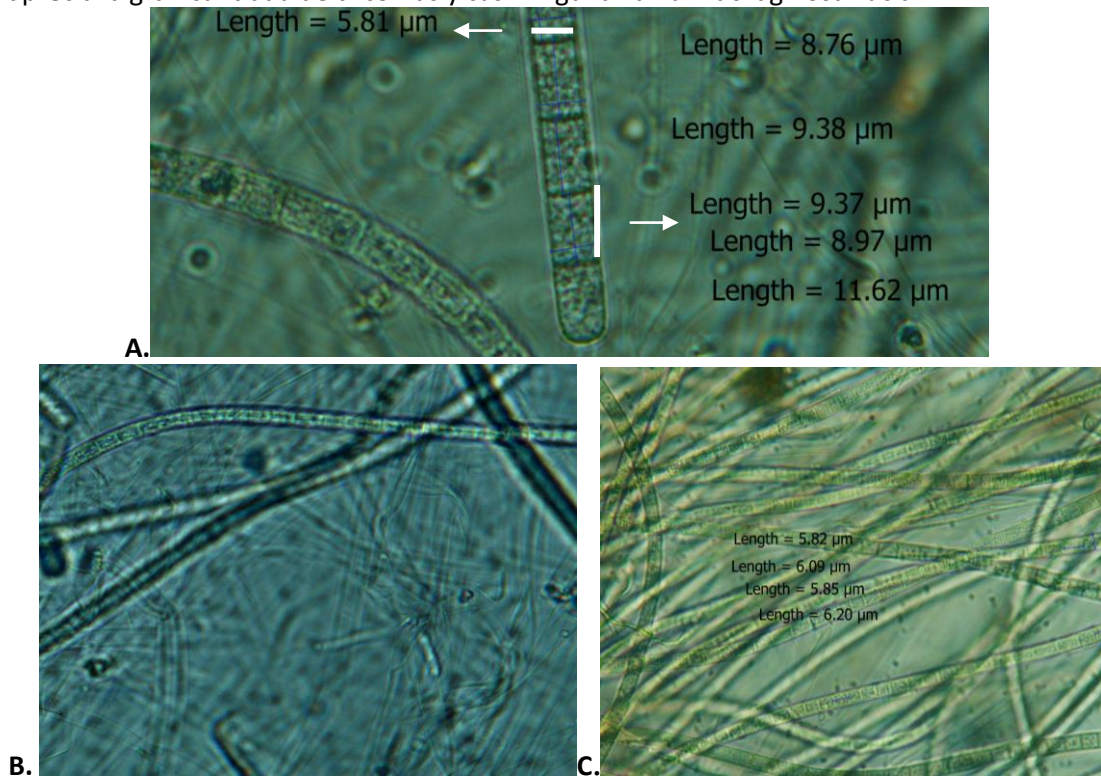
**Figura 2.22.** Tricomas de la especie *O. nigroviridis* se aprecian las medidas del ancho celular y diferentes tipos de células apicales cónicas y redondeadas características de la especie.



### 2.4.2.6. *Symploca hydroides* Kützing ex Gomont 1892

*Symploca hydroides* forma tapetes a manera de fascículos con apariencia algodonosa. La coloración es variable, generalmente rojizas, amarillas, naranja y violeta, en algunos casos con visos verde-azules. Los tapetes pueden ser bastante densos formando “almohadas” de hasta 10 cm de espesor. La forma de los fascículos puede variar dependiendo del sustrato donde se anclen. Tanto los fascículos como los espesos tapetes se caracterizan por ser descoloridos en la base y bien pigmentados en la parte apical debido a la distribución de los tricomas dentro del tapete. Presentan vainas mucilaginosas delgadas e incoloras. Los tricomas son isopolares de color verde-azul de entre 6-8 (hasta 14)  $\mu\text{m}$  de ancho, con células isodiamétricas o hasta dos veces más largas que anchas. Presentan usualmente granulaciones oscuras, en ocasiones muy notorias. Los tricomas se caracterizan por que las células apicales son redondeadas y sin caliptra (Komárek y Anagnostidis, 2005) (Figura 2.23).

**Figura 2.23.** A. Filamentos de *Symploca hydroides* con una vaina mucilaginosa muy delgada y traslúcida, se observa claramente la forma redondeada, sin caliptra, de la célula apical. Las flechas indican las medidas de las células B. Sección basal de los tapetes que aparece despigmentada, con gran cantidad de vainas mucilaginosas vacías. C. Filamentos de la región apical de los fascículos. Se aprecia la gran cantidad de tricomas y casi ninguna vaina mucilaginosa vacía.



Según Komárek y Anagnostidis (2005), *S. hydroides* es una especie marina cosmopolita que crece sobre diversos sustratos duros como rocas, así como sobre diversas especies de macroalgas. Charpy *et al.* (2010) encontraron que esta especie crece preferiblemente sobre sustratos duros y organismos bentónicos, no sobre sustratos blandos o arenosos. En el presente estudio se observó creciendo sobre rocas, coral muerto, e incluso sobre coral vivo, causando con frecuencia necrosis

y pérdida del tejido al coral. También se observó creciendo sobre macroalgas pertenecientes a los géneros *Halimeda*, *Turbinaria* y *Sargassum* las cuales ofrecían una estructura de anclaje ideal para el crecimiento en fascículos de esta especie.

*Symploca hydroides* tiene una distribución cosmopolita (resumido en Guiry y Guiry, 2012) y se ha reportado en España (Bárbara *et al.*, 2005, Cires-Rodríguez y Cuesta-Moliner, 2010), Reino Unido (En: <http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Symploca+hydroides>), y las Islas Canarias (Haroun *et al.*, 2003; Anon., 2011), Kenia, Madagascar, Tanzania e Is. Mauricio (Silva *et al.*, 1996), Australia (Huisman *et al.*, 2009; Bostock y Holland, 2010), Samoa (Coles *et al.*, 2003), Filipinas (Silva *et al.*, 1987) Micronesia (Tsuda, 2006), Maldivas, Seychelles (Silva *et al.*, 1996), Islas Reunión, Comoros y Mayotte (Charpy *et al.*, 2012), Bangladesh, India, Sri Lanka, Pakistán e Indonesia (Silva *et al.*, 1996).

En la región de las Américas, *Symploca hydroides* se ha reportado en Brasil (Werner, 2010), Panamá (Littler y Littler, 2010), Puerto Rico, Bahamas, Bermuda (Littler y Littler, 2000) y México (En: <http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Symploca+hydroides>).

La especie fue reportada para el Caribe colombiano en praderas de pastos marinos por Díaz-Pulido y Díaz-Ruiz (2003). En el presente estudio hallamos *Symploca hydroides* en los Pináculos y Felipe's Place (octubre de 2009 y julio de 2010) en la Isla de Providencia. En la Islas del Rosario, reportamos la presencia de esta especie en las localidades de Botellas, Pavitos e Isla Grande (septiembre de 2010, septiembre 2011 y abril de 2012).

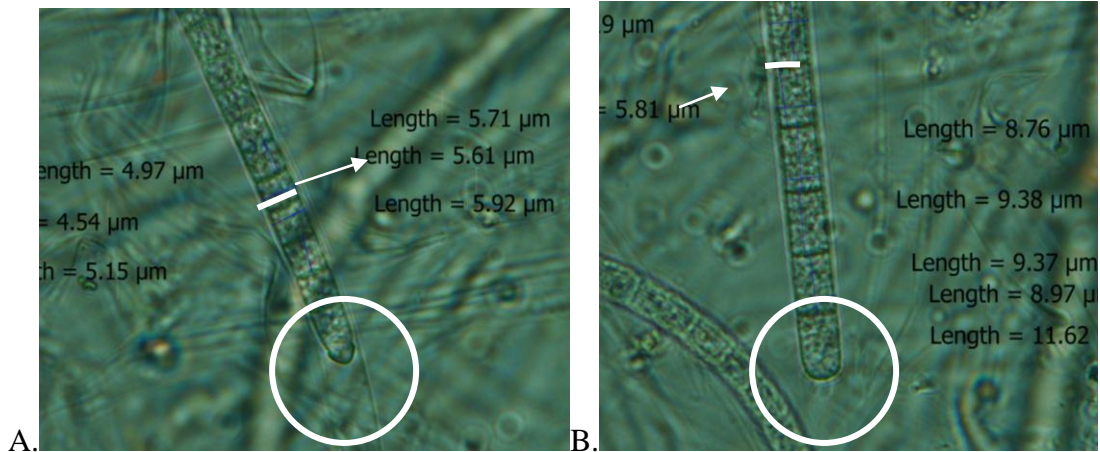
#### **2.4.2.7. *Phormidium submembranaceum* Ardissonne et Straforello 1877 ex Gomont 1892**

*Phormidium submembranaceum* se caracteriza por formar tapetes membranosos de color verde azulado. En este estudio se encontró formando tapetes algodonosos junto a *Symploca hydroides*. Los tricomas pueden tener o no vainas mucilaginosas transparentes y se encuentran generalmente enredados entre sí. Las células son más largas que anchas, en algunos casos con células isodiamétricas, miden cerca de 5  $\mu\text{m}$  de ancho y de 4-10  $\mu\text{m}$  de longitud. Presenta constricciones intertabulares y en ocasiones granulaciones y se diferencia claramente de *S. hydroides* por la presencia de una caliptra cónica en sus células apicales (Komárek y Anagnostidis, 2005) (Figura 2.24).

*Phormidium submembranaceum* tienen una distribución cosmopolita (resumido en Guiry y Guiry, 2012). Se ha reportado en España (Bárbara *et al.*, 2005) y las Islas Canarias (Haroun *et al.*, 2003; Anon, 2011), y Kenya (Silva *et al.*, 1996). Para la región de Australia, Islas del Océano Índico y del Océano Pacífico, existen reportes de las Islas Aldabra, Maldivas y Reunión (Silva *et al.*, 1996), Australia (Bostock y Holland, 2010), Samoa (Littler y Littler, 2003), Filipinas (Silva *et al.*, 1987) y Micronesia (Tsuda, 2006). También hay reportes de esta especie en India (Silva *et al.*, 1996).

Para la región de las Américas se ha reportado en México (Ortega *et al.*, 2001; Carney, 2005), Bermuda y los estados de Miami y California, EEUU (En: <http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Phormidium+submembranaceum>).

**Figura 2.24.** Comparación de los filamentos de *Phormidium submembranaceum* y *Symploca hydroides*. Las flechas indican las medidas del ancho de las células. A. Filamento de *P. submembranaceum* donde se observa claramente la caliptra cónica (encerrada en un círculo) a diferencia de *S. hydroides*. B. Extremo de un filamento de *S. hydroides* con su célula apical redondeada.



La especie fue reportada para el Caribe colombiano por Díaz-Pulido y Díaz-Ruiz (2003). En el presente estudio hallamos *Phormidium submembranaceum* en los Pináculos y Felipe's Place (octubre de 2009 y julio de 2010) en la Isla de Providencia. En la Islas del Rosario, reportamos la presencia de esta especie en las localidades de Pavitos y Botellas, Isla Grande (septiembre de 2010, septiembre 2011 y abril de 2012).

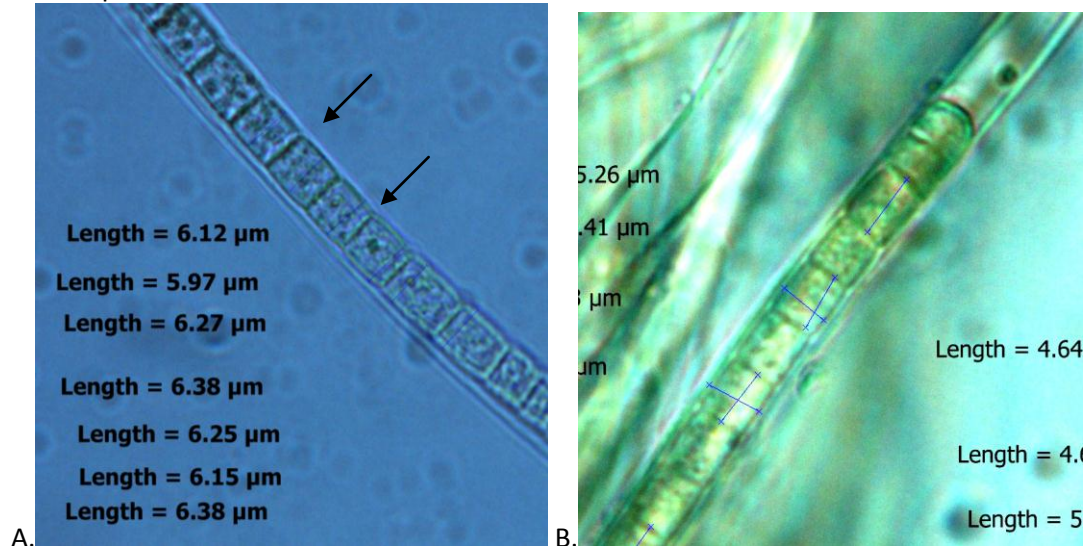
#### 2.4.2.8. *Phormidium gracile* (Meneghini ex Gomont) Anagnostidis 2001

*Phormidium gracile* se caracteriza por presentar tapetes con crecimiento variable cespitoso, fasciculado o mucilaginoso. En este tabajo se encontró en consorcios con otras especies de cianobacterias como *Oscillatoria margaritifera*, *O. nigroviridis* y *Lyngbya confervoides* formando biopelículas generalmente de color rojizo que crecían sobre arena, cascajo, macroalgas y octocorales.

Los filamentos presentan una vaina mucilaginoso translúcida y delgada, miden entre 7-10 μm de ancho. Los tricomas tienen ligeras constricciones intertabiculares, no son atenuados en los extremos y sus células apicales son redondeadas y no presentan caliptra. Las células son más o menos isodiamétricas de 5-8 μm de ancho y 2,5 a 6 μm de longitud (Komárek y Anagnostidis, 2005). En el presente estudio se encontró que la mayoría los tricomas presentaron células más o menos isodiamétricas de 6-9 μm (Figura 2.25).

*Phormidium gracile* tiene una distribución cosmopolita (resumido en Guiry y Guiry, 2012), se ha reportado en Madagascar (Silva *et al.*, 1996), Islas Marianas (Tsuda, 2003), Papua Nueva Guinea (Pereira *et al.*, 2010), Micronesia (Tsuda, 2006), Bangladesh, India, Sri Lanka (Silva *et al.*, 1996). Para la región de las Américas *Phormidium gracile* se ha reportado en Brasil (Werner, 2010).

**Figura 2.25. A y B.** Filamentos de *Phormidium gracile*. Se aprecian las células casi isodiamétricas. Se observan también las ligeras constricciones intertabiculares indicadas con flechas negras. La célula apical en B. es claramente redondeada.



Éste se constituye en el primer reporte de *Phormidium gracile* para el Caribe colombiano. En el presente estudio hallamos *Phormidium gracile* en Felipe's Place y el Planchón (julio de 2010) en la Isla de Providencia. En la Isla de San Andrés, reportamos la presencia de esta especie en la localidad del Faro (octubre de 2009).

#### 2.4.2.9. *Spirulina subsalsa* Oersted ex Gomont 1892

*Spirulina subsalsa* se caracteriza por formar tapetes suaves y mucilaginosos con distintas coloraciones. En el presente estudio se encontró junto a *Oscillatoria auminata* formando los tapetes de filamentos largos rojos que crecían a manera de delgados fascículos largos de hasta 40 cm de longitud.

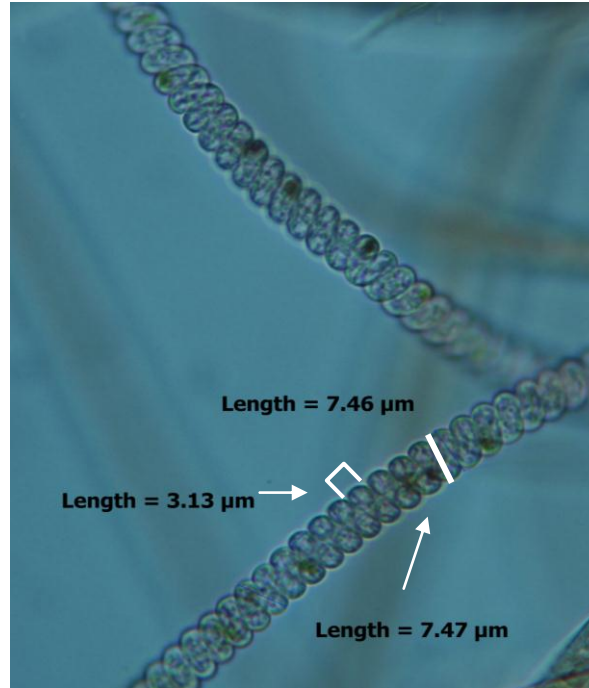
Los tricomas tienen de 0,8 a 2,2  $\mu\text{m}$  de ancho, están densamente enrollados en espiral de manera muy regular, de forma que cada vuelta se toca con la otra. No tiene constricciones en los tabiques intercelulares que son invisibles. Cada espiral o vuelta mide aproximadamente 3-5  $\mu\text{m}$  de ancho y de 2-5,6  $\mu\text{m}$  de alto (Komárek y Anagnostidis, 2005). En este caso se observaron tricomas ligeramente más grandes con un ancho alrededor de los 3  $\mu\text{m}$  y las vueltas midieron cerca de 7,5  $\mu\text{m}$  de ancho y 3-4  $\mu\text{m}$  de alto (Figura 2.26).

*Spirulina subsalsa* tiene distribución cosmopolita (resumido en Guiry y Guiry, 2012). Se ha reportado en Portugal (Araujo *et al.*, 2009, España (Bárbara *et al.*, 2005; Cires-Rodríguez y Cuesta Moliner, 2010), las Islas Canarias (Anon., 2011), Djibouti, Maagascar y Sudáfrica (Silva *et al.*, 1996). Para la región de Australia, Islas del Océano Índico y del Océano Pacífico hay reportes de las islas Maldivas y Aldabra (Silva *et al.*, 1996), Micronesia (Tsuda, 2006) y las Islas Marianas



(Tsuda, 2003). También hay reportes de Bahrain, Kuwait, Arabia Saudita e India (Silva *et al.*, 1996).

**Figura 2.26.** Filamentos de *Spirulina subsalsa*. Se aprecia claramente como cada vuelta del espiral está en contacto directo con la siguiente, las flechas indican las medidas del alto y ancho de las vueltas espirales del tricoma.



Para la región de las Américas, se ha reportado *Spirulina subsalsa* en la Florida (EEUU) (Littler *et al.*, 2008), Chile (Montecino *et al.*, 2001), Brasil (Werner, 2010), México (Carney, 2005), Puerto Rico, Bermuda, Antillas Holandesas y Panamá (En: <http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Spirulina+subsalsa&btxt=Ocean+Biogeographic+Information+System&burl=http://www.iobis.org>).

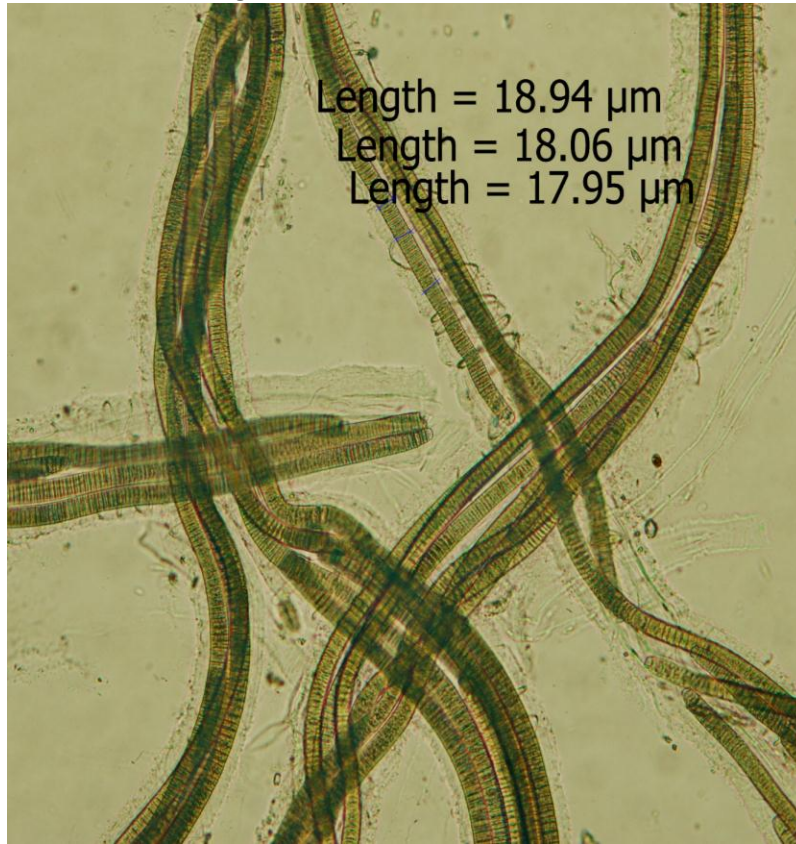
*Spirulina subsalsa* fue reportada para el Caribe colombiano por Díaz-Pulido y Díaz Ruiz (2003). En el presente estudio hallamos *Spirulina subsalsa* en los Pináculos (octubre de 2009 y julio de 2010) en la Isla de Providencia.

#### 2.4.2.10. *Blennothrix glutinosa* (Gomont ex Gomont) Anagnostidis ex Komárek in Anagnostidis 2001

Los tapetes de *Blennothrix glutinosa* crecen de manera irregular sobre el sustrato con coloraciones variables. En este estudio se encontró únicamente en una sola oportunidad formando tapetes negruzcos oscuros en los alrededores de Lawrence Reef, Isla de Santa Catalina. Dichos tapetes estaban compuestos en un 70% por *Blennothrix glutinosa* y por *Lyngbya* sp. el restante 30%.

*B. glutinosa* presenta vainas mucilaginosas gruesas translúcidas que contienen más de un tricoma dentro de cada una de ellas. Frecuentemente dentro de cada vaina mucilaginosa se encuentran numerosos tricomas. Éstos, son cilíndricos rectos u ondulados, sin o con sutiles constricciones intertabulares y en ocasiones con atenuaciones en sus extremos (Figura 2.27).

**Figura 2.27** Filamentos de *Blennothrix glutinosa* donde se observan claramente varios tricomas dentro de una misma vaina mucilaginosa.



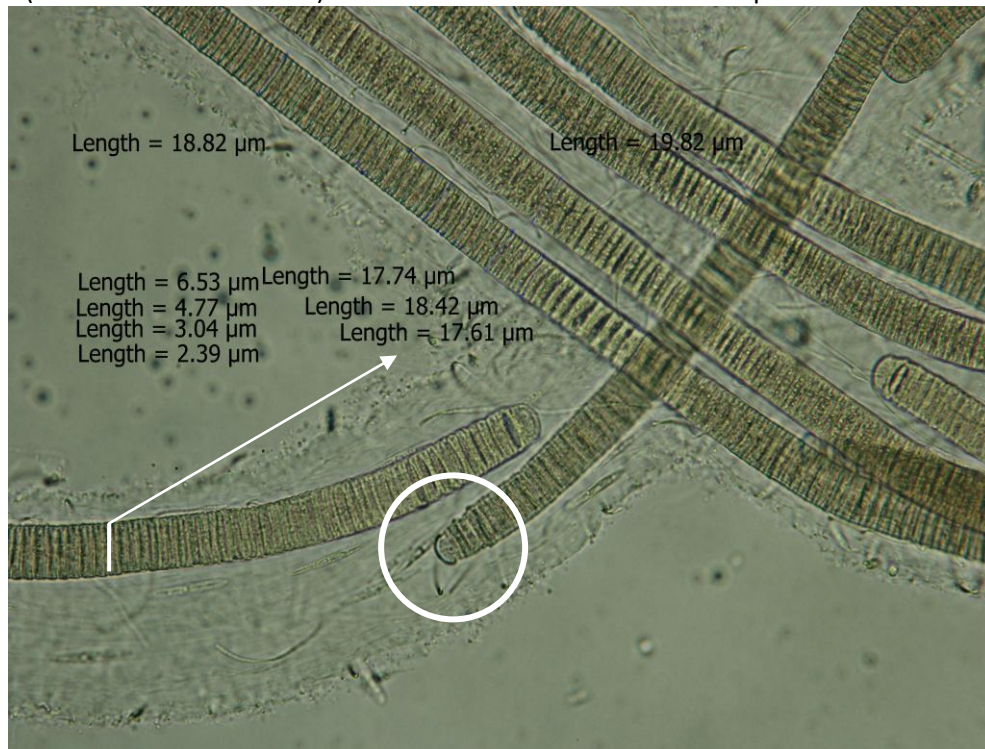
Las células son muy cortas y bastante más anchas que largas, miden de 13 a 21  $\mu\text{m}$  de ancho y de 2,5-5  $\mu\text{m}$  de longitud. Las células apicales son redondeadas o atenuadas-truncadas con una caliptra en forma de botón aplanado (Figura 2.28). En el presente estudio se encontraron tricomas de 17 a 22  $\mu\text{m}$  de ancho y células de 2,5-6,5  $\mu\text{m}$  de longitud

*Blennothrix glutinosa* tiene distribución cosmopolita (resumido en Guiry y Guiry, 2012). Se ha reportado en España (Bárbara *et al.*, 2005; Cires-Rodríguez y Cuesta Moliner, 2010), Islas Canarias (Haroun *et al.*, 2003; Anon., 2011), Madagascar (Charpy *et al.*, 2012) e Islas Mauricio (Silva *et al.*, 1996). Para la región de Australia, Islas del Océano Índico y del Océano Pacífico existen reportes de Australia (Silva *et al.*, 1996; Bostock y Holland, 2010), Micronesia (Tsuda, 2006) e islas Comoros y Mayotte (Charpy *et al.*, 2012). También hay reportes de Bahrain, Kuwait, Arabia Saudita e India (Silva *et al.*, 1996).

Para la región de las Américas solamente se conocen reportes de Brasil (Crispino y Sant'Anna, 2006; Werner, 2010).

Éste se constituye en el primer reporte de *Blennothrix glutinosa* para el Caribe colombiano. En el presente estudio hallamos *Blennothrix glutinosa* en Lawrence Reef, Santa Catalina (octubre de 2009).

**Figura 2.28.** Detalles de los filamentos de *Blennothrix glutinosa*. Se observan claramente las gruesas vainas mucilaginosas con más de un tricoma dentro. También se pueden observar las caliptras (encerrado en un círculo) con forma de botón en las células apicales de los tricomas.



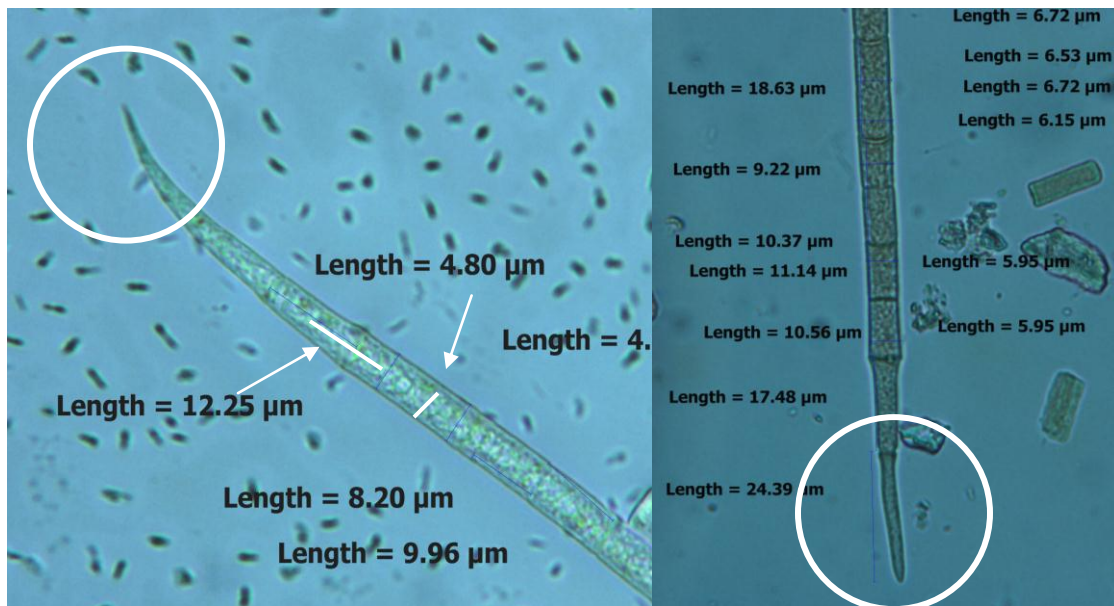
#### 2.4.2.11. *Oscillatoria acuminata* Gomont 1892

*Oscillatoria acuminata* se caracteriza por formar tapetes suaves y mucilaginosos con coloración verde-azul a rojiza. En el presente estudio fue encontrada formando parte importante de los tapetes de filamentos largos rojos encontrados en los Pináculos, Isla de Providencia, formando consorcios microbianos con *Spirulina subsalsa*, siendo *O. acuminata* la especie dominante.

Los tricomas de *O. acuminata* son largos, isopolares y usualmente rectos con algunas curvaturas en los extremos. Carecen o muy ocasionalmente presentan vaina mucilaginosa translúcida y si tienen constricciones intertabiculares, éstas son muy tenues. Las células son generalmente más largas que anchas, usualmente miden hasta 8,2 µm de longitud. En el presente estudio se encontraron células con longitudes superiores (8-11 µm) y en varias ocasiones fue posible observar células que incluso duplicaban la longitud promedio de las demás posiblemente debido a procesos reproductivos de división celular ya que se observaron tabiques nuevos en formación en el medio de estas células. Los tricomas son atenuados hacia los extremos, las células apicales

son cónicas y terminan en puntas delgadas, estas células son menos anchas y más largas que las demás (Figura 2.29).

**Figura 2.29.** Microfotografías de *Oscillatoria acuminata* donde se observan claramente características relevantes para su identificación taxonómica, como la presencia de células más largas que anchas, tricomas atenuados en los extremos y células apicales cónicas terminadas en punta (encerradas en círculos blancos).



En ocasiones los extremos pueden romperse por la manipulación de las muestras, eliminando así los extremos aguzados característicos de esta especie. Esto puede llevar a identificaciones erróneas, por esta razón es importante observar numerosos filamentos y tener un cuidadoso manejo de las muestras.

No son muy comunes los reportes de *Oscillatoria acuminata*, solamente hay registros de Rumania (Caraus, 2012) y en la región de las Américas en Puerto Rico y el estado de California, EEUU (en <http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Oscillatoria+acuminata>) y Panamá (Littler y Littler, 2010).

Éste se constituye en el primer reporte de *Oscillatoria acuminata* para el Caribe colombiano. En el presente estudio hallamos *Oscillatoria acuminata* los Pináculos, isla de Providencia (octubre de 2009).

### 2.4.3. Identificación molecular de cianobacterias presentes en los afloramientos

Del total de 86 secuencias obtenidas, 34 de ellas (40%) fueron asociadas a secuencias de cianobacterias incluyendo especies sin cultivar y sin identificar, y 16 secuencias (19%) fueron asociadas a secuencias de especies de cianobacterias marinas conocidas.

Las 16 secuencias que se asociaron con especies de cianobacterias marinas conocidas y reportadas en las bases de datos, correspondieron a secuencias de las especies *Symploca* sp., *S. hydroides*, *L. polychroa*, *L. sordida*, *Lyngbya* sp. e *Hydrocoleum lyngbyaceum*. Las asociaciones de especies a las secuencias que se realizaron por BLAST, concuerdan con los resultados de la identificación morfológica en la mayoría de los casos (Tabla 2.2). Por ejemplo. Se encuentra una buena correlación en las muestras de tapetes algodonosos, donde las secuencias obtenidas fueron asociadas con *Symploca hydroides*. De igual manera, en muestras donde se había identificado especies de *Lyngbya*, se encontraron secuencias asociadas a especies del mismo género.

Sin embargo, el 60% de las secuencias obtenidas fueron asociadas a secuencias de bacterias pertenecientes a grupos diferentes a las cianobacterias, correspondientes a bacterias ambientales marinas muchas de ellas sin cultivar e identificar. Algunas de ellas pertenecieron al grupo Verrucomicrobia. Dos de las secuencias obtenidas fueron asociadas a las secuencias de cloroplastos de algas marinas como *Gelidium* sp. y *Grateulopia* sp. Cinco de las secuencias obtenidas correspondieron a cianobacterias del género *Acaryochloris* que son cianobacterias productoras de clorofila d, pequeñas que generalmente viven asociadas a tapetes de cianobacterias y otros fotótrofos marinos (Swingley *et al.*, 2010).

A pesar que una gran cantidad de secuencias fueron asociadas por BLAST a secuencias de cianobacterias sin cultivar o sin identificar, los resultados obtenidos, lograron confirmar la identidad asignada a especies como *Symploca hydroides* y *Lyngbya* spp (Tabla 2.2).

De otro lado, la reconstrucción filogenética mostró una clara asociación de las secuencias de cianobacterias presentes en las muestras con las secuencias de cianobacterias de referencia obtenidas de GeneBank (Porción 2 del árbol, Figura 2.33).

La secuencia de referencia perteneciente a *Phormidium subuliforme* fue ubicada por fuera del clado de las cianobacterias, asociada a las secuencias de los *outgroups* de *Pseudomonas* sp. y *Aliivibrio fischeri*. La reconstrucción filogenética se muestra en las Figuras 2.30 – 2.33. Tres de las secuencias de las muestras analizadas, asociadas con el género *Symploca*, por BLAST, fueron ubicadas en otro clado junto a otras secuencias de bacterias marinas pertenecientes a Verrucomicrobia y a secuencias de cianobacterias marinas sin cultivar, en este caso, y debido a las distancias filogenéticas de éste tercer gran clado (porción 3 del árbol, Figura 2.33), es posible que dicho clado corresponda a bacterias marinas de grupos diferentes a las cianobacterias, que en algunos casos se les pudo haber asignado identidades erróneas correspondientes a cianobacterias.

**Tabla 2.2.** Identidades obtenidas a través de BLAST de las secuencias del 16S rDNA de las muestras de cianobacterias. Se muestra un resumen de las identidades, teniendo en cuenta que en ocasiones se obtuvo más de un clon con la misma secuencia, de esta manera, se muestran sólo las identidades que resultaron ser diferentes entre sí para cada muestra. La columna de similaridad, muestra el valor arrojado por BLAST de la similitud entre las secuencias analizadas y las de referencia.

Muestra #	Identificación morfológica *	Asociación BLAST	% similaridad
1	<i>Lyngbya</i> spp. y <i>Oscillatoria margaritifera</i>	<i>Haloferula rosea</i>	94
		Uncultured Verrucomicrobia	91
		Uncultured cyanobacterium	99
		Uncultured <i>Synechococcus</i> sp.	98
2	<i>Lyngbya majuscula</i> y <i>Lyngbya sordida</i>	Uncultured <i>Chroococciopsis</i> sp.	99
		Uncultured bacterium	99
		<i>Lyngbya sordida</i>	99
3	<i>Lyngbya majuscula</i> y <i>Lyngbya sordida</i>	Uncultured cyanobacterium	93
		<i>Acaryochloris marina</i>	99
		Uncultured cyanobacterium	95
		Uncultured marine bacterium	93
		<i>Rubritalea marina</i>	94
4	<i>Symploca hydroides</i> y <i>Phormidium submembranaceum</i>	<i>Acaryochloris</i> sp.	97
		<i>Symploca</i> sp. VP642b	99
		Verrucomicrobia bacterium	91
		Uncultured cyanobacterium	96
5	<i>Oscillatoria nigroviridis</i>	<i>Acaryochloris</i> sp.	94
		Uncultured bacterium	97
		Uncultured marine bacterium	99
		Uncultured cyanobacterium	99
		<i>Lyngbya</i> sp.	96
7	<i>Oscillatoria acuminata</i> y <i>Spirulina subsalsa</i> .	Uncultured Verrucomicrobia	99
		<i>Roseibacillus persicus</i>	95
		Uncultured bacterium	99
8	<i>Lyngbya majuscula</i> y <i>Lyngbya sordida</i>	<i>Lyngbya polychroa</i>	99
		Uncultured bacterium	97
		Uncultured marine bacterium	93
9	<i>Lyngbya</i> spp. y <i>Oscillatoria margaritifera</i>	Uncultured cyanobacterium	99
		Uncultured Verrucomicrobia	98
10	Consortio de <i>Lyngbya</i> spp. ( <i>Lyngbya</i> sp., <i>L. cf confervoides</i> y <i>L. cf majuscula</i> )	Uncultured Verrucomicrobia	97
		Uncultured bacterium	99
		Uncultured <i>Synechococcus</i> sp.	91
11	Consortio de <i>Lyngbya</i> spp. y <i>Oscillatoria</i> spp. ( <i>L. cf semiplena</i> , <i>L. cf majuscula</i> ) ( <i>O. nigroviridis</i> , <i>O. margaritifera</i> )	<i>Hydrocoleum lyngbyaceum</i>	98
		<i>Lyngbya</i> sp. BAN TS30	98
		Uncultured bacterium	99
13	<i>Symploca hydroides</i> y <i>Phormidium submembranaceum</i>	<i>Symploca</i> sp. VP642b	99
		<i>Symploca hydroides</i>	99
		Uncultured bacterium	98
14	<i>Oscillatoria</i> spp. y <i>Phormidium gracile</i> y <i>Lyngbya</i> sp.	<i>Gratelopia lanceola</i>	95
		Uncultured bacterium	99
15	<i>Lyngbya</i> spp. y <i>Oscillatoria margaritifera</i>	Uncultured Verrucomicrobia bacterium	96
		Uncultured cyanobacterium	99

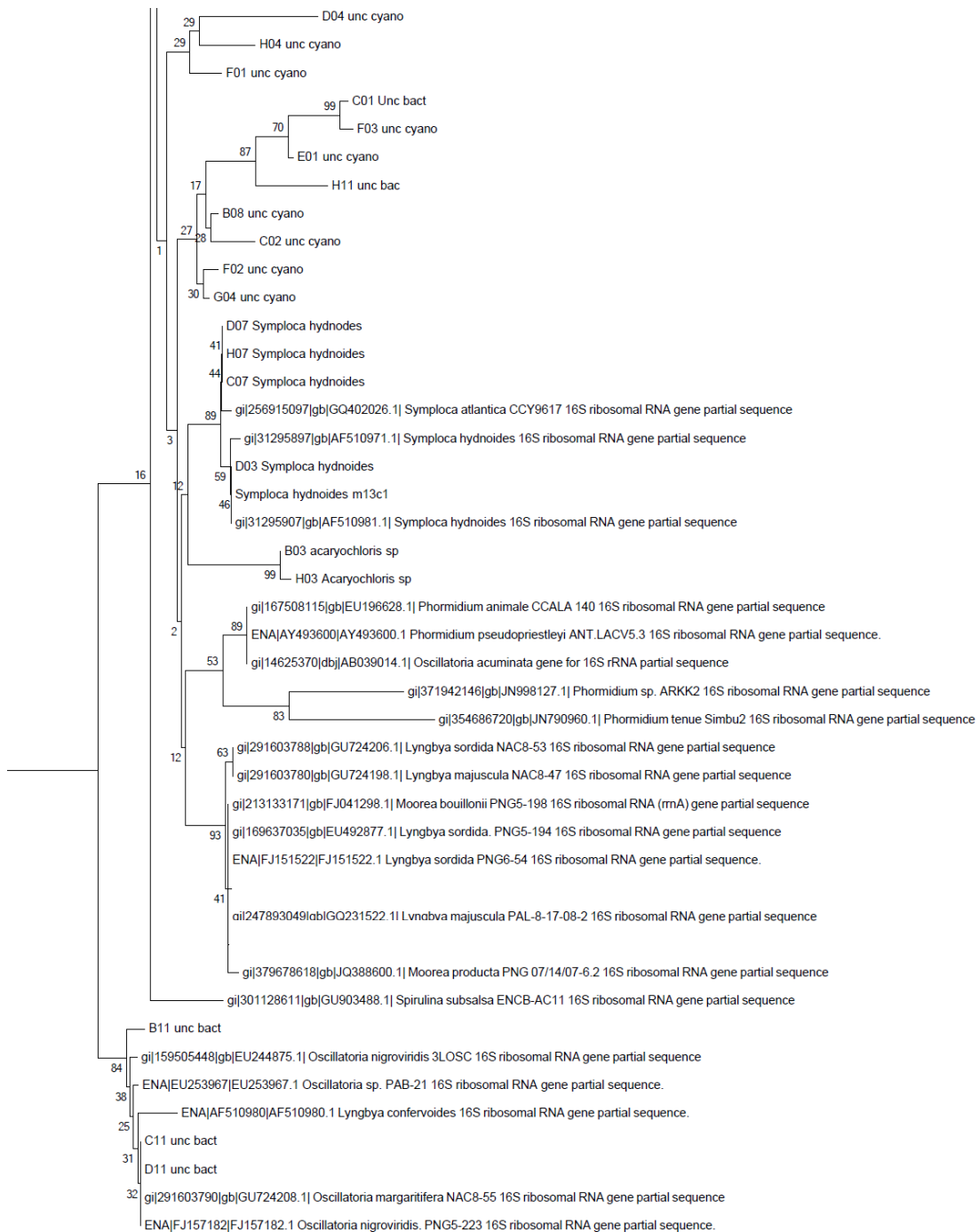
**Figura 2.30.** Filogenia a partir del método de *Neighbor-joining* con 1000 *Bootstrap* y el modelo de *Maximum Composite Likelihood* usando el *software* *Mega 5.10 Beta 2*. Las áreas resaltadas en óvalos junto a los números corresponden a regiones del árbol que fueron ampliadas para facilitar su visualización en las figuras 2.32 a 2.34.



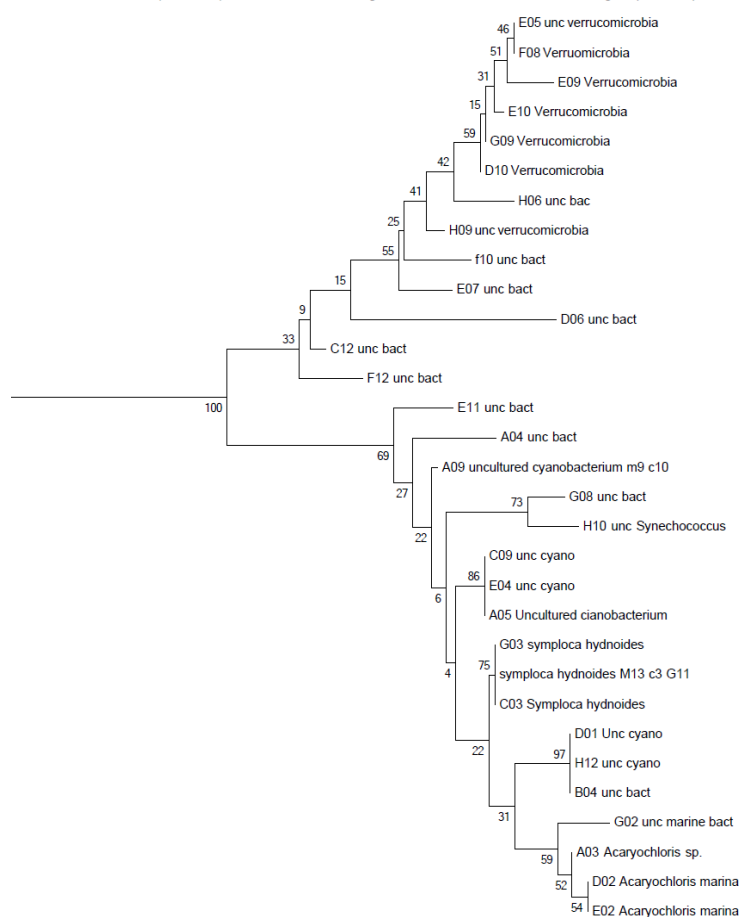




**Figura 2.32.** Región media del árbol filogenético correspondiente a la porción número 2 encerrada en un óvalo verde en la figura 2.30. Las secuencias obtenidas en el presente trabajo se identificaron con una letra (A-H) seguida de un número (1-12), luego se puso el nombre correspondiente a la identidad más probable obtenida mediante BLAST. Este cluster agrupó las secuencias que fueron asociadas por BLAST a secuencias de cianobacterias marinas. De igual manera, dentro de este cluster se encontraron las secuencias de referencia correspondientes a cianobacterias marinas obtenidas de GeneBank.



**Figura 2.33.** Región inferior del árbol correspondiente a a porción número 3 encerrada en un óvalo azul en la figura 2.30. Las secuencias obtenidas en el presente trabajo se identifican con una letra (A-H) seguida de un número (1-12), luego se puso el nombre correspondiente a la identidad más probable obtenida mediante BLAST. Este cluster agrupó en su mayoría secuencias de bacterias que no pertenecen al grupo de las cianobacterias. Dentro de este cluster se encontraron secuencias que fueron asociadas por BLAST a secuencias de cianobacterias como *Symploca* sp. y *Acaryochloris* sp., debido a su ubicación filogenética en el árbol es posible que en realidad esas secuencias correspondan a bacterias que no pertenecen al grupo de las cianobacterias.



## 2.5. Discusión

Para la amplificación del fragmento de interés se utilizaron *primers* diseñados por Nübel *et al.* (1997), los cuales habían sido utilizados en varios estudios orientados hacia la identificación molecular de cianobacterias marinas a partir del fragmento 16S rDNA (Thacker y Paul, 2004; Sharp *et al.*, 2009; Engene *et al.*, 2011; Engene *et al.*, 2012). Sin embargo estos *primers* resultaron no ser tan específicos para cianobacterias y amplificaron también secuencias pertenecientes a bacterias de otros grupos. De las secuencias obtenidas en el presente trabajo, el 40% se asociaron

a secuencias de cianobacterias marinas, el resto se asociaron a bacterias pertenecientes a otros grupos filogenéticos de bacterias. Engene *et al.* (2011) también encontraron que 42 de las 95 secuencias (44% del total) obtenidas a partir de muestras ambientales de tapetes de *Lyngbya* spp., fueron asociadas a secuencias de bacterias asociadas a *Lyngbya* que no pertenecían al grupo de las cianobacterias. Estos resultados son bastante similares a los obtenidos en el presente trabajo, corroborando de nuevo que los *primers* diseñados por Nübel *et al.* (1997) no son del todo específicos para cianobacterias.

En las muestras 4 y 13 provenientes de tapetes algodonosos recolectados en la Isla de Providencia, en las cuales se había identificado morfológicamente a *Symploca hydroides*, se obtuvieron secuencias que fueron asociadas con dicha especie al realizar los análisis de BLAST. En tales muestras no se encontró ninguna relación de las secuencias obtenidas con otras especies de cianobacterias. De la misma manera, las muestras 2 y 8 correspondientes a tapetes de cianobacterias de filamentos rojizos gruesos recolectados en las islas del Rosario y Providencia, compuestos principalmente por *Lyngbya majuscula* y *L. sordida*, presentaron secuencias que fueron asociadas a dichas especies en los análisis de BLAST. En estos casos, la identificación morfológica fue respaldada por los resultados de los análisis moleculares. Estos resultados concuerdan con lo planteado por Engene (2010) que muestra que en varios casos se puede encontrar una buena correlación entre las identificaciones morfológicas y moleculares de las especies de cianobacterias.

La taxonomía de cianobacterias marinas ha sido reevaluada recientemente en particular para *Lyngbya majuscula*, la cual reviste un enorme interés por su gran diversidad química y actividad biológica (Engene *et al.*, 2010; Engene *et al.*, 2011). La aparente diversidad química de *L. majuscula*, ha podido explicarse por análisis moleculares que revelaron que lo que durante mucho tiempo se identificó como *Lyngbya majuscula*, basándose únicamente en caracteres morfométricos, corresponder en muchos casos a especies del género *Moorea* propuesto por Engene *et al.* (2012). Con base en estudios filogenéticos usando el gen rRNA 16S, se obtuvo una clara separación de dos grandes clados de especies de *Lyngbya* y de *Moorea* entre los cuales se ubicaron otras cianobacterias pertenecientes a los géneros *Symploca*, *Oscillatoria* y *Phormidium* (Engene *et al.*, 2012). Esto explica a su vez las extrañas asociaciones filogenéticas obtenidas en estudios anteriores a la descripción de *Moorea*, donde diversas especies de *Lyngbya* se asociaron en clados diferentes alejados filogenéticamente entre sí (Engene *et al.*, 2010).

Hasta el momento se han descrito dos especies para el género *Moorea*, *Moorea producens* y *M. bouillonii*. *M. producens* puede haber sido confundida en numerosas ocasiones con *Lyngbya majuscula* y con *Lyngbya sordida* por su similaridad morfológica. Para el presente trabajo, las especies identificadas como *L. majuscula* y *L. sordida*, se diferenciaron de *Moorea producens*, a partir de sus características morfológicas, las cuales fueron bien establecidas para *M. producens* por Engene *et al.* (2012) y para *L. majuscula* y *L. sordida* por Komárek y Anagnostidis (2005). *Lyngbya majuscula* se puede reconocer puesto que no presenta constricciones intertabulares, mientras que *Moorea producens* y *L. sordida* sí las presentan. De otra parte, *L. sordida* se puede diferenciar de *M. producens* debido a que no presenta atenuaciones en los extremos de los tricomas y *M. producens* si las presenta (Komárek y Anagnostidis, 2005; Engene *et al.*, 2012).

A pesar de los alcances que brinda la biología molecular para la identificación de microorganismos, es necesario ser muy prudente al momento de realizar afirmaciones en cuanto

a la identidad taxonómica de las especies de interés, ya que las aproximaciones se pueden ver sesgadas por posibles errores en la asignación de las secuencias que se suben a las bases de datos. Por ejemplo en el árbol filogenético mostrado en la Figura 2.30 se observa la secuencia de *Phormidium subuliforme* ubicada muy lejos de los clados donde se encuentran las demás cianobacterias y asociada además a las secuencias seleccionadas como *outgroups* de *Pseudomonas* sp. y *Aliivibrio fischeri*.

A pesar de los alcances que brinda la biología molecular para la identificación de microorganismos, es necesario ser muy prudente al momento de realizar afirmaciones en cuanto a la identidad taxonómica de las especies de interés, ya que las aproximaciones se pueden ver sesgadas por posibles errores en la asignación de las secuencias que se suben a las bases de datos. Por ejemplo en el árbol filogenético mostrado en la Figura 29 se observa la secuencia de *Phormidium subuliforme* ubicada muy lejos de los clados donde se encuentran las demás cianobacterias y asociada además a las secuencias seleccionadas como *outgroups* de *Pseudomonas* sp. y *Aliivibrio fischeri*.

Otro factor que también dificulta la identificación de cianobacterias bentónicas es que normalmente éstas suelen crecer en asociaciones con otros microorganismos en particular cianobacterias de menor tamaño como *Oscillatoria* o *Acaryochloris*, así como otro tipo de bacterias (Engene *et al.*, 2010). Se ha reportado que algunas secuencias reportadas como *Lyngbya* spp. en las bases de datos públicas están más cercanamente relacionadas con *Oscillatoria* spp. y que en algunos casos dichas secuencias pertenecen realmente a *Oscillatoria* y no a *Lyngbya* (Engene *et al.*, 2010). Para este caso, Engene *et al.* (2011) ponen como ejemplo muy común, consorcios formados por *Lyngbya* y *Oscillatoria nigroviridis* que reportan encontrar frecuentemente en campo, a partir los cuales se pudo haber obtenido muchas secuencias que podrían incurrir en dichos errores.

En los últimos años se ha resaltado la importancia de realizar aproximaciones “holísticas” para abordar el tema de la taxonomía de organismos como las cianobacterias, diversos autores resaltan la importancia de incluir en conjunto diversos criterios que unidos permitan realizar una aproximación más cercana a la verdadera identidad taxonómica de las cianobacterias. Estos criterios reúnen caracteres morfológicos micro y macroscópicos, ultraestructurales, ecológicos y moleculares (Komárek y Anagnostidis, 2005; Engene *et al.*, 2011).

Otro factor importante a tener en cuenta al realizar estudios taxonómicos utilizando el 16S rDNA de las cianobacterias, es la variación intragenómica de dicho gen. Engene *et al.* (2011; 2012), encontraron que especies de los géneros de cianobacterias marinas bentónicas arrecifales *Lyngbya* y *Moorea* presentan más de una copia diferente del gen 16S del rDNA. Las diferencias intragenómicas de este gen pueden generar malas interpretaciones a la hora de realizar una identificación taxonómica de las especies pertenecientes a estos géneros desde una perspectiva molecular.

Sin embargo el gen 16S del DNAr, sigue siendo una gran herramienta para la identificación de microorganismos, los estudios moleculares permiten confirmar las identidades asignadas mediante herramientas como las morfológicas, así como se logró encontrar de manera satisfactoria en el presente trabajo.

Komárek y Anagnostidis (2005) en sus claves taxonómicas desarrolladas para las cianobacterias pertenecientes al grupo de las Oscillatoriales, a las cuales pertenecen la gran mayoría de especies encontradas en el presente trabajo, permiten una aproximación bastante acertada a la taxonomía de las especies de cianobacterias bentónicas arrecifales encontradas en los muestreos realizados en el Caribe colombiano durante el presente trabajo. Estas claves taxonómicas morfológicas, sumadas a los resultados moleculares aquí obtenidos, permitieron una adecuada identificación de las cianobacterias presentes en los afloramientos del Caribe colombiano.

## 2.6. Bibliografía

- Agard J. 2011. Designating the Caribbean Sea as a Special Area. Professor John Agard, Expert, Caribbean Sea Commission, University of the West Indies Association of Caribbean States. 3 pp.
- Aguilera M. 2010. Geografía económica del Archipiélago de San Andrés, Providencia y Santa Catalina. Documentos de Trabajo Sobre Economía Regional. Banco de la República. Cartagena, 83 pp.
- Alvarez-Cobelas M, Gallardo T. 1988. Catálogo de las algas continentales españolas V. Cyanophyceae, Schaffner 1909. Acta Botanica Malacitana. 13: 53-76.
- Anon. 2011. Listado preliminar de especies marinas de Canarias. Observatorio Ambiental Granadilla. Tenerife. 1-174 pp.
- Araujo R, Bárbara I, Tibaldo M, Berecibar E, Díaz-Tapia P, Pereira R, Santos R, Sousa-Pinto I. 2009. Checklist of benthic marine algae and cyanobacteria of northern Portugal. Botanica Marina, 52: 24-46.
- Aysel V; Erdugan H. Dural B, Sükran Okudan E. 2006. Marine algae and seagrasses of Tekirdag (Black Sea, Turkey). Journal of Black Sea/Mediterranean Environment, 12: 251-267.
- Bayona L. 2012. Estudio de compuestos con actividad citotóxica aislados de cianobacterias bentónicas del Caribe colombiano. Trabajo de grado para optar al título de Químico. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, 9 pp.
- Bárbara I, Cremades J, Calvo S, López-Rodríguez MC, Dosil J. 2005. Checklist of the benthic marine and brackish Galician algae (NW Spain). Anales del Jardín Botánico de Madrid, 62: 69-100.
- Bostock PD, Holland AE. 2010. Census of the Queensland flora. Queensland herbarium, Department of Environmental and Resource Management, Brisbane. 319 pp.
- Boutte C, Grubisic S, Balthasart P, Wilmotte A. 2006. Testing of primers for the study of cyanobacterial molecular diversity by DGGE. Journal of Microbiological Methods, 65: 542-550.

- Caraus I. 2012. Algae of Romania. A distributional checklist of actual algae. *Studii si Cercetari Biologie. Universitatea Bacau*, 7: 1-809.
- Carney RS. 2005. Characterization of algal-invertebrate mats at offshore platforms and the assessment of methods for artificial substrate studies: Final report. U.S. Dept. of the Interior, Minerals Management Service, Gulf of Mexico OCS, New Orleans, La. 93 pp.
- CARSEA 2007. Caribbean Sea Ecosystem Assessment (CARSEA). A sub-global component of the Millennium Ecosystem Assessment (MA), J. Agard, A. Cropper, K. Garcia, eds., Caribbean Marine Studies, Special Edition, 85 pp.
- Charpy L, Palinska KA, Casareto B, Langlade MJ, Suzuki Y, Abed RMM, Golubic S. 2010. Dinitrogen-fixing cyanobacteria in microbial mats of two shallow coral reef ecosystems. *Microb. Ecol.*, 59: 174–186.
- Charpy L, Palinska KA, Abed RMM, Langlade MJ, Golubic S. 2012. Factors influencing microbial mat composition, distribution and dinitrogen fixation in three western Indian Ocean coral reefs. *European Journal of Phycology*, 47(1): 51-66.
- Cires Rodriguez E, Cuesta Moliner C. 2010. Checklist of benthic algae from the Asturias coast (North of Spain). *Boletín de Ciencias Naturales. R.I.D.E.A.*, 51: 135-212.
- Coles SL, Reath PR, Skelton PA, Bonito V, DeFelice RC, Basch L. 2003. Introduced marine species in Pago Pago Harbor, Fagatele Bay and the National Park Coast, American Samoa. Bishop Museum Press, Honolulu, Hawaii. 182 pp.
- Crispino LMB, Sant'Anna CL. 2006. Cianobactérias marinhas bentônicas de ilhas costeiras do Estado de São Paulo, Brasil. *Revista Brasil. Bot.* 29(4): 639-656.
- Díaz J, BarriosL, Cendales M, Garzón-Ferrerira J, Geister J, López M, Ospina G, Parra-Veandia F, Pinzo J, Vargas A, Zapata F y Zea S. 2000. Áreas Coralinas de Colombia. INVEMAR. Serie Publicaciones Especiales 5: 176pp.
- Díaz-Pulido G, Díaz-Ruiz M. 2003. Diversity of benthic marine algae of the Colombian Atlantic. *Biota Colombiana*, 4(2): 203-246.
- Díaz JM, Barrios LM, Gómez-López DI. 2003. Las praderas de pastos marinos en Colombia. Estructura y distribución de un ecosistema estratégico. Serie Publicaciones Especiales No. 10, Santa Marta, 160 pp.
- Engene, N., R.C. Coates y W. H. Gerwick. 2010. 16S rRNA gene heterogeneity in the filamentous marine cyanobacterial genus *Lyngbya*. *J. Phycol.*, 46: 591-601.
- Engene N, Choi H, Esquenazi E, Rottacker EC, Ellisman MH, Dorrestein PC, Gerwick WH. 2011. Underestimated biodiversity as a major explanation for the perceived rich secondary metabolite capacity of the cyanobacterial genus *Lyngbya*. *Environmental Microbiology*, 13(6): 1601–1610.

- Engene, N., E. C. Rottacker, J. Kasvtovsky, T. Byrum, H. Choi, M. H. Ellisman, J. Komárek y W. H. Gerwick. 2012. *Moorea producens* gen. nov., sp. nov. and *Moorea bouillonii* comb. nov., tropical marine cyanobacteria rich in bioactive secondary metabolites. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62: 1171–1178.
- Franco, A. 2005. Oceanografía de la ensenada de Gaira: El Rodadero, más que un centro turístico en el Caribe colombiano. Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Bogotá. 56pp.
- García MI, McCormick C, Chow R, Peñaloza G, Connolly E, Mitchell A, Hudson G, Howard M. 2003. Plan de manejo integrado de las áreas marinas protegidas parte I. Corporación para el Desarrollo Sostenible del Archipiélago de San Andrés, Providencia y Santa Catalina. San Andrés, 307 pp.
- Ghosh S, Keshri J.P. 2011. Some Cyanophyceae algae from the coastal regions of Visakhapatnam, India. *Journal of the Indian Botanical Society*, 90: 165-167.
- Guiry MD, Guiry, G.M. 2012. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; Consultado en octubre de 2012.
- Haroun R, Gil-Rodriguez MC, Berecibar-Zugasti E, Herrera-Morán B, 2003. Monera: Cyanophycota. 3-4 p. En: Lista de especies marinas de Canarias (algas, hongos, plantas y animales). Moro L, Martín JL, Garrido MJ, Izquierdo I. (Eds). Las Palmas: Consejería de Política Territorial y Medio Ambiente del Gobierno de Canarias, 248 pp.
- Huisman JM, 2004. Marine benthic flora of the Dampier Archipelago, Western Australia. *Records of the Western Australian Museum Supplement*, 66: 61–68.
- Huisman, JM, Leliaert F, Verbruggen H, Townsend RA. 2009. Marine benthic plants of Western Australia's shelf-edge atolls. *Records of the Western Australian Museum Supplement*, 77: 50-87.
- INVEMAR. 2001. Informe del Estado de los Ambientes Marinos y Costeros en Colombia: Año 2000. Santa Marta. 138 pp.
- INVEMAR. 2005. Informe del los ambientes marinos y costeros en Colombia: Año 2005. Serie de publicaciones periódicas, INVEMAR; No. 8. Santa Marta. 360 pp.
- INVEMAR. 2009. Informe del Estado de los Ambientes y Recursos Marinos y Costeros en Colombia: Año 2008. Serie de Publicaciones Periódicas No. 8. Santa Marta, 124 pp.
- Komárek J., Anagnostidis K. 2005. Cyanoprokaryota -2. Teil/ 2nd Part: Oscillatoriales. En: Büdel B., Krienitz L., Gärtner G., Schagerl M. (eds), *Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/2*, Elsevier/Spektrum, Heidelberg, 759 pp.

- Lipkin Y, Silva PC. 2002. Marine algae and sea grasses of the Dahlak Archipelago, southern Red Sea. *Nova Hedwigia*, 75: 1-90.
- Littler DS, Littler MM. 2000. Caribbean reef plants. An identification guide to the reef plants of the Caribbean, Bahamas, Florida and Gulf of Mexico. Washington: Offshore Graphics. País? ciudad?. 542 pp.
- Littler DS, Littler MM. 2003. South Pacific Reef Plants. A diver's guide to the plant life of the South Pacific Coral Reefs. Washington, DC: OffShore Graphics, Inc. 331 pp.
- Littler DS, Littler MM, Hanisak MD. 2008. Submersed plants of the Indian River Lagoon. Washington, D.C.: Offshore Graphics, Inc. 286 pp.
- Littler DS, Littler MM. 2010. Marine Plants of Pacific Panama. Smithsonian Tropical Research Institute, Smithsonian Institution. Disponible en: <http://biogeodb.stri.si.edu/pacificalgae>: Updated on January 2010.
- Lozano-Duque Y, Medellín-Mora J, Navas GR. 2010. Contexto climatológico y oceanográfico del mar Caribe colombiano. p 53-84. En INVEMAR (Eds.). Biodiversidad del margen continental del Caribe colombiano. Serie de Publicaciones Especiales, Invemar No. 20, 458 pp.
- Montecino V, Molina X, Martínez G, Olmedo MI, Retamal L, Hannach G, Orellana MV, 2001. Ecophysiological strategies in response to UV-B radiation stress in cultures of temperate microalgae isolated from the Pacific coast of South America. *Revista Chilena de Historia Natural*, 74: 293-311.
- Myers, N., R. A. Mittermeier, C. G. Mittermeier, G. A. B. da Fonseca, and J. Kent. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403: 853–858
- Nagle D, Paul VJ. Roberts M. 1996. Ypoamide, a new broadly acting feeding deterrent from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Tetrahedron Letters*, 37(35): 6263-6266
- Nagle DG, Paul VJ. 1998 Chemical defense of a marine cyanobacterial bloom. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 225: 29-38.
- Nieto CF. 2012. Cianobacterias bentónicas arrecifales: evaluación de sus interacciones alelopáticas mediante ensayos in situ en comunidades coralinas Islas del Rosario, Caribe Colombiano. Trabajo de grado para optar al título de Biólogo Marino. Universidad Jorge Tadeo Lozano. Bogotá, 45 pp.
- Nübel, U., F. García-Pichel y G. Muyzer. 1997. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3327-3332.
- Ortega MM, Godinez JL, Solórzano GG. 2001. Catálogo de algas bénticas de las costas mexicanas del golfo de Mexico y Mar Caribe. Universidad Nacional Autónoma de México. 594 pp.



- Paerl HW, Xu H, McCarthy MJ, Zhu G, Qin B, Li Y, Gardner WS. 2011. Controlling harmful cyanobacterial blooms in a hyper-eutrophic lake (Lake Taihu, China): The need for a dual nutrient (N & P) management strategy. *Water Research*, 45: 1973-1983.
- Paerl HW, Paul, VJ. 2012. Climate change: Links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water Research*, 49(5): 1349-1363.
- Pereira AR, McCue CF, Gerwick WH. 2010. Cyanolide A, a glycosidic macrolide with potent molluscicidal activity from the Papua New Guinea cyanobacterium *Lyngbya bouillonii*. *Journal of Natural Products*, 73: 217-220.
- Pineda IJ, Martinez LA, Bedoya DM, Cararroso P, Rojas JA. 2006. Plan de manejo del Parque Nacional Corales del Rosario y San Bernardo. UAESPNN, Territorial Costa Caribe. Cartagena, 371 pp.
- Quintana JI. 2011. Evaluación de la toxicidad y del potencial bioactivo de afloramientos de cianobacterias bentónicas arrecifales del Caribe colombiano. Trabajo de grado para optar al título de MSc en química. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, 112 pp.
- Rojas, M. 1996. Evaluación del proceso de sucesión de organismos adherentes sobre placas de aluminio en la Isla Naval (Islas del Rosario). Bogotá, Trabajo de grado (Biólogo Marino). Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Facultad de Ciencias. Programa de Biología Marina. 115 pp.
- Sharp K, Arthur K, Gu L, Ross C, Harrison G, Gunasekera S, Meickle T, Matthew S, Luesch H, Thacker R, Sherman D, Paul VJ. 2009. Phylogenetic and chemical diversity of three chemotypes of bloom-forming *Lyngbya* species (Cyanobacteria: Oscillatoriales) from reefs of Southeastern Florida. *Applied Environmental Microbiology*, 75(9): 2879–2888.
- Silva PG, Meñez EG, Moe RL. 1987. Catalog of benthic algae of the Philippines. Smithsonian Institution Press. Washington DC. 188 pp.
- Silva PC, Basson PW, Moe RL. 1996. Catalogue of the benthic marine algae of the Indian Ocean. University of California Publications in Botany, 79: 1-1259.
- Stielow S, Ballantine DL. 2003. Benthic cyanobacterial, *Microcoleus lyngbyaceus*, blooms in shallow, inshore Puerto Rican seagrass habitats, Caribbean sea. *Harmful Algae*, 2: 127-133.
- Sullivan Sealey, K., and G. Bustamante. 1999. Setting geographic priorities for marine conservation in Latin America and the Caribbean. Biodiversity Support Program TNC–USAID. Arlington, VA: The Nature Conservancy, 125 pp.
- Swingley, Chen M, Cheung PC, Conrad AL, Dejesa LC, Hao J, Honchak BM, Karbach LE, Kurdoglu A, Lahiri S, Mastrian SD, Miyashita H, Page L, Ramakrishna P, Satoh S, Sattley WM, Shimada Y, Taylor HY, Tomo T, Tsuchiya T, Wang ZT, Raymond J, Mimuro M, Blankenship RE, Touchman JW. 2008. Niche adaptation and genome expansion in the chlorophyll d-producing

cyanobacterium *Acaryochloris marina*. Proceedings of National Academy of Sciences, 105(6): 2005-2010.

Thacker R, Paul VJ. 2001. Are benthic cyanobacteria indicators of nutrient enrichment? Relationships between cyanobacterial abundance and environmental factors on the reef flats of Guam. Bulletin of Marine Science, 69: 497–508.

Thacker RW, Paul VJ. 2004. Morphological, Chemical, and Genetic Diversity of Tropical Marine Cyanobacteria *Lyngbya* spp. and *Symploca* spp. (*Oscillatoriales*). Applied And Environmental Microbiology, 70(6): 3305–3312.

Tsuda RT. 2003. Checklist and bibliography of the marine benthic algae from the Mariana Islands (Guam and CNMI). Technical Report. University of Guam Marine Laboratory. Technical Report 107. Mangilao, Guam. 49 pp.

Tsuda RT. 2006. Checklist and bibliography of the marine benthic algae within Chuuk, Pohnpei, and Kosrae States, Federated States of Micronesia. Honolulu: Bishop Museum Press. Honolulu, Hawaii. . 43 pp.

Titlyanov E, Titlyanova TV, Yakovleva IM, Sergeva OS. 2006. Influence of winter and spring/summer algal communities on the growth and physiology of adjacent scleractinian corals. Botanica Marina, 49: 200-207.

Van Guelpen L, Pohle G, Vanden Berghe E, Costello MJ. 2005. Marine Species Registers for the North Atlantic Ocean. World Wide Web electronic publication. Disponible en: <http://www.marinebiodiversity.ca/nonNARMS/>, version 1.0/2005.

Vivas-Aguas L, Tosic M, Sánchez J, Narváes S, Cadavid B, Bautista P, Betancourt J, Parra J, Echeverri L, Espinosa L. 2010. Diagnóstico y evaluación de la calidad ambiental marina en el Caribe y Pacífico colombiano. Red de vigilancia para la conservación y protección de las aguas marinas y costeras de Colombia-REDCAM. Informe técnico 2010. INVEMAR. Santa Marta, 208 pp.

Werner VR. 2010. Cyanophyceae. 356-366 p . En: Forzza RC (ED). Catálogo de plantas e fungos do Brasil. Vol. 1: Andrea Jakobsson Estúdio. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 872 pp

## 3. Capítulo 3. Abundancia y evaluación de la toxicidad de los afloramientos de cianobacterias.

### 3.1. Introducción

Las causas de afloramientos de cianobacterias en aguas dulces han sido bastante estudiadas (Ahern *et al.*, 2007a, 2007b; Paerl *et al.*, 2011; Paerl y Paul, 2012). Sin embargo, los afloramientos de cianobacterias bentónicas marinas no se comprenden del todo aún. Normalmente se producen en aguas poco profundas y factores ambientales tales como altas temperaturas, bajo oleaje y la disponibilidad de fósforo, nitrógeno y hierro se han relacionado con la formación de los afloramientos (O'Neil *et al.*, 2000; Kuffner y Paul, 2004; Albert *et al.*, 2005; Ahern *et al.*, 2007a, 2008).

Los reportes de los afloramientos de cianobacterias marinas bentónicas, carecen su mayoría de información cuantitativa de la abundancia *in situ* de las cianobacterias presentes durante dichos eventos (Thacker y Paul, 2001; Thacker *et al.*, 2001; Stielow y Ballantine, 2003, Ahern *et al.*, 2007a; Charpy *et al.*, 2010). En algunos casos, que resultan también ser escasos, se proporciona únicamente información cualitativa de dicha abundancia (Abed *et al.*, 2003).

El registro de la abundancia de tapetes de cianobacterias marinas bentónicas provee información muy importante, que podría constituirse como una herramienta para mejorar la comprensión sobre las dinámicas de los afloramientos en el tiempo, sus implicaciones ecosistémicas y los factores ambientales que están relacionados. Por esta razón, en este trabajo se realizó un registro de la abundancia de los principales tapetes de cianobacterias observados en los en los sitios de muestreo. Adicionalmente, se tuvo en cuenta información de algunas variables ambientales que, según la literatura, están relacionadas con los afloramientos de cianobacterias marinas.

De otro lado, numerosas especies de cianobacterias dulceacuícolas y algunas especies marinas, han estado implicadas en eventos de afloramientos masivos causando toxicidad en animales y riesgos a la salud humana (Paerl, 1996; Metcalf y Codd, 2004; Martins *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2010). A partir de las especies de cianobacterias involucradas en los afloramientos podrían obtenerse extractos y compuestos químicos con potencial de ser aprovechados como fármacos o insumos agroindustriales (Tan *et al.*, 2000; Simmons *et al.*, 2005; Tan, 2010). Por esta razón, en el presente trabajo se evaluó de manera preliminar la toxicidad y actividad biológica de extractos de cianobacterias mediante el ensayo de toxicidad con *Artemia salina*. Éste bioensayo, constituye una herramienta para la evaluación preliminar de los efectos tóxicos de afloramientos de cianobacterias marinas (Martins *et al.*, 2007; Lopes, *et al.*, 2010).

### **3.1.1. Abundancia de los tapetes de cianobacterias marinas bentónicas y su relación con variables fisicoquímicas locales.**

La abundancia e intensidad de los afloramientos de cianobacterias marinas, se ha relacionado con factores fisiológicos como las tasas de crecimiento y la capacidad de las mismas de aprovechar nutrientes (Stielow y Ballantine, 2003), factores ecológicos como la herbivoría y la competencia (Thacker *et al.*, 2001; Paerl y Paul, 2012), y por factores ambientales como la temperatura y la disponibilidad de nutrientes como el fósforo, nitrógeno y hierro (Albert *et al.*, 2005; Ahern *et al.*, 2007a; Ahern *et al.*, 2007b; Paerl y Paul, 2012).

El registro de la abundancia de los afloramientos de cianobacterias marinas, ofrece información que mejora la comprensión y conocimiento de la magnitud de estos fenómenos y su relación con las condiciones ambientales (Albert *et al.*, 2005; Ahern, *et al.*, 2007a). Esto es importante para establecer el impacto que los afloramientos pueden tener en áreas arrecifales y diseñar medidas de predicción, prevención y control de los mismos.

En el presente trabajo se realizó un registro de la abundancia de los principales tapetes de cianobacterias detectados en los sitios de muestreo y se determinaron algunos parámetros fisicoquímicos locales. La información acerca de las variables fisicoquímicas en las estaciones de muestreo, fue complementada con las bases de datos de sistemas de información como el Sistema de Observación Global de los Océanos (GOOS) y de los reportes técnicos de la calidad del agua en el Caribe colombiano realizados por el Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras (INVEMAR).

En este estudio, se obtuvo información puntual, acerca de la abundancia de cianobacterias en los afloramientos y su posible relación con los parámetros fisicoquímicos ambientales.

De esta manera, este trabajo aporta los primeros datos cualitativos y cuantitativos de la abundancia de cianobacterias en los afloramientos estudiados en el Caribe colombiano. Además, constituye una base para el estudio posterior en el tiempo de los afloramientos en la región y su relación con las variables ambientales.

### **3.1.2. Evaluación de la toxicidad de los afloramientos de cianobacterias del Caribe colombiano mediante en ensayo con *Artemia salina***

Se ha reportado toxicidad en algunos afloramientos de cianobacterias (Paerl, 1996; Metcalf y Codd, 2004; Martins *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2010). De igual forma que tienen extractos y compuestos aislados de cianobacterias revisten un especial interés para la industria (Tan *et al.*, 2000; Simmons *et al.*, 2005; Tan, 2010). Por esta razón se realizó una evaluación preliminar de la toxicidad y actividad biológica de extractos orgánicos de cianobacterias provenientes de los distintos afloramientos estudiados, a través de bioensayos con *Artemia salina*

Los bioensayos con invertebrados acuáticos como *A. salina* han sido utilizados exitosamente para realizar diferentes pruebas de toxicidad. Por ejemplo, cnidarios como *Hydra tenua*, equinodermos como *Paracentrotus lividus*, oligoquetos como *Tubifex tubifex*, crustáceos como *Thamnocephalus platyurus* y *Daphnia* spp., e insectos como *Culex pipiens* han sido utilizados en estudios de toxicidad (Kyselková y Marsalék, 2000; Hisem, 2008; Lopes *et al.*, 2010).

*Artemia salina* es un crustáceo ampliamente utilizado en estudios ambientales y toxicológicos. Adicionalmente, ha sido utilizada en la evaluación de la toxicidad de extractos y compuestos bioactivos de origen natural, la detección de toxicidad de compuestos de origen antrópico como plaguicidas en cuerpos de agua, la evaluación de la toxicidad de cianobacterias de diferentes ambientes acuáticos y terrestres y para la selección de extractos de organismos terrestres y marinos con potencial medicinal o agroindustrial (Mian *et al.*, 2003; Ruebhart *et al.*, 2008; Chipala *et al.*, 2009; Mayorga *et al.*, 2010).

El ensayo con *Artemia salina* es ampliamente utilizado, debido a la disponibilidad de sus huevos (cistos), la facilidad de la conservación de éstos y debido a que el bioensayo es rápido, sencillo y de bajo costo (Hisem, 2008; Ruebhart *et al.*, 2008; Mayorga *et al.*, 2010). El ensayo permite realizar comparaciones de la toxicidad entre una gran cantidad de sustancias o extractos (Sam, 1993).

- **Generalidades de *Artemia salina***

*A. salina* es un crustáceo perteneciente a la subclase Branchiopoda, orden Anostraca. Se encuentra distribuido alrededor del mundo en ambientes desde estuarinos hasta ultrasalinos (de 10-20 a 180-200 g/L de salinidad). Los huevos o cistos de *A. salina* son pequeñas partículas de color marrón que miden cerca de 0,2 mm de diámetro. Mientras se mantengan deshidratados, estos huevos pueden soportar condiciones extremas, manteniéndose viables para ser almacenados por largos períodos de tiempo (Sam, 1993). Después de ser rehidratados en una solución salina, estos organismos culminan su embriogénesis después de 16 a 36 horas. Las larvas tipo nauplio, pueden sobrevivir hasta 72 horas a partir de su vitelo únicamente. A partir de ese tiempo es necesario alimentarlas utilizando microalgas o levadura. Entre los 20 y 35 días después de la eclosión, los individuos alcanzan unos 9,5 mm y son sexualmente maduros (Sam, 1993).

- **Generalidades del ensayo de toxicidad con *A. salina***

Generalmente, el ensayo con *A. salina* se realiza utilizando las larvas nauplio que son expuestas a diferentes concentraciones de la sustancia a evaluar, para determinar la concentración a la que muere la mitad de los individuos. Esta concentración se denomina concentración letal media (CL<sub>50</sub>). Los nauplios de *A. salina* son utilizados en el ensayo aproximadamente 12 horas después de la eclosión (Sam, 1993). La CL<sub>50</sub>, se determina generalmente después de 24 horas de exposición de los nauplios de *A. salina* a los extractos, o sustancias a ensayar, aunque también puede ser evaluada tras otros periodos como 48 y 72 horas.

Para preparar la solución con el extracto o compuesto a ensayar, es necesario utilizar un solvente que facilite la resuspensión del extracto y la preparación de la misma. Uno de los solventes más utilizados en estos ensayos es el dimetilsulfóxido (DMSO). Las larvas de *A. salina* pueden soportar hasta un 11% de DMSO. Sin embargo, un aumento en la concentración de este solvente puede

aumentar también la sensibilidad de las larvas y arrojar valores erróneos de la  $CL_{50}$  calculada (Drobneska *et al.*, 2004). Los efectos de los solventes sobre la supervivencia de las larvas pueden ser variables por muchos factores, motivo por el cual es necesario realizar una buena selección de los mismos y ensayos previos con dichos solventes, para determinar hasta que concentración pueden ser utilizados sin provocar efectos nocivos sobre las larvas. Además, para cada ensayo, es necesario tener como control una solución de agua marina con la cantidad y mezcla de solventes utilizados para resuspender los extractos y de esa manera descartar que la posible toxicidad detectada en las pruebas se deba a efectos causados por el solvente (Sam, 1993).

## 3.2. Metodología

### 3.2.1. Abundancia de los tapetes de cianobacterias marinas bentónicas y su relación con variables fisicoquímicas locales.

La estimación de la abundancia de los afloramientos de cianobacterias marinas, se realizó dependiendo de las características de crecimiento de los mismos. Los afloramientos del tipo biopelículas marrones y rojas fueron muy frecuentes y abundantes a en las estaciones de muestreo en San Andrés y Providencia. Su abundancia fue cuantificada a partir de la estimación de su porcentaje de cobertura con el fin de aportar información importante sobre la dinámica de los afloramientos en el Caribe colombiano.

La abundancia de las biopelículas marrones y biopelículas rojas, fue evaluada en diferentes estaciones en la Isla de Providencia (Faro, Felipe's Place y Planchón, en julio de 2010) y en la Isla de San Andrés (Faro, octubre de 2009). Con el fin de registrar los porcentajes de cobertura, se establecieron diferentes categorías organismos bentónicos y tipos de sustrato, como arena, roca-cascajo, algas, esponjas, corales y octocorales. Los tapetes de cianobacterias fueron denominados biopelículas marrones (BM) y biopelículas rojas (BR). La cuantificación del porcentaje de cobertura se realizó mediante buceo autónomo SCUBA utilizando cuadrantes que permitieron estimar el área del sustrato cubierto por cada una de las categorías establecidas (Shutherland, 1996). El porcentaje de cobertura de organismos bentónicos se registró utilizando cuadrantes de 1 m<sup>2</sup>. Cada cuadrante estaba dividido por cuerdas en 100 celdas de 10 x 10 cm. Para cada estación se realizaron dos o más transectos de banda (Thacker y Paul, 2001), dentro de los que se dispusieron más de 30 cuadrantes (N>30). A partir de los datos obtenidos, se calculó el porcentaje de cobertura promedio para cada estación.

Adicionalmente, durante las evaluaciones en campo se realizaron observaciones sobre el tipo de sustrato u organismos sobre los cuales crecían los tapetes de cianobacterias. De esta manera se registraron observaciones acerca del efecto de estos tapetes sobre otros organismos bentónicos, especialmente corales y macroalgas, teniendo en cuenta signos como el blanqueamiento coralino, sofocamiento y evidencias de necrosis. Estas observaciones fueron realizadas para todos los tipos de tapetes de cianobacterias. Las observaciones particulares al respecto, fueron presentadas en el numeral 2.4.1.

Las observaciones y registros cualitativos de la abundancia de los principales tapetes de cianobacterias en las estaciones en San Andrés, Providencia y las Islas del Rosario (de manera cualitativa) son presentadas a continuación en el numeral 3.3.1.

En cuanto al registro de los parámetros fisicoquímicos y condiciones ambientales de los sitios de muestreo, se tomaron medidas en campo y se consultaron bases de datos que contenían información relacionada. Durante los muestreos, se tomaron medidas *in situ* de la temperatura, salinidad y el pH utilizando sondas digitales SevenGo Duo™ previamente calibradas. Adicionalmente, se tomaron muestras de agua adyacentes a los afloramientos en cada estación. A estas muestras de agua se les determinó la concentración de nutrientes, fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) y Amonio ( $\text{NH}_4^+$ ). Las determinaciones de tales nutrientes fueron realizadas por colorimetría utilizando el kit para análisis de agua Aquamerck®, siguiendo las especificaciones del fabricante. Datos históricos mensuales y valores por medio anuales de los parámetros fisicoquímicos para las diferentes áreas muestreadas en el presente trabajo, fueron obtenidos a partir del sistema de información de Observación Global de los Océanos (GOOS) del Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras (INVEMAR) y de los reportes de la calidad del agua presentados por la Red de Vigilancia para la Conservación y Protección de las Aguas Marinas y Costeras de Colombia (REDCAM).

### **3.2.2. Evaluación de la toxicidad de los afloramientos de cianobacterias del Caribe colombiano mediante en ensayo con *Artemia salina***

Para la obtención de los nauplios de *A. salina*, se dispuso 1 g de cistos de *A. salina* en un beaker con 500 ml de agua de mar artificial (solución de 30 g de sal marina/L) a 28 °C en una incubadora sin iluminación y con circulación de aire constante.

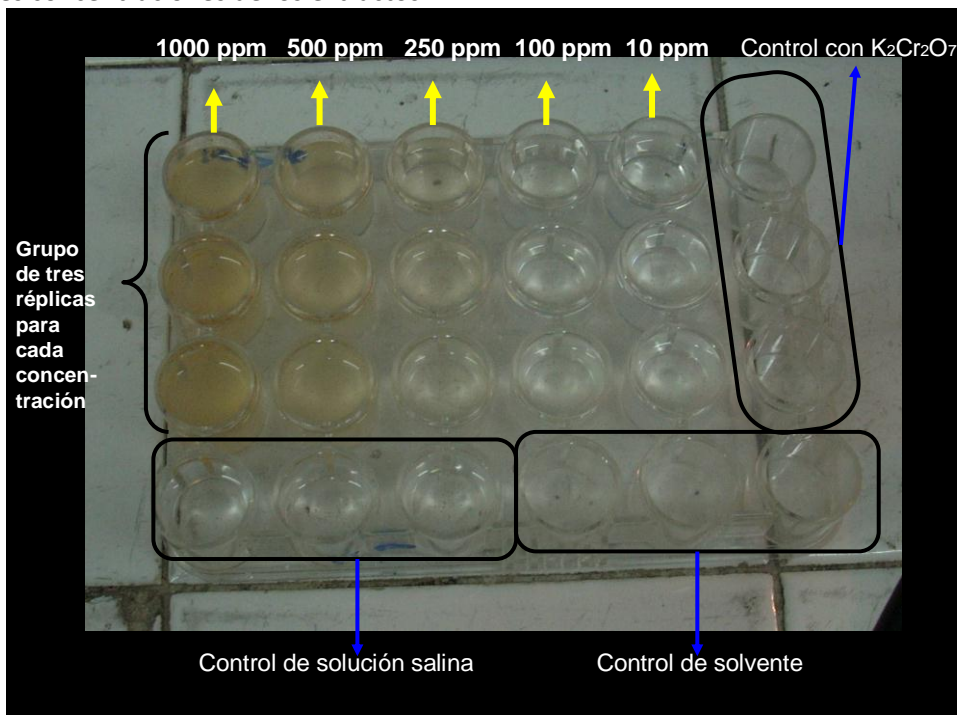
Se ensayaron ocho extractos de cianobacterias marinas arrecifales. Para la resuspensión de los extractos, se utilizó una mezcla de acetona y etanol al 0,2% 0,3% respectivamente del volumen final de la solución de los extractos en agua de mar artificial. Los solventes fueron agregados directamente a los extractos (aproximadamente 14 mg de peso seco de extracto) para resuspenderlos, requiriendo en numerosas ocasiones la utilización de un vortex o un equipo de ultrasonido para facilitar dicha resuspensión. Posteriormente, se completó el volumen deseado agregando agua de mar artificial para obtener una concentración de 1000 ppm. A partir de la solución de 1000 ppm, se prepararon cuatro diluciones en agua de mar artificial con concentraciones de 500, 250, 100 y 10 ppm. Se utilizó agua de mar artificial con y sin los solventes como controles y un control positivo con dicromato de potasio  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  a 100 ppm como control positivo (Figura 3.1) (modificado de Sam, 1993). Todas las concentraciones y controles fueron ensayadas por triplicado (N=3). A cada pozo se le agregó 2 ml de cada una de las soluciones tratamiento y control a ensayar.

El ensayo se inició 12 horas después de la eclosión de las larvas utilizando placas multipozo de 24 pozos. En cada pozo se dispusieron cuidadosamente 15 nauplios de *A. salina* utilizando pipetas Pasteur. Las placas con los nauplios fueron reincubadas a 28 °C durante 24 horas (modificado de Sam, 1993; Lopes *et al.*, 2010). Después de este tiempo, se contó el número de individuos vivos y muertos con la ayuda de un esteroscopio. Los individuos se consideraron muertos después de 30

segundos de no observar ningún movimiento interno o externo (Lopes *et al.*, 2010). En todas las ocasiones fue necesario golpear suavemente la placa para confirmar que el individuo que se estaba observando se encontraba realmente muerto, ya que algunos nauplios pueden reaccionar a este estímulo con algún movimiento de sus apéndices y deben ser registrados como vivos.

Los resultados obtenidos se introdujeron en una matriz de datos en Microsoft Excel para ser analizados mediante el método gráfico propuesto de Reed-Muench para la estimación de la  $CL_{50}$  (Sam, 1993). Este método consiste en representar gráficamente la mortalidad y la supervivencia acumuladas para las diferentes concentraciones ensayadas. Ambos parámetros se obtuvieron a partir de la suma de los resultados obtenidos en las tres réplicas a cada concentración evaluada. La  $CL_{50}$  es obtenida trazando una perpendicular al punto de intersección entre las curvas de mortalidad y supervivencia acumuladas (Sam, 1993).

**Figura 3.1.** Ensayo de toxicidad con *Artemia salina* realizado en una placa de 24 pozos. La figura muestra la manera como se distribuyeron las réplicas para los controles y las soluciones a diferentes concentraciones de los extractos.





### 3.3. Resultados.

#### 3.3.1. Abundancia de los tapetes de cianobacterias marinas bentónicas y su relación con variables fisicoquímicas locales.

Durante los muestreos realizados, se observaron distintos afloramientos de cianobacterias marinas bentónicas cuyas características y abundancia variaron según las fechas y las condiciones ambientales particulares de cada estación.

En las estaciones de Botellas, Ministerio y Pavitos, ubicadas en las Islas del Rosario, particularmente en el mes de septiembre de 2010, se observó un gran afloramiento de cianobacterias dominado por tapetes rojizos de filamentos gruesos (descritos en el numeral 2.3.1.1), conformados principalmente por *Lyngbya majuscula* y *Lyngbya sordida*. En algunos sitios, estos tapetes cubrían el 100% del sustrato abarcando áreas de hasta 5 m<sup>2</sup> de extensión continua y hasta 20 cm de espesor. Estos tapetes crecieron especialmente sobre cascajo de coral, macroalgas y octocorales, usándolos como superficie de anclaje. También se encontraron tapetes de hasta 5 m<sup>2</sup> flotando a la deriva sobre el sustrato arenoso, factor que puede cumplir un papel importante en su dispersión.

En los muestreos realizados durante el mismo periodo de 2011, no se observaron afloramientos tan abundantes como en 2010, sólo se encontraron algunas aglomeraciones ocasionales de no más de 30 cm<sup>2</sup> de extensión. De igual manera, en el mes de abril de 2012, se realizaron buceos en las mismas estaciones y no se encontró ningún tapete rojizo de filamentos gruesos.

Es posible que la abundancia de afloramientos de cianobacterias marinas bentónicas en las Islas del Rosario, se encuentre directamente relacionada los incrementos en la temperatura y aumentos de nutrientes provenientes de las descargas del Canal del Dique, que aumentan considerablemente durante la época lluviosa mayor de septiembre a noviembre (Rojas, 1996; INVEMAR, 2001; Franco, 2005).

En las islas de San Andrés y Providencia durante los muestreos de octubre de 2009 y julio de 2010, no se observaron afloramientos de tapetes rojizos de filamentos gruesos, con la magnitud observada en las Islas del Rosario en septiembre de 2010, únicamente se encontraron pequeños tapetes ocasionales de no más de 30 cm<sup>2</sup> de extensión, similar a lo observado en las Islas del Rosario en septiembre de 2011.

De otro lado, en la Isla de Providencia, más específicamente en la estación de los Pináculos se observaron grandes afloramientos de los tapetes algodonosos conformados por *Symploca hydroides* y *Phormidium submembranaceum* (descritos en el numeral 2.4.2). La estación Pináculos, se caracteriza por presentar grandes montículos cilíndricos rocosos totalmente sumergidos de unos 5-10 m de diámetro y de 7 a 11 m de altura. Los tapetes algodonosos resultaron ser muy abundantes en julio de 2010 donde se observó que cubrían cerca del 70% del sustrato rocoso disponible, el cual estaba previamente colonizado en su mayoría por macroalgas de los géneros *Turbinaria*, *Sargasum*, *Padina*, *Lobophora* y *Dyctiota*. Estos tapetes, crecían sobre

los montículos rocosos, utilizando en numerosas ocasiones la superficie de las macroalgas como anclaje y adoptando así un crecimiento vertical. Durante octubre de 2009, los afloramientos de estos tapetes fueron igualmente notorios, sin embargo, no presentaron la misma magnitud que en julio de 2010, ya que tenían coberturas aproximadas de un 30-40%. En las demás estaciones y fechas de muestreo, estos tapetes estuvieron siempre presentes, pero únicamente de manera ocasional formando montículos aislados de unos 8 cm de longitud y 5 cm de diámetro. En algunas ocasiones estos pequeños tapetes crecían sobre corales y octocorales observándose la muerte del tejido coralino debajo de los mismos.

Las biopelículas marrones (BM) y biopelículas rojas (BR) fueron encontradas en todas las localidades estudiadas, presentando abundancia variable. Estas biopelículas resultaron ser más abundantes sobre sustratos planos y arenosos. En numerosas ocasiones las biopelículas crecían sobre arena, macroalgas como *Dyctiota*, *Padina* y *Lobophora*, sobre coral muerto y cascajo. En algunos casos, las biopelículas rojas fueron observadas creciendo sobre diferentes especies de octocorales observándose necrosis bajo dichos tapetes cianobacterianos. Las estaciones donde la abundancia de este tipo de tapetes fue mayor, fueron el Faro en la Isla de San Andrés y Felipe's Place y el Planchón en la Isla de Providencia. En dichas estaciones, estas biopelículas fueron cuantificadas mediante la estimación del porcentaje de cobertura. Los porcentajes de cobertura promedio junto al número total de cuadrantes (N) evaluados por cada estación, se presentan en la Figura 3.1. En las Islas del Rosario, la abundancia de biopelículas rojas y marrones fue baja por lo cual no se realizaron evaluaciones de su porcentaje de cobertura local.

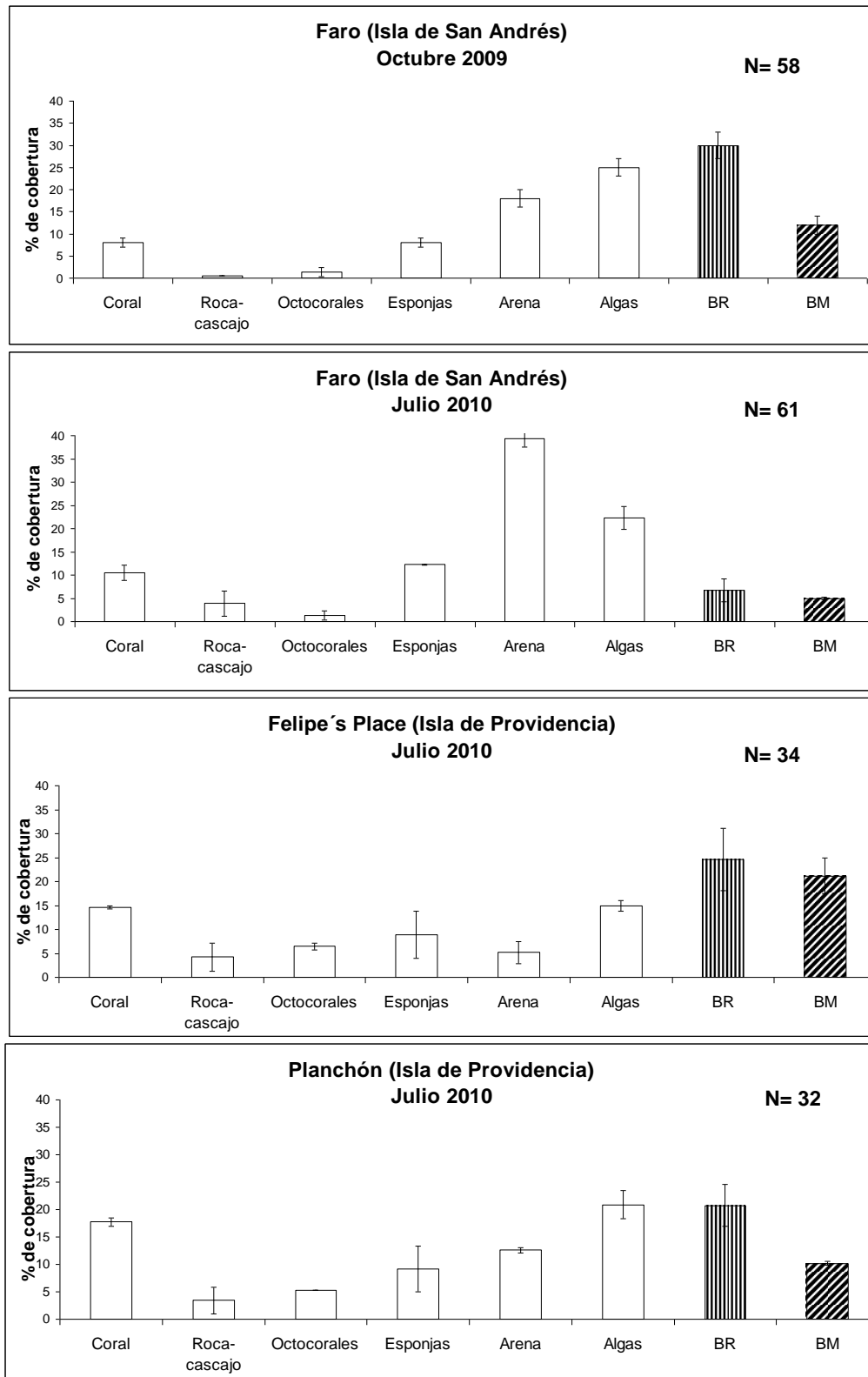
Los mayores porcentajes de cobertura de las biopelículas rojas, fueron encontrados en la estación Faro (octubre de 2009), con valores cercanos al 30%. En la misma estación durante los muestreos realizados en julio de 2010, los porcentajes de cobertura promedio de estos tapetes estuvieron cerca del 7% (Figura 3.2).

En las estaciones de Felipe's Place y Planchón, los porcentajes de cobertura de las biopelículas rojas estuvieron alrededor del 20 y 25%. De otro lado, se pudo apreciar que en todas las estaciones, estas biopelículas fueron más abundantes que las biopelículas marrones. Sin embargo, las biopelículas marrones presentaron porcentajes de cobertura similares a las rojas puesto que oscilaron entre el 5 y el 21% (Figura 3.2).

Ahora bien, si se suma el porcentaje de cobertura de ambos tipos de tapetes de cianobacterias (BR y BM), se obtienen valores de hasta un 46% de cobertura total de cianobacterias. Se encuentra también, que en todos los casos (excepto en Faro 2010), el porcentaje de cobertura de tapetes de cianobacterias (32% en promedio) superó el porcentaje de cobertura de algas el cual osciló entre un 15 y 25%.

La cobertura de corales escleractíneos en los sitios de muestreo osciló entre el 8 y 18%, valores que estuvieron por debajo del porcentaje de cobertura de cianobacterias y de algas. Ahora bien, si se suma los porcentajes de cobertura de las cianobacterias y las algas, es posible obtener coberturas de hasta un 61%, que superan ampliamente la cobertura de coral. Esta amplia diferencia, muestra la desventaja, en cuanto a su abundancia, que tienen los corales frente a macroalgas y cianobacterias.

**Figura 3.2.** Porcentaje (promedio  $\pm$  error estándar) de cobertura de las diferentes categorías evaluadas en los sitios de muestreo nombrados a continuación. **BR.** Biopelículas rojas. **BM:** Biopelículas marrones. **N:** número de cuadrantes analizados.



En cuanto a las variables fisicoquímicas, se encontró que en todos los sitios de muestreo, la salinidad se mantuvo entre los 31 y 36 g/L, valores encontrados dentro del rango histórico normal en ambientes costeros (Vivas-Aguas *et al.*, 2012). El pH en las estaciones osciló entre 8,0 y 8,3 similar a los promedios anuales reportados en el GOOS encontrados entre 8,1 y 8,2.

Los valores correspondientes a los parámetros fisicoquímicos determinados durante los muestreos y de los valores promedio anuales reportados en el GOOS, se presentan en la Tabla 3.1. Para el caso de las Islas del Rosario, los valores de parámetros fisicoquímicos fueron obtenidos únicamente a partir del GOOS y de los informes técnicos de la calidad del agua realizados por la Red de Vigilancia para la Conservación y Protección de las Aguas Marinas y Costeras de Colombia (REDCAM) (Vivas-Aguas *et al.*, 2010; Vivas-Aguas *et al.*, 2012). Los valores de temperatura mensual promedio durante los años 2009, 2010, 2011 y 2012, para San Andrés, Providencia y las Islas del Rosario fueron obtenidos del sistema de Observación Global de los Océanos (GOOS) de INVEMAR, y se presentan en la Figura 3.3.

**Tabla 3.1.** Valores de los parámetros fisicoquímicos determinados durante los muestreos para las estaciones ubicadas en el Archipiélago de San Andrés y Providencia y las Islas del Rosario. Se incluyen también valores de los mismos parámetros obtenidos de las bases de datos del GOOS. (NA) No aplica, (ND) Datos no disponibles.

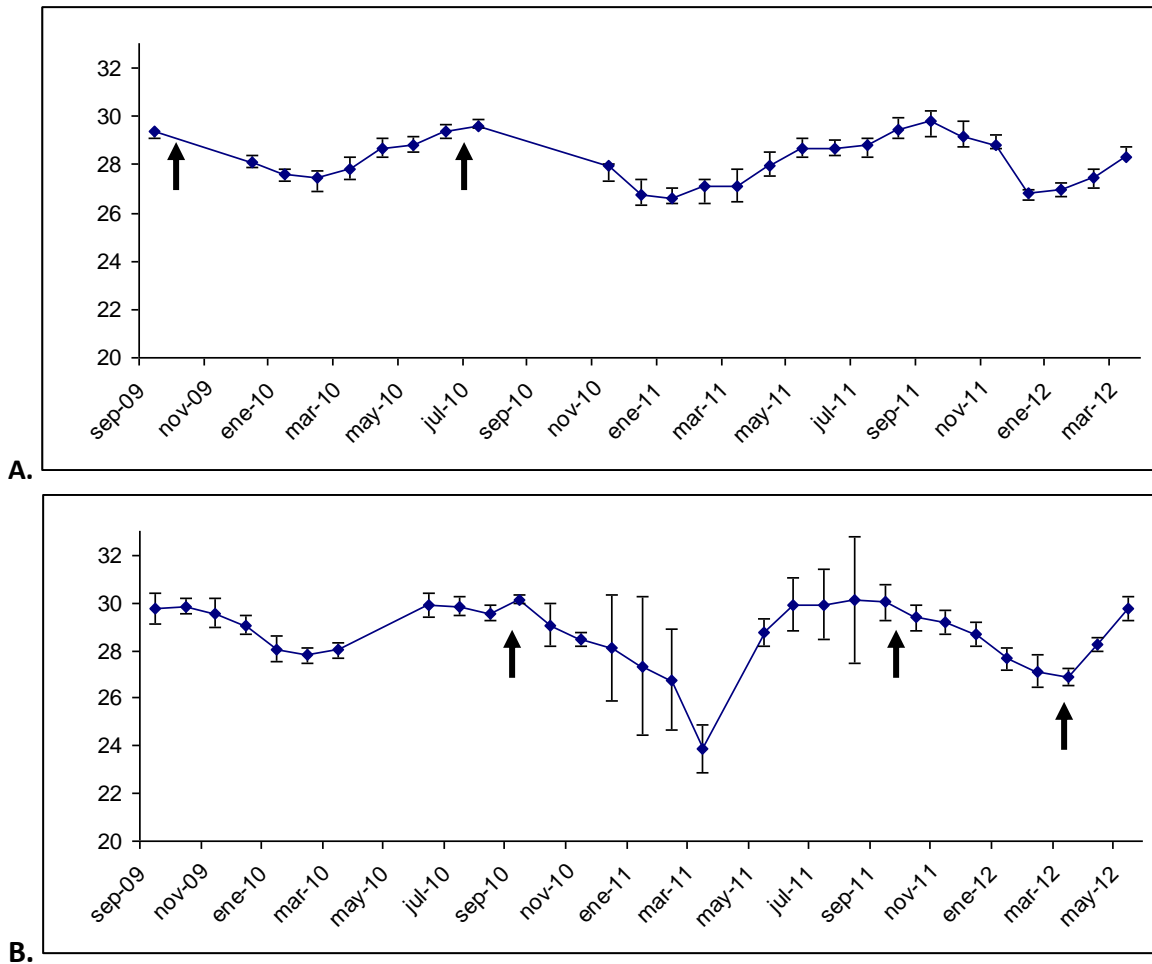
Estación / Fecha	T °C	Salinidad g/L	(PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ) mg/L	(NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) mg/L	(NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) mg/L	(NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) mg/L	pH
Felipe's Place, octubre 2009	30,3	30,3	0,625	10	0	0	8,3
Planchón, octubre 2009	29,5	34,5	1	0	0	0	8
Faro, octubre 2009	30,1	36,0	0,25	0	0	0	8,1
Pináculos, julio 2010	29,2	34,1	0,25	10	0	0,2	8,2
Felipe's Place julio 2010	30,4	34,2	0,25	10	0	0,2	8,2
Planchón, julio 2010	29,4	33,1	0,5	10	0	0	8,3
Faro, julio 2010	29,6	33	0,5	10	0	0,2	8,2
Media anual 2009 Providencia*	NA	35	0,06	0,05	0,002	0,02	8,1
Media anual 2009 San Andrés*	NA	35	0,24	0,06	0,003	0,03	8,2
Media anual 2010 Providencia*	NA	35	0,04	0,05	0,002	0,02	8,2
Media anual 2010 San Andrés*	NA	35	0,1	0,04	0,004	0,02	8,1
Media anual Islas del Rosario 2010*	NA	34	0,18	2,5	0,003	0,3	8,2
Media anual Islas del Rosario 2011*	NA	34	0,04	0,9	0,001	0,2	8,1
Promedio histórico época seca (Islas del Rosario 2012) *	NA	35	0,03	0,06	ND	ND	8,2

\* Datos obtenidos del sistema de información GOOS de INVEMAR. Consulta *on line* en <http://cinto.invemar.org.co/goos/>, septiembre de 2012.

En general las concentraciones de nutrientes determinadas en las estaciones de muestreo durante los afloramientos, estuvieron por encima de los valores promedio anuales reportados en el GOOS. Por ejemplo, las concentraciones de (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) oscilaron entre 0,25 y 1 mg/L en las localidades de estudio, mientras que los valores promedio anuales reportados en el GOOS, oscilaron entre 0,03 y 0,24 mg/L. Las concentraciones de nitratos (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) determinados en las estaciones de muestreo, en algunos casos presentaron valores por debajo determinadas en las

localidades de estudio, llegaron en ciertos casos hasta 10 mg/L, mucho mayores que los valores de referencia (entre 0,04 y 2,5 mg/L) reportados en GOOS.

**Figura 3.3.** Temperatura mensual promedio (°C) durante el periodo comprendido entre septiembre de 2009 a marzo de 2012 en: **(A)** Archipiélago de San Andrés y Providencia. **(B)** Las Islas del Rosario. Las flechas negras señalan los meses durante los cuales se realizaron muestreos en cada zona. Las barras de error corresponden a la desviación estándar. Datos obtenidos del sistema de información GOOS para Colombia. Consulta *on line* en septiembre de 2012 de <http://cinto.invemmar.org.co/goos>.



En cuanto a los valores de temperatura, en San Andrés y Providencia se registraron valores máximos entre julio y octubre (hasta 29,8 °C en promedio mensual) y valores mínimos entre enero y abril (desde 27 °C). Los muestreos realizados en la zona coincidieron con meses donde la temperatura presentaba valores altos durante el año, durante octubre de 2009 y julio de 2010 (Figura 3.3) periodos en los que también se observaron los conspicuos afloramientos de tapetes algodonosos formados por *Symploca hydroides* y *Phormidium submembranaceum* en los Pináculos (Providencia), y de las biopelículas marrones y rojo-púrpura en distintas localidades de Providencia y San Andrés.

En las Islas del Rosario, las temperaturas más altas se registraron durante los meses de junio a octubre (hasta 30,2 °C) y las mínimas durante los meses de enero a abril (desde 23,9 °C). Los muestreos realizados en esta zona fueron realizados durante los meses de septiembre de 2010 y 2011, que también coincidieron con altas temperaturas (Figura 3.3). Los altos valores de temperatura durante el primer muestreo realizado en septiembre de 2010, coincidieron con los afloramientos de abundantes tapetes rojizos de filamentos gruesos, formados por *Lyngbya majuscula* y *Lyngbya sordida*, con grandes extensiones del sustrato. Sin embargo para el mes de septiembre de 2011 la temperatura había comenzado a descender antes que en 2010 y tuvo valores menores durante el mes de septiembre. En el muestreo realizado en 2011, la temperatura fue menor que en 2010, al igual que la abundancia de los tapetes rojizos de filamentos gruesos. En el muestreo realizado en abril de 2012, la temperatura fue bastante baja, periodo en el cual no se observaron los afloramientos característicos de los tapetes de *Lyngbya majuscula* y *Lyngbya sordida*.

### 3.3.2. Evaluación de la toxicidad de los afloramientos de cianobacterias del Caribe colombiano mediante en ensayo con *Artemia salina*

De los ocho extractos de tapetes de cianobacterias marinas ensayados, seis fueron tóxicos para *Artemia salina* con CL<sub>50</sub> menores a 500 ppm, valor por debajo del cual se considera que una sustancia es tóxica. (Kiviranta *et al.*, 1991; Jaki *et al.*, 1999). Dos de los extractos evaluados, el extracto 9 y extracto 38 resultaron ser muy tóxicos para *A. salina* con valores de CL<sub>50</sub> inferiores a 100 ppm (5 y 60 ppm respectivamente). De otro lado, dos extractos (42 y 36) no resultaron ser tóxicos incluso a la mayor concentración ensayada de 1000 ppm. En todos los ensayos, los controles de solventes y de agua de mar presentaron supervivencias del 100%. Los resultados de los ensayos de toxicidad de los extractos de cianobacterias marinas contra *Artemia salina* se presentan en la Tabla 3.2.

**Tabla 3.2.** Resultados de los ensayos de toxicidad de los extractos de cianobacterias marinas contra *Artemia salina* a las 24 horas de exposición. Los valores de CL<sub>50</sub> se presentan en ppm del extracto en solución de agua de mar.

Número de extracto	Especies identificadas en la muestra *	CL <sub>50</sub> (ppm) 24 h contra <i>Artemia salina</i>
8	<i>Lyngbya majuscula</i> y <i>L. sordida</i>	400
9	<i>Oscillatoria nigroviridis</i>	5
11	<i>Lyngbya</i> spp. y <i>Oscillatoria margaritifera</i>	274
32	<i>Symploca hydroides</i> y <i>Phormidium submenbranaceum</i>	130
36	<i>Lyngbya</i> spp. ( <i>Lyngbya</i> sp., <i>L. cf confervoides</i> y <i>L. cf majuscula</i> )	**
38	<i>Lyngbya</i> spp. <i>Oscillatoria</i> spp. ( <i>L.cf semiplena</i> , <i>L.cf majuscula</i> ) ( <i>O. nigroviridis</i> , <i>O. margaritifera</i> )	60
42	<i>Oscillatoria acuminata</i> y <i>Spirulina subsalsa</i>	**
43	<i>Lyngbya majuscula</i> y <i>L. sordida</i>	127

(\*) Determinación taxonómica morfométrica tradicional siguiendo la clave de Komárek y Anagnostidis (2005), previamente presentada en los numerales 2.4 y 2.5. (\*\*) No hubo letalidad a 1000 ppm.

### 3.4. Discusión

#### 3.4.1. Abundancia de los tapetes de cianobacterias marinas bentónicas y su relación con variables fisicoquímicas locales.

En el presente trabajo se registraron grandes afloramientos de tapetes rojizos de filamentos gruesos compuestos principalmente por *Lyngbya majuscula* y *Lyngbya sordida*. Estos tapetes fueron muy abundantes y se encontraron generalmente anclados a octocorales, cascajo y corales pétreos de los géneros *Porites* y *Madracis* los cuales constituían una superficie propicia para el anclaje de las cianobacterias. Paul *et al.* (2005) reportaron y fotografiaron afloramientos con características similares en las costas del sur de la Florida, EEUU. En ese caso, los autores reportaron que dichos afloramientos estaban compuestos también por tapetes de cianobacterias del género *Lyngbya* al igual que lo observado en las Islas del Rosario. Sin embargo, Paul *et al.* (2005) sugieren que las especies de *Lyngbya* involucradas en dichos afloramientos comparten características morfológicas con *L. confervoides* y *L. polychroa* y encontraron que tal vez la especie dominante en el afloramiento puede ser una nueva especie del género *Lyngbya*. Además, observaron que los tapetes de *Lyngbya* crecían sobre diferentes octocorales causándoles efectos negativos. En los afloramientos observados en las Islas del Rosario, también se observó que los tapetes de *Lyngbya* spp. crecían sobre los octocorales que presentaron necrosis en las áreas cubiertas por las cianobacterias.

En el muestreo realizado durante el mes de abril de 2012 en las Islas del Rosario, no se observaron tapetes rojizos de filamentos gruesos. En ese periodo del año se registraron las menores temperaturas del agua en las Islas del Rosario con valores de 26,6 °C en promedio. Diferentes estudios, han comprobado que existe una correlación positiva entre el aumento de la temperatura y el incremento de la abundancia de cianobacterias marinas, mostrando afloramientos conspicuos que coinciden con los aumentos estacionales de la temperatura (Thacker y Paul, 2001; Watkinson *et al.*, 2005; Ahern *et al.*, 2007a; Paerl y Huisman, 2008). Aunque en el presente trabajo se realizaron muestreos puntuales, se encontró también una gran abundancia de cianobacterias y afloramientos en los periodos donde se presentaron mayores temperaturas en las estaciones muestreadas y una baja o nula abundancia (como se observó en abril de 2012 en Islas del Rosario) de tapetes de cianobacterias, relacionada con bajas temperaturas del agua.

Stielow y Ballantine (2003), monitorearon afloramientos de *Lyngbya majuscula* en la costas de Puerto Rico desde septiembre de 1998 hasta febrero del 2000. Los autores encontraron que los meses donde se observaron mayores porcentajes de cobertura de la cianobacteria fueron septiembre de 1998, septiembre de 2000 y diciembre del 2000, meses en los que también se presentaron altos valores de temperatura. Los autores encontraron porcentajes de cobertura de hasta un 100%. Los valores promedio de porcentaje de cobertura durante los afloramientos oscilaron entre el 7 y el 82%. Estos resultados son similares a lo observado las Islas del Rosario durante septiembre de 2010 y 2011.

En los afloramientos de *Lyngbya* spp. evaluados en las Islas del Rosario, se observó que los tapetes de cianobacterias crecían anclados a corales de los géneros *Porites* y *Madracis* y en ocasiones se observó blanqueamiento en los corales cubiertos por los tapetes de *Lyngbya* spp. Smith *et al.* (2008) reportaron un afloramiento de la cianobacteria *Leptolyngbya crosbyana* en arrecifes de Hawaii. Según los autores, los tapetes de *L. crosbyana* crecían formando tapetes de más de 50 cm de diámetro y hasta de 10 cm de espesor. Al igual que en las Islas del Rosario, los tapetes de *L. crosbyana* se encontraban anclados a las colonias de corales *Porites compressa*, observándose blanqueamiento y mortalidad de los mismos debajo de los tapetes de cianobacterias.

Otro ejemplo de la relación entre los incrementos de la temperatura y los afloramientos de cianobacterias y el consecuente aumento de su abundancia, es el estudio realizado por Ahern *et al.* (2007a) en Australia. Los autores monitorearon afloramientos de tapetes de la cianobacteria marina bentónica *Lyngbya majuscula* durante el año 2005 en costas del oriente de Australia. En Australia los afloramientos de cianobacterias han sido ampliamente reportados al igual que sus efectos negativos para el ecosistema y para el hombre (Osborne *et al.*, 2001; Albert *et al.*, 2005). Ahern *et al.* (2007a) al realizar mapeos y monitoreos *in situ*, cuantificaron y describieron la abundancia los afloramientos de *L. majuscula* en el tiempo, encontrando que durante el invierno y el comienzo de la primavera en septiembre de 2005 no se observó cobertura alguna de *Lyngbya majuscula*. Los afloramientos comenzaron progresivamente a finales del mes de octubre junto con el aumento de la temperatura, cuando la cobertura de *Lyngbya majuscula* no superaba el 10%, y los tapetes se encontraban en un área de 49 Hectáreas. Los autores reportaron que durante el siguiente mes (hasta noviembre 26), se dio un crecimiento rápido del afloramiento. Para esa fecha el porcentaje de cobertura de *L. majuscula* alcanzó valores cercanos al 40% y cubría aproximadamente 329 hectáreas. A su vez, la temperatura subió de 23,5 °C en octubre hasta 30,8 °C en diciembre. Se reportó que el afloramiento alcanzó un pico máximo hacia el 10 de diciembre con coberturas cercanas al 100% y un cubrimiento de 529 hectáreas. Para esa fecha las temperaturas tuvieron también valores máximos de hasta 32,4 °C. A finales de enero de 2006 el afloramiento había disminuido hasta cubrir 57 hectáreas y conforme disminuyó la temperatura, en el mes de febrero ya no se encontraron señales visibles de *L. majuscula* en el área. Estos resultados son consistentes con los encontrados en las Islas del Rosario, donde los afloramientos de los ensambles de *L. majuscula* y *L. sordida* cubrían grandes extensiones del sustrato arrecifal, durante finales del mes de septiembre de 2010 en el cual se presentaron altas temperaturas del agua (cercanas a 30 °C) (INVEMAR, consulta *on line*, octubre de 2012).

De otro lado, los resultados de Ahern *et al.* (2007a), permiten comprender mejor la magnitud de los afloramientos de *Lyngbya majuscula* a gran escala ya que los autores calcularon que durante el punto máximo el afloramiento, la biomasa seca de *L. majuscula* alcanzó las 510 toneladas lo cual equivale a 5.057 toneladas de peso húmedo.

En el presente trabajo se encontró que los tapetes algodonosos compuestos por ensambles de *Symploca hydroides* y *Phormidium submembranaceum* fueron muy abundantes en el sector de los Pináculos en la Isla de Providencia. Estos afloramientos fueron muy abundantes durante los meses de octubre de 2009 y julio de 2010, creciendo frecuentemente sobre macroalgas. *Symploca hydroides* ya había sido reportada para el Caribe colombiano por Díaz *et al.* (2003) y ha sido descrita formando tapetes algodonosos en otros lugares del mundo como Australia (Huisman *et al.*, 2009), Guam (Thacker y Paul, 2004), la Isla la Reunión en el Océano Índico, en las



costas de Okinawa en el Océano Pacífico (Charpy *et al.*, 2010) y en la Polinesia Francesa (Abed *et al.*, 2003). Se reporta la composición bi-específica (*Symploca hydnoides* y *Phormidium submembranaceum*) de los tapetes algodonosos encontrados en el Caribe colombiano, ya que otros autores presentan los tapetes algodonosos como monoespecíficos, formados solamente por *Symploca hydnoides* (Abed *et al.*, 2003; Thacker y Paul, 2004; Huisman *et al.*, 2009; Charpy *et al.*, 2010). Los tapetes algodonosos fueron observados durante los meses de julio de 2009 y 2010, meses en los que se presentaron los mayores valores de temperatura del agua para San Andrés y Providencia (cerca a 30 °C).

Thacker y Paul (2001) estimaron la abundancia de tapetes de cianobacterias en arrecifes de los alrededores de Guam mediante el cálculo del porcentaje de cobertura usando cuadrantes. Los autores encontraron diferentes tapetes formados por cianobacterias de las especies *Oscillatoria* spp., *Lyngbya* spp., *Symploca* spp. y *Tolypothrix* sp. Los porcentajes de cobertura registrados por los autores en algunos cuadrantes oscilaron entre un 0 y 65%. En el presente trabajo, se encontraron cuadrantes donde el porcentaje de cobertura de las biopelículas de cianobacterias alcanzó el 100% de cobertura. Sin embargo, los autores no presentan una discriminación entre los porcentajes de cobertura aportados por cada tapete por separado, ni una descripción de sus características macroscópicas, como si se realizó en el presente estudio.

En el presente trabajo, se encontró que las biopelículas marrones y biopelículas rojas, resultaron ser muy comunes en todas las estaciones de muestreo, pero, fueron realmente notorias por su abundancia, en las estaciones de Felipe's Place y el Planchón en Providencia y el Faro en San Andrés. Estas estaciones se caracterizaron por presentar un sustrato bastante plano y arenoso, el cual parece ser propicio para el crecimiento de este tipo de tapetes. En promedio estos tapetes presentaron en conjunto porcentajes de cobertura de 32% hasta 42%. Charpy *et al.* (2010), cuantificaron el porcentaje de cobertura de diferentes tipos de tapetes de cianobacterias en la Isla La Reunión en el Océano Índico. Los autores encontraron que en el área estudiada, el fondo era bastante plano y arenoso, similar a las estaciones del donde este tipo de tapetes predominaron en las áreas evaluadas del Caribe colombiano. En tal estudio se reportaron las especies *Oscillatoria bonnemaisonii* (biopelículas verde-oliva) y *Leptolyngbya* spp. (biopelículas de coloraciones variables), que crecían preferiblemente sobre la arena que sobre otros sustratos. Estos dos tipos de biopelículas fueron los más abundantes en La Reunión y presentaron porcentajes de cobertura promedio de 1,5% y 3,1% respectivamente, alcanzando en ocasiones coberturas del 10%. En el presente trabajo, las biopelículas marrones y rojo-púrpura alcanzaron porcentajes de cobertura promedio mayores a lo reportado por Charpy *et al.* (2010), que fueron desde el 5% (biopelículas marrones en el Faro, julio de 2010) hasta un 30 % (biopelículas rojas en el Faro, octubre de 2009).

Así mismo, otros tapetes de cianobacterias encontrados en la Isla La Reunión compuestos por *Phormidium*, *Anabaena*, *Symploca*, *Oscillatoria* y *Leptolyngbya*, crecían exclusivamente anclados a sustratos duros (Charpy *et al.*, 2010). Los autores describieron características del crecimiento de tapetes algodonosos conformados por *Symploca hydnoides* muy similares a las descritas en el presente estudio, donde se encontró también que los tapetes algodonosos formados por *Symploca hydnoides* y *Phormidium submembranaceum*, crecían principalmente sobre sustratos duros.

De otra parte, diversos autores han reportado que los afloramientos de cianobacterias se ven estimulados por el aumento de la concentración de nutrientes en los cuerpos de agua, lo cual está relacionado con la eutrofización causada generalmente por el crecimiento demográfico y actividades agrícolas y la disposición de desechos (Albert *et al.*, 2005; Pittman y Pittman, 2005; Watkinson *et al.*, 2005; Ahern *et al.*, 2007a; Paerl, 2009; Paerl *et al.*, 2011; Paerl y Paul, 2012). Adicionalmente, se ha determinado que los nutrientes que tienen un mayor efecto estimulante del crecimiento de las cianobacterias son el hierro, el fósforo y el nitrógeno (Ahern *et al.*, 2007a; Ahern *et al.*, 2007b; Ahern *et al.*, 2008, Albert *et al.*, 2005; Pittman y Pittman, 2005; O'Neil *et al.*, 2011; Paerl y Paul, 2012). Las lluvias también estimulan la formación de afloramientos de cianobacterias marinas (Albert *et al.*, 2005), ya que aumentan la escorrentía y el caudal de ríos que aportan grandes cantidades de nutrientes provenientes de los ambientes terrestres a las zonas costeras (Albert *et al.*, 2005; Vivas-Aguas *et al.*, 2010).

En San Andrés, Providencia y las Islas del Rosario, se ha reportado que durante la época lluviosa, los niveles de nutrientes en el mar aumentan considerablemente en relación a los promedios históricos de la época seca (Providencia, promedio histórico época seca ( $\text{PO}_4^{3-}$ )= 60  $\mu\text{g/L}$ ; época lluviosa 131  $\mu\text{g/L}$ . San Andrés, promedio histórico época seca ( $\text{PO}_4^{3-}$ )= 49  $\mu\text{g/L}$ ; época lluviosa 84  $\mu\text{g/L}$  con valores hasta de 405  $\mu\text{g/L}$ . Islas del Rosario, promedio histórico época seca ( $\text{PO}_4^{3-}$ )= 48  $\mu\text{g/L}$ ; época lluviosa 180  $\mu\text{g/L}$ ) (Vivas-Aguas *et al.*, 2010). Durante los afloramientos observados en el presente trabajo se encontraron concentraciones de nutrientes muy altas, por ejemplo, concentraciones de ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) entre 250 y 1000  $\mu\text{g/L}$  y de ( $\text{NO}_3^-$ ) de hasta 10000  $\mu\text{g/L}$  en San Andrés y Providencia. Estos valores fueron mayores, pero similares a los reportados por Henao (2012), para las Islas del Rosario en la época lluviosa, con concentraciones de ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) de 70  $\mu\text{g/L}$  y de ( $\text{NO}_3^-$ ) de 3211  $\mu\text{g/L}$ . Los altos valores de nutrientes registrados durante los afloramientos en el presente trabajo, sugieren que los afloramientos de cianobacterias observados en el Caribe colombiano están relacionados con el aumento de la concentración de nutrientes en el agua.

Igualmente, los muestreos realizados en el presente trabajo durante los cuales se observaron conspicuos afloramientos de cianobacterias marinas (San Andrés y Providencia, octubre de 2009 y julio de 2010, Islas del Rosario, septiembre de 2010 y 2011), fueron realizados durante o poco después de los periodos más lluviosos (San Andrés y Providencia, el mes de junio y de septiembre a noviembre (García *et al.*, 2003), Islas del Rosario, septiembre a noviembre (INVEMAR, 2001)). Particularmente en el muestreo realizado en abril de 2012 en las Islas del Rosario, no se observaron afloramientos de cianobacterias, esto coincide con la temporada más seca (diciembre a abril) y los menores niveles de temperatura para la zona.

De esta manera, los resultados aquí obtenidos, sugieren un efecto sinérgico de altas temperaturas, las temporadas lluviosas y los incrementos en niveles de nutrientes en el agua, sobre la abundancia e incidencia de los afloramientos de cianobacterias marinas en el Caribe colombiano.

Teniendo en cuenta la magnitud que pueden alcanzar los afloramientos de cianobacterias, es importante advertir las consecuencias negativas que éstos pueden tener para la economía y los ecosistemas. Pittman y Pittman (2005) encontraron disminución de más del 70% en la biomasa de peces de interés comercial y camarones durante afloramientos de *Lyngbya majuscula* en las costas de Australia. Los autores encontraron que durante afloramientos ocurridos durante diciembre de 1999, las capturas de peces comerciales disminuyeron hasta en un 70%. Además de

las pérdidas económicas a las industrias pesqueras y turísticas de la región, estos afloramientos pueden traer graves consecuencias ambientales presumiblemente por la toxicidad de los mismos (Ahern *et al.*, 2007a).

Los afloramientos de cianobacterias marinas pueden causar condiciones hipóxicas. Se reportó que los niveles de oxígeno disuelto en el fondo marino pueden disminuir de un 80% a cerca del 0% durante los afloramientos de *Lyngbya majuscula* en las costas australianas (Pittman y Pittman, 2005). Esto se agrava aún más cuando los afloramientos terminan y grandes cantidades de biomasa de cianobacterias son descompuestas por bacterias heterótrofas en el fondo marino, procesos que consumen grandes cantidades de oxígeno causando condiciones hipóxicas-anóxicas. Estas condiciones, pueden causar la muerte masiva de peces y crustáceos como camarones y cangrejos, generando grandes pérdidas económicas y ecológicas que afectan a la población nativa y a la industria pesquera (Moreton Bay Regional Council, 2011).

Adicionalmente, las consecuencias ecológicas de los afloramientos de cianobacterias marinas bentónicas se extienden a otros ecosistemas muy importantes como los arrecifes de coral (se tratará en detalle en el Capítulo 5), las praderas de pastos marinos y los manglares. Estos ecosistemas hacen parte de los llamados ecosistemas estratégicos, ya que aportan a la productividad primaria, constituyen la fuente de alimento para una gran cantidad de especies marinas, proporcionan el soporte para la pesca actuando como sala-cuna para peces e invertebrados de importancia comercial, ayudan a la sedimentación, protegen las costas de la erosión y protegen la biodiversidad (Díaz *et al.*, 2003; Moreton Bay Regional Council, 2011). En países como Puerto Rico y Australia, los pastos marinos pueden verse seriamente afectados por afloramientos de cianobacterias como *Lyngbya majuscula* (Stiellow y Ballantine, 2003; Watkinson *et al.*, 2005). Stiellow y Ballantine (2003) encontraron que durante afloramientos de *L. majuscula* en las costas de Puerto Rico, el porcentaje de cobertura del pasto marino *Thalassia testudinum* se redujo de un 52 % hasta un 9 % en tan solo 3 meses. De otro lado, afloramientos de *Lyngbya* que cubren las lagunas de manglar han sido relacionados con malformaciones y aumento en la mortalidad de los propágulos y plántulas de mangle (Moreton Bay Regional Council, 2011).

Debido a las consecuencias ecológicas y económicas negativas que tienen los afloramientos de cianobacterias y a los riesgos que éstos pueden representar para la salud humana, se ha generado la necesidad de buscar alternativas para la mitigación de los factores que favorecen el incremento de su abundancia en los cuerpos de agua. Para su control es necesario disminuir los aportes excesivos de nutrientes derivados de actividades antrópicas a los cuerpos de agua (Paerl, 2009) y generar políticas a nivel local, nacional y mundial para lograr este objetivo. Este tipo de esfuerzos se están implementando por gobiernos como el de Australia, que destinó 300 millones de dólares australianos para reducir las descargas de nitrógeno a las costas de la Bahía Moreton donde se han venido presentando afloramientos de *Lyngbya majuscula* (Ahern, *et al.*, 2007b).

Teneindo en cuenta lo anterior, se resalta la necesidad de continuar realizando investigaciones que aporten al conocimiento de los afloramientos de cianobacterias marinas en Colombia para aumentar la comprensión de estos fenómenos, las consecuencias ecológicas, sus posibles aplicaciones bioprospectivas y servir como guía para las estrategias de manejo y control de dichos afloramientos.

### 3.4.2. Evaluación de la toxicidad de los afloramientos de cianobacterias del Caribe colombiano mediante en ensayo con *Artemia salina*

Los trabajos realizados para evaluar la toxicidad de cianobacterias estuarinas o marinas son escasos (Piccardi *et al.*, 2000; Martins *et al.*, 2007; Chipala, 2009; Lopes *et al.*, 2010). La mayoría de trabajos que han evaluado la toxicidad de extractos de cianobacterias utilizando *Artemia salina* como organismo ensayo, han sido realizados con especies de cianobacterias de agua dulce (Kyselková y Marsálek, 2000; Drobnieska *et al.*, 2004; Akin-Oriola y Lawton, 2006).

Los resultados obtenidos en éste trabajo, mostraron que la toxicidad de los extractos de cianobacterias marinas del Caribe colombiano, fue mayor que la reportada en otros estudios. Seis de los extractos evaluados fueron tóxicos a los nauplios con valores de  $CL_{50}$  menores por debajo de 500 ppm. Dichos extractos fueron obtenidos de ensambles compuestos por cianobacterias pertenecientes a los géneros *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Symploca* y *Phormidium*. Lopes *et al.* (2010), ensayaron 18 extractos de cianobacterias obtenidas de ambientes estuarinos del norte y centro de Portugal de los géneros *Leptolyngbya*, *Phormidium*, *Cyanobium*, *Nodularia*, *Microcoleus* y *Nostoc*. Los autores encontraron que los tres extractos que resultaron ser más tóxicos para *A. salina* fueron, obtenidos de *Leptolyngbya* spp. y *Microcoleus* sp., y presentaron valores de  $CL_{50}$  8950 ppm, 12100 y 13780 ppm, tras 24 horas de exposición. Valores de  $CL_{50}$  que resultan estar muy por encima de los encontrados en el presente trabajo.

De otro lado, Frazao *et al.* (2010) aislaron ocho especies de cianobacterias filamentosas marinas de la costa central de Portugal de los géneros *Oscillatoria*, *Phormidium* y *Leptolyngbya* y dos géneros cocoides *Cyanobium* y *Synechococcus*. De cada una de las cepas aisladas se obtuvieron tres extractos diferentes, uno lipofílico en diclorometano, uno metanólico y otro acuoso, que fueron evaluados frente a *A. salina* tras 24 horas de exposición. Los autores encontraron que solamente un extracto obtenido de *Cyanobium* causó más del 50% de mortalidad de los nauplios de *A. salina* a una concentración de 100 mg/ml que equivale a 100.000 ppm. Los valores de  $CL_{50}$  de la mayoría de extractos metanólicos y acuosos estuvieron alrededor de los 50 mg/ml, lo cual equivale a 50.000 ppm. Dichos valores de  $CL_{50}$  resultan ser considerablemente mayores que los obtenidos de los extractos de las cianobacterias recolectadas del Caribe colombiano en el presente trabajo.

Algunos de los estudios que han evaluado la toxicidad de extractos de cianobacterias, han encontrado que del 10-25% de los extractos ensayados resultan ser tóxicos para *Artemia salina* (resumido en Hisem *et al.*, 2011). En el presente trabajo se encontró que 6 de 8 extractos resultaron ser tóxicos para los nauplios de *Artemia*. Mian *et al.* (2003) ensayaron 44 extractos hidrofílicos y lipofílicos de cianobacterias terrestres y de agua dulce a una concentración de 500 ppm frente a *A. salina*. Sólo 2 de ellos, provenientes de *Gloeotheca rupestres* e *Hydrocoleus* sp. causaron mortalidad superior al 50%. Adicionalmente, Jaki *et al.* (1999), ensayaron 86 extractos hidrofílicos y lipofílicos obtenidos de 43 cepas de cianobacterias terrestres y dulceacuícolas de Suiza y Nepal a una concentración de 500 ppm frente a *A. salina*. Los autores encontraron que únicamente siete (dos extractos hidrofílicos y cinco lipofílicos) causaron mortalidades superiores al 50% de los nauplios, a dicha concentración.

Piccardi *et al.* (2000), evaluaron la toxicidad de los extractos lipofílicos e hidrofílicos de 50 cepas de cianobacterias del género *Nostoc* aisladas en Italia de diferentes ambientes como rocas, suelo, campos de cultivo de arroz, agua dulce y líquenes, entre otros. Dos de las cepas ensayadas fueron obtenidas en ambientes marinos. Los extractos fueron ensayados a una concentración de 1000 ppm. Los autores encontraron que 16 extractos obtenidos de 12 cepas diferentes causaron una mortalidad mayor al 75% a los nauplios de *A. salina* tras 24 horas de exposición. Las cepas marinas no resultaron ser tóxicas.

Chipala *et al.* (2009), ensayaron extractos crudos obtenidos de 61 especies de cianobacterias de ambientes marinos, dulceacuícolas y terrestres. 16 de dichas especies fueron marinas identificadas dentro de los géneros *Aphanothece*, *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Dermocarpa*, *Pleurocapsa*, *Arthrospira*, *Geitlerinema*, *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Nostoc* y *Scytonema*. Los autores evaluaron la toxicidad de los extractos a una concentración de 100 ppm, encontrando que únicamente los extractos de las especies *Fisherella ambigua*, *Tolypothrix sp.*, *Lyngbya aestuarii* (marina) causaron una mortalidad mayor al 90%, mientras que los demás extractos mostraron mortalidades menores al 10%. Estos resultados son similares a los encontrados en el presente trabajo donde se encontraron valores de  $CL_{50}$  menores a 100 ppm como los correspondientes a los extractos 9 (5 ppm) y 38 (60 ppm).

De otro lado, es posible que la toxicidad encontrada frente a *A. salina* por parte de los extractos evaluados en el presente estudio, se deba en parte a estrés ambiental o ecológico. Algunas investigaciones plantean que la producción de compuestos tóxicos por parte de las cianobacterias puede verse estimulada por diferentes factores ambientales como la irradiación solar y la cantidad de nutrientes disponible, además, se ha encontrado que el aumento en la producción de toxinas se puede dar en respuesta a factores ecológicos como la presencia de posibles competidores como las algas y de potenciales consumidores como peces e invertebrados herbívoros (Berry *et al.*, 2008). Compuestos como las cianobacterinas, las fischerelinas, la nostocyclamida y las microcistinas son potentes inhibidores de la fotosíntesis y pueden cumplir un importante papel en la competencia entre cianobacterias y otros organismos fotosintéticos como las algas (Gleason y Case, 1986; Jüttner *et al.*, 2001; Pflugmacher, 2002; Berry *et al.*, 2008). Existen además estudios que ha demostrado que la presencia de algas verdes y plantas acuáticas al igual que sus extractos, estimulan la producción de inhibidores de la fotosíntesis como las microcistinas en las cianobacterias expuestas a los mismos, como una posible respuesta alelopática a dicha competencia (Mohamed, 2002; Jang *et al.*, 2007).

Por otro lado, es importante tener en cuenta que el aumento de los tapetes y afloramientos de cianobacterias marinas podrían introducir grandes cantidades de metabolitos tóxicos en los ambientes acuáticos, ya que aunque las toxinas generalmente son liberadas al medio cuando las células sufren lisis o cuando mueren (Martins *et al.*, 2007). En el presente trabajo se encontró que seis de los ocho extractos de cianobacterias resultaron ser tóxicos para *A. salina* y que los valores de  $CL_{50}$  de dichos extractos son mucho menores que los encontrados en otros estudios, evidenciando así su mayor toxicidad (Kyselková y Marsálek, 2000; Piccardi *et al.*, 2000; Frazao *et al.*, 2010; Lopes *et al.*, 2010). Esto resulta preocupante pues los afloramientos de cianobacterias marinas en el Caribe colombiano pueden constituir un riesgo para los organismos arrecifales (Martins *et al.*, 2007). Dado que algunos compuestos potencialmente tóxicos pueden bioacumularse y biomagnificarse a través de las redes tróficas, los afloramientos de cianobacterias marinas podrían representar también un riesgo para la salud humana, sin embargo

nunca se observó evidencias de muerte de peces u otros organismos (Murch *et al.*, 2004; Cox *et al.*, 2005).

Los potenciales efectos tóxicos que puedan tener los extractos de cianobacterias marinas sobre otros organismos arrecifales, pueden cumplir un papel importante para la formación de afloramientos, colonización del sustrato y persistencia en los arrecifes (Martins *et al.*, 2007). Estos afloramientos de cianobacterias tienen además un fuerte impacto sobre la biodiversidad, la industria pesquera y el turismo (Frazao *et al.*, 2010). Por estas razones es necesario continuar con el estudio de la composición, magnitud, toxicidad y efectos ecológicos de dichos afloramientos en Colombia.

### 3.5. Bibliografía

- Abed RMM, Golubic S, Garcia-Pichel F, Camoin GF, Sprachta. 2003. Characterization of microbialite-forming cyanobacteria in a tropical lagoon: Tikehau atoll, tuamotu, French Polynesia. *Journal of Phycology*. 39: 862–873.
- Ahern KS, Ahern CR, Savige GM, Udy JW. 2007a. Mapping the distribution, biomass and tissue nutrient levels of a marine benthic cyanobacteria bloom (*Lyngbya majuscula*). *Marine and Fresh Water Research*, 58: 883-904.
- Ahern KS, Ahern CR, Udy JW. 2007b. Nutrient additions generate prolific growth of *Lyngbya majuscula* (cyanobacteria) in field and bioassay experiments. *Harmful Algae*, 6: 134-151.
- Ahern KS, Ahern CR, Udy JW. 2008. In situ field experiment shows *Lyngbya majuscula* (cyanobacterium) growth stimulated by added iron, phosphorus and nitrogen. *Harmful Algae*, 7: 389-404.
- Akin-Oriola GA, Lawton LA, 2006. The detection and quantification of cyanobacterial toxins in water using the brine shrimp (*Artemia salina*) assay. *West Africa Journal of Applied Ecology*, 9: 1-6.
- Albert S, O’Neil JM, Udy JW, Ahern KS, O’Sullivan CM, Dennison WC. 2005. Blooms of the cyanobacterium *Lyngbya majuscula* in coastal Queensland, Australia: disparate sites, common factors. *Marine Pollution Bulletin*, 51: 428-437.
- Berry JP, Gantar M, Perez MH, Berry G, Noriega FG. 2008. Cyanobacterial Toxins as allelochemicals with potential applications as algacides, herbicides and insecticides. *Marine Drugs*, 6: 117-146.
- Charpy L, Palinska KA, Casareto B, Langlade MJ, Suzuki Y, Abed RMM, Golubic S. 2010. Dinitrogen-fixing cyanobacteria in microbial mats of two shallow coral reef ecosystems. *Microb. Ecol.*, 59: 174–186.

- Chlipala G, Mo S, Carcache de Blanco EJ, Ito A, Bazarek S, Orjala J. 2009. Investigation of antimicrobial and protease-inhibitory activity from cultured cyanobacteria. *Pharmaceutical Biology*, 47(1): 53-60.
- Cox PA, Banak SA, Murch SJ, Rasmussen U, Tien G, Bidigare RR, Metcalf JS, Morrison LF, Codd GA, Bergman B. 2005. Diverse taxa of cyanobacteria produce  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic aminoácido. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 102(14): 5074-5078.
- Díaz JM, Barrios LM, Gómez-López DI. 2003. Las praderas de pastos marinos en Colombia. Estructura y distribución de un ecosistema estratégico. Serie Publicaciones Especiales No. 10, Santa Marta, 160 pp.
- Drobniewska A, Tarczynska M, Mankiewicz J, Jurczak T, Zalewski M. 2004. Increase of crustacean sensitivity to purified hepatotoxic cyanobacterial extracts by manipulation of experimental conditions. *Environmental Toxicology*, 19: 416-420.
- Franco, A. 2005. Oceanografía de la ensenada de Gaira: El Rodadero, más que un centro turístico en el Caribe colombiano. Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Bogotá. 56pp.
- Frazao B, Martins R, Vasconcelos V. 2010. Are known cyanotoxins involved in the toxicity of picoplanktonic and filamentous North Atlantic marine cyanobacteria?. *Marine Drugs*, 8: 1908-1919.
- García MI, McCormick C, Chow R, Peñaloza G, Connolly E, Mitchell A, Hudson G, Howard M. 2003. Plan de manejo integrado de las áreas marinas protegidas parte I. Corporación para el Desarrollo Sostenible del Archipiélago de San Andrés, Providencia y Santa Catalina. San Andrés, 307 pp.
- Gleason FK, Case DE. 1986. Activity of the natural algicide, cyanobacterin, on angiosperms. *Plant Physiology*, 80: 834-837
- Gunasekera SP, Ritson-Williams R, Paul VJ. 2008. Carriebowmide, a new cyclodepsipeptide from the marine cyanobacterium *Lyngbya polychroa*. *Journal of Natural Products*. 71: 2060-2063.
- Hisem D, Hrouzek P, Tomek P, Tomsícková J, Zapomelová E, Skácelová K, Lukesová A, Kopecký J. 2011. Cyanobacterial cytotoxicity versus toxicity to brine shrimp *Artemia salina*. *Toxicon*, 57: 76-83.
- Huisman, JM, Leliaert F, Verbruggen H, Townsend RA. 2009. Marine benthic plants of Western Australia's shelf-edge atolls. *Records of the Western Australian Museum Supplement*, 77: 50-87.
- INVEMAR. 2001. Informe del Estado de los Ambientes Marinos y Costeros en Colombia: Año 2000. Santa Marta. 138 pp.

- Jaki B, Orjala J., Bürgi HR, Sticher O. 1999. Biological screening of cyanobacteria for antimicrobial and molluscicidal activity, brine shrimp lethality, and cytotoxicity. *Pharmaceutical Biology*, 37(2): 138-143.
- Jang MH, Kyong H, Takamura N. 2007. Reciprocal allelopathic responses between toxic cyanobacteria (*Microcystis aeruginosa*) and duckweed (*Lemna japonica*). *Toxicon*, 49: 727-733.
- Jüttner F, Todorova AK, Walch N, von Philipsborn W. 2001. Nostocyclamide M: A cyanobacterial cyclic peptide with allelopathic activity from *Nostoc* 31. *Phytochemistry*, 57: 613-619.
- Kiviranta J, Sivonen K, Niemelä SI, Huovinen K. 1991. Detection of toxicity of cyanobacteria by *Artemia salina* bioassay. *Environmental Toxicology. Water Quality*, 6:423-436.
- Kyselková I, Marsálek B. 2000. Using of *Daphnia magna*, *Artemia salina* and *Tubifex tubifex* for cyanobacterial microcystins detection. *Biologia*, 55(6): 637-643.
- Kuffner IB, Paul VJ. 2004. Effects of the benthic cyanobacterium *Lyngbya majuscula* on larval recruitment of the reef corals *Acropora surculosa* and *Pocillopora damicornis*. *Coral Reefs*, 23: 455-458.
- Lopes VR, Fernández N, Martins RF, Vasconcelos V. 2010. Primary screening of the bioactivity of brackishwater cyanobacteria: Toxicity of crude extracts to *Artemia salina* larvae and *Paracentrotus lividus* embryos. *Marine Drugs*, 8: 471-482.
- Martins RR, Fernandez N, Beiras R, Vasconcelos V. 2007. Toxicity assessment of crude and partially purified extracts of marine *Synechocystis* and *Synechococcus* cyanobacterial Straits in marine invertebrates. *Toxicon*, 50: 791-799.
- Mayorga P, Pérez KR, Cruz SM, Cáceres A. 2010. Comparison of bioassays using the anostracan crustaceans *Artemia salina* and *Thamnocephalus platyurus* for plant extract toxicity screening. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(6): 897-903.
- Metcalf, J.S. y Codd, G.A. 2004. Cyanobacterial toxins in the water environment: A review of current knowledge. Foundation for Water Research. UK. 36 pp.
- Mian P, Heilmann J, Bürgi HR, Sticher O. 2003. Biological screening of terrestrial and freshwater cyanobacteria for antimicrobial activity, brine shrimp lethality, and cytotoxicity. *Pharmaceutical Biology*, 41(4): 243-247.
- Miller MA, Kudela RM, Mekebri A, Crane D, Oates SC, Tinker MT, Staedler M, Miller WA, Toy-Choutka S, Dominik C, Hardin D, Langlois G, Murray M, Ward K, Jessup DA. 2010. Evidence for a novel marine harmful algal bloom: Cyanotoxin (microcystin) transfer from land to sea otters. *PLoS ONE* 5:e12576.



- Mohamed ZA. 2002. Allelopathic activity of *Spirogyra* sp.: Stimulating bloom formation and toxin production by *Oscillatoria* in some irrigation canals, Egypt. *Journal of Plankton Research*, 24: 137-141.
- Moreton Bay Regional Council. 2011. Lyngbya Management Strategy. Moreton Bay Regional Council, Environmental Planning & Compliance Department. Queensland. 11 pp.
- Murch SJ, Cox PA, Banack SA. 2004. A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 101(33): 12228-12231.
- O'Neil JM, Davis TW, Burford MA, Gobler CJ. 2011. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae*, doi:10.1016/j.hal.2011.10.027: 1-22.
- Osborne NJT, Webb PM, Shaw GR. 2001. The toxins of *Lyngbya majuscula* and their human and ecological health effects. *Environment International*, 27: 381-392.
- Paul VJ, Thacker R, Banks K, Golubic S. 2005. Benthic cyanobacterial blooms impacts the reef of south Florida (Broward County, USA). *Coral Reefs*, 24: 693-697.
- Paerl, H.W. 1996. A comparison of cyanobacterial bloom dynamics in freshwater, estuarine and marine environments. *Phycologia*, 35(6): 25-35
- Paerl HW. 2009. Controlling eutrophication along the freshwater–marine continuum: Dual nutrient (N and P) reductions are essential. *Estuaries and Coast*, 32: 593-601.
- Paerl, HW and J Huisman. 2008. Blooms like it hot. *Science*, 320: 57-58.
- Paerl HW, Xu H, McCarthy MJ, Zhu G, Qin B, Li Y, Gardner WS. 2011. Controlling harmful cyanobacterial blooms in a hyper-eutrophic lake (Lake Taihu, China): The need for a dual nutrient (N & P) management strategy. *Water Research*, 45: 1973-1983.
- Paerl HW, Paul, VJ. 2012. Climate change: Links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water Research*, 49(5): 1349-1363.
- Pereira AR, McCue CF, Gerwick WH. 2010. Cyanolide A, a glycosidic macrolide with potent molluscicidal activity from the Papua New Guinea cyanobacterium *Lyngbya bouillonii*. *Journal of Natural Products*, 73: 217-220.
- Pflugmacher S. 2002. Possible allelopathic effects of cyanotoxins, with reference to microcystin-LR, in aquatic ecosystems. *Environmental Toxicology*, 17: 407-413.
- Piccardi R, Frosini A, Tredici MR, Margheri MC. 2000. Bioactivity in free-living and symbiotic cyanobacteria of the genus *Nostoc*. *Journal of Applied Phycology*. 12: 543-547.

- Pittman SJ, Pittman KM. 2005. Short-term consequences of a benthic cyanobacterial bloom (*Lyngbya majuscula* Gomont) for fish and penaeid prawns in Moreton Bay (Queensland, Australia). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 63: 619-632.
- Ritson-Williams R., Paul VJ, Bonito V. 2005. Marine benthic cyanobacteria overgrow coral reef organisms. *Coral Reefs*, 24: 629.
- Rojas, M. 1996. Evaluación del proceso de sucesión de organismos adherentes sobre placas de aluminio en la Isla Naval (Islas del Rosario). Bogotá, Trabajo de grado (Biólogo Marino). Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Facultad de Ciencias. Programa de Biología Marina. 115 pp.
- Ruebhart DR, Cock IE, Shaw GR. 2008. Brine shrimp bioassay: Importance of correct taxonomic identification of *Artemia* (Anostraca) species. *Environmental Toxicology*, 23: 555–560.
- Sam T. W. 1993. Toxicity testing using the brine shrimp: *Artemia salina*. En: Colegate, S. y Molineux, R. B. (Eds). *Bioactive Natural Products: Detection, isolation and structural determination*. CRC Press Inc. Boca Raton, Fl. 528 pp.
- Shutherland WJ. 1996. *Ecological census techniques*. Cambridge University Press, Cambridge, 336 pp.
- Simmons TL, Andrianasolo E, McPhail K, Flatt P, Gerwick WH. 2005. Marine Natural Products as anticancer drugs. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4(2): 333-341.
- Smith JE, Kuwabara J, Flanagan K, duPlessis S, Coney J, Beets J, Takabayashi M, Barnes S, Turner J, Brown D, Griesemer BK, Stanton F. 2008. An unusual cyanobacterial bloom in Hawai'i. *Coral Reefs*, 27:851.
- Stielow S, Ballantine DL. 2003. Benthic cyanobacterial, *Microcoleus lyngbyaceus*, blooms in shallow, inshore Puerto Rican seagrass habitats, Caribbean sea. *Harmful Algae*, 2: 127-133.
- Tan LT, Okino T, Gerwick WH. 2000. Hermitamides A and B, toxic malyngamide-type natural products from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Journal of Natural Products*, 63: 952-955.
- Tan LT. 2010. Filamentous tropical marine cyanobacteria: a rich source of natural products for anticancer drug discovery. *Journal of Applied Phycology*, 22(5): 659-676.
- Thacker R, Paul VJ. 2001. Are benthic cyanobacteria indicators of nutrient enrichment? Relationships between cyanobacterial abundance and environmental factors on the reef flats of Guam. *Bulletin of Marine Science*, 69: 497–508.
- Thacker RW, Ginsburg DW, Paul VJ. 2001. Effects of herbivore exclusion and nutrient enrichment on coral reef macroalgae and cyanobacteria. *Coral Reefs*, 19: 318-329.
- Thacker RW, Paul VJ. 2004. Morphological, Chemical, and Genetic Diversity of Tropical Marine

- Cyanobacteria *Lyngbya* spp. and *Symploca* spp. (*Oscillatoriales*). *Applied And Environmental Microbiology*, 70(6): 3305–3312.
- Vivas-Aguas L, Tosic M, Sánchez J, Narváes S, Cadavid B, Bautista P, Betancourt J, Parra J, Echeverri L, Espinosa L. 2010. Diagnóstico y evaluación de la calidad ambiental marina en el Caribe y Pacífico colombiano. Red de vigilancia para la conservación y protección de las aguas marinas y costeras de Colombia-REDCAM. Informe técnico 2010. INVEMAR. Santa Marta, 208 pp.
- Vivas-Aguas L, Tosic M, Sánchez J, Narváes S, Cadavid B, Bautista P, Betancourt J, Parra J, Carvajalino M, Espinosa L. 2012. Diagnóstico y evaluación de la calidad ambiental marina en el Caribe y Pacífico colombiano. Red de vigilancia para la conservación y protección de las aguas marinas y costeras de Colombia-REDCAM. Informe técnico 2011. INVEMAR. Santa Marta, 229 pp.
- Watkinson AJ, O’Neil JM, Dennison WC. 2005. Ecophysiology of the marine cyanobacterium, *Lyngbya majuscula* (Oscillatoriaceae) in Moreton Bay, Australia. *Harmful Algae*, 4: 697-715.

## 4. Capítulo 4. Evaluación del posible papel ecológico de las cianobacterias marinas bentónicas arrecifales: Disuasión de la herbivoría.

### 4.1. Introducción

Los arrecifes de coral son ampliamente reconocidos por su gran diversidad biológica, por su valor ecológico, estético, económico y por los bienes y servicios que proveen a la humanidad, tales como las pesquerías y el turismo. Estos ecosistemas también se constituyen en una importante fuente potencial de compuestos bioactivos con posibles aplicaciones farmacéuticas (Hughes, 1994; Hughes *et al.*, 2003). En las últimas décadas, sin embargo, se ha generalizado un deterioro masivo en los arrecifes del mundo por el calentamiento global y la sobrepesca, aportes de nutrientes y sedimentos, la agricultura y vertimientos relacionados, el crecimiento demográfico, la contaminación, la deforestación, los dragados y la minería, entre otros (Hughes, 1994; INVEMAR, 2005; Mumby *et al.*, 2012).

El deterioro de los arrecifes ha tenido como una de sus principales consecuencias, un reemplazo masivo de la cobertura de coral por macroalgas y cianobacterias (Hughes, 1994; INVEMAR, 2005). Estos eventos denominados cambios de fase, han sido reportados en Jamaica, algunos arrecifes del oriente de Panamá, Australia, las Islas Vírgenes y Bahamas, entre otros (Hughes, 1994, McCook *et al.*, 2001; Pandolfi *et al.*, 2003). Este es uno de los factores más importantes que afectan negativamente la resiliencia de los arrecifes coralinos (McCook *et al.*, 2001; INVEMAR, 2005).

Los arrecifes presentan una gran diversidad de herbívoros que pueden ejercer una fuerte presión sobre las comunidades de productores primarios como las macroalgas y cianobacterias (Hughes *et al.*, 2003; Hughes *et al.*, 2007). En áreas tropicales, los herbívoros más importantes en términos de consumo e impacto sobre las macroalgas son los peces y los erizos (Duffy y Hay, 1990; Thacker *et al.*, 1997; Nagle y Paul, 1999). En zonas arrecifales los herbívoros pueden consumir entre un 60-100% de la biomasa algal (Carpenter, 1986; Hay y Fenical, 1988; Valentine *et al.*, 2000). El papel de la herbivoría en los arrecifes coralinos, junto a el aporte de nutrientes, son los dos factores más determinantes en definir la relación entre la cobertura de algas y corales en los arrecifes (Hay, 1992; Littler *et al.*, 2009).

La disminución de las poblaciones de herbívoros arrecifales es una causa indirecta del aumento en la cobertura algal y de los cambios de fase (Hughes, 1994; Hughes *et al.*, 2003; INVEMAR, 2005; Kuffner *et al.*, 2006; Hughes *et al.*, 2007). La sobrepesca en los arrecifes diezma las

poblaciones de peces herbívoros causando desbalances en el control de las poblaciones de macroalgas y su consecuente sobrecrecimiento sobre corales y otros sustratos (Hughes, 1994; Hughes *et al.*, 2003; INVEMAR, 2005; Mumby *et al.*, 2012). En ocasiones otros herbívoros como los erizos, pueden aumentar en respuesta a la disminución de los peces herbívoros y controlar las poblaciones algales como ocurrió en arrecifes de Jamaica afectados por la sobrepesca. Sin embargo, en 1983 ocurrió la mortalidad masiva en todo el Caribe de los erizos *Diadema antillarum* lo cual desencadenó un incremento excesivo de algas en Jamaica y otras localidades del Caribe (Hughes, 1994).

Las cianobacterias bentónicas son grandes colonizadoras de sustratos como esqueletos de coral, además se han reportado grandes afloramientos de las mismas en zonas arrecifales, constituyendo junto a las macroalgas, otro grupo de productores primarios que afectan los corales y aumentan la magnitud de los cambios de fase (Paul *et al.*, 2005). Las cianobacterias bentónicas, al igual que las macroalgas, se ha visto favorecidas por los actuales efectos *bottom-up* (como el aumento de nutrientes en los cuerpos de agua) y *top-down* (como la disminución en las poblaciones de herbívoros en los arrecifes) incrementando su abundancia y cobertura sobre las áreas arrecifales (Littler *et al.*, 2009).

La mayoría de las macroalgas, comparadas con las plantas terrestres, son totalmente follaje, tienen mucho menos material estructural como lignina, celulosa y hemicelulosa, por lo tanto son más susceptibles al consumo por parte de los herbívoros (Hay y Steinberg, 1992). Por su forma de crecimiento macroscópico y folioso en forma de tapetes, las cianobacterias bentónicas, son tratadas de igual manera que las macroalgas desde una perspectiva ecológica, en particular con su relación con los herbívoros arrecifales. Al igual que las macroalgas, los afloramientos de cianobacterias bentónicas podrían constituir una potencial fuente de alimento para los herbívoros presentes en dichas zonas (Pennings *et al.*, 1997). Los afloramientos de cianobacterias bentónicas ocurren frecuentemente en ambientes donde existen diversos ensamblajes de herbívoros como peces, erizos y opistobranquios. Durante los afloramientos, éstas pueden formar agregaciones de tal tamaño que pueden sobrepasar a las macroalgas en términos de biomasa (Obs. Pers; Pennings *et al.*, 1997; Nagle y Paul, 1999).

La herbivoría en áreas arrecifales genera una fuerte presión sobre macroalgas y cianobacterias bentónicas y puede llegar a ser tan intensa que cerca del 100% de la biomasa alcanza a ser consumida (Carpenter, 1986; Paul y Hay, 1986; Duffy y Hay, 1990; Littler *et al.*, 2009). Las macroalgas y cianobacterias pueden minimizar el consumo por parte de los herbívoros de diferentes maneras, escapando de los herbívoros espacial o temporalmente, tolerando la herbivoría o mediante defensas químicas y estructurales, o bien, en ocasiones, algunas especies integran diferentes tipos tanto químicos, estructurales, espaciales o temporales de protección contra los herbívoros (Duffy y Hay, 1990).

Las cianobacterias y macroalgas pueden escapar de los herbívoros creciendo en hábitats o épocas del año en los cuales los herbívoros no son abundantes o están inactivos, pueden crecer asociadas a especies defendidas química o físicamente utilizándolas como refugio, crecer durante la noche cuando la herbivoría es menor creciendo rápidamente para compensar pérdidas de biomasa (Hay *et al.*, 1994; Duffy y Hay, 1990; Hay, 1991). Además adaptaciones morfológicas tales como la presencia de defensas estructurales, calcificación de los talos y el crecimiento

aplanado incrustante, entre otros, son patrones recurrentes de defensa en algas que pueden dificultar el consumo por los herbívoros (resumido en Duffy y Hay, 1990, Hay, 1991).

La producción de compuestos químicos disuasores de la herbivoría desempeña un importante papel de defensa contra el consumo y permite la permanencia y crecimiento de algas y cianobacterias en zonas arrecifales (Paul y Hay, 1986; Hay, 1991). Estos compuestos pueden servir también para defenderse de patógenos (Engel *et al.*, 2002), prevenir el *fouling* (Dobretsov *et al.*, 2009), o actuar como agentes alelopáticos, entre otras posibles funciones ecológicas (Duffy y Hay, 1990; Pennings *et al.*, 1996). Existen diversos trabajos donde se evidencia la actividad disuasoria del consumo por herbívoros de extractos y compuestos químicos obtenidos de diferentes especies de algas y cianobacterias (resumido en Hay, 1991).

La producción de compuestos químicos disuasores de la herbivoría puede ser crucial para la supervivencia y permanencia de cianobacterias marinas bentónicas especialmente en ambientes altamente competitivos como los arrecifes de coral (Thacker *et al.*, 1997; Burja *et al.*, 2001; Paul *et al.*, 2005; Cruz-Rivera y Paul, 2007; Paerl y Paul, 2012). Algunos experimentos han mostrado como extractos y compuestos químicos obtenidos a partir de cianobacterias marinas presentan actividad disuasoria de la herbivoría sobre erizos, anfípodos, cangrejos y peces como peces conejo (Siganidae), peces loro (Scaridae) y peces cirujano (Acanthuridae) (Thacker *et al.*, 1997; Nagle y Paul, 1998; Cruz-Rivera y Paul, 2000; Cruz-Rivera y Paul, 2007). Hasta el momento no existe ningún estudio que haya evaluado las interacciones mediadas químicamente de las cianobacterias marinas bentónicas con los herbívoros en el Caribe colombiano.

Especies de cianobacterias marinas bentónicas como *Lyngbya majuscula* han sido ampliamente reconocidas por la producción de metabolitos que actúan como disuasores de la herbivoría (Nagle *et al.*, 1996; Nagle y Paul, 1998; Thacker *et al.*, 1997; Capper *et al.*, 2006 a; Cruz-Rivera y Paul, 2007; Capper y Paul, 2008; Matthew *et al.*, 2010). Sin embargo, se conoce poco sobre la actividad disuasoria del consumo por parte de otras especies de cianobacterias responsables de afloramientos.

Con estos antecedentes, en este capítulo se buscó evaluar la actividad disuasoria del consumo de extractos de cianobacterias marinas para determinar si algunas especies de cianobacterias, presentes de manera abundante durante los afloramientos en el Caribe colombiano, pueden estar protegidas químicamente contra la herbivoría.

## 4.2. Ensayos para evaluar la disuasión de la alimentación

Los ensayos de disuasión de la alimentación permiten evaluar las preferencias alimentarias de diversos consumidores con base en dietas artificiales, a las cuales se les puede modificar su palatabilidad o constitución química de acuerdo con las necesidades del estudio (Hay *et al.*, 1994; Pennings *et al.*, 1996; Cruz-Rivera y Paul, 2007).

El principio de estos experimentos consiste en ofrecer a los diferentes herbívoros una fuente de alimento que sea atractiva para su consumo, tanto por su sabor y valor nutricional, e incluir o mezclar los extractos o compuestos que se quieran evaluar como disuasores del consumo, esto

con el objetivo de comparar el consumo por parte de los herbívoros de las dietas tratamiento (con los extractos o compuestos) y las dietas control (sin los extractos o compuestos) (Hay *et al.*, 1994). Por ejemplo, es posible cubrir con extractos o compuestos la superficie de un alga o pasto marino paladeable con el fin de evaluar su efecto disuasor frente al alga sin recubrimiento (Hay y Fenical, 1987). De igual manera es posible incluir los extractos o compuestos en dietas artificiales especiales para cada tipo de consumidor (Hay *et al.*, 1994; Pennings *et al.*, 1996; Cruz-Rivera y Paul, 2007). El posible efecto disuasor del consumo puede deberse a diferentes razones como por ejemplo un mal sabor, efectos fisiológicos negativos como irritación, baja digestibilidad o efectos tóxicos, o por un bajo contenido nutricional, entre otros (Hay *et al.*, 1994; Pennings *et al.*, 1996; Cruz-Rivera y Paul, 2007; Capper y Paul, 2008).

Para la elaboración de la dieta artificial para organismos marinos herbívoros, se prepara una mezcla basada en un alga paladeable seca (*Enteromorpha* o *Spirulina*), agua y agar como agente gelificante. A ésta se le pueden incorporar extractos, fracciones o compuestos puros en proporciones variables, previa resuspensión en un solvente volátil como acetona o etanol. Antes que la mezcla se endurezca, se vierte en moldes de acrílico cuyo fondo está cubierto con anjeo plástico. El anjeo da mayor solidez a la dieta artificial y permite cuantificar fácilmente el consumo por parte de los consumidores durante el tiempo de duración del ensayo. Para los controles, solo se añade solvente a la matriz de agar (Hay *et al.*, 1994).

Para evaluar el posible papel ecológico en la disuasión de la herbivoría de las cianobacterias marinas bentónicas, se seleccionaron ocho muestras de diferentes cianobacterias seleccionadas teniendo en cuenta su abundancia en los afloramientos, la cantidad de extracto disponible de manera que éste fuese suficiente para la realización de los experimentos y la toxicidad determinada como  $CL_{50}$  (concentración letal media) obtenida en el ensayo con *Artemia salina*. A partir de los extractos crudos se prepararon dietas artificiales para evaluarlas contra potenciales consumidores. Los extractos se seleccionaron con base en su toxicidad contra *Artemia salina*, su abundancia local y la cantidad de extracto disponible. Los extractos evaluados aparecen en la Tabla 4.1.

Para este estudio se realizó el experimento de disuasión de la herbivoría con el gastrópodo opistobranquio *Bursatella leachii*, el erizo de mar *Lytechinus variegatus* y el pez herbívoro arrecifal *Stegastes planifrons*. Cada dieta artificial se diseñó de acuerdo con las características de cada una de las organismos utilizados en los ensayos, incorporando extractos de cianobacterias en concentraciones naturales, de acuerdo con los métodos propuestos por Hay *et al.*, (1998); Nagle y Paul, (1998) y Cruz-Rivera y Paul (2007). Las dietas con extractos fueron ofrecidas a los herbívoros junto con la dieta control sin extracto. Una vez cada herbívoro consumió un poco más del 50 % de una de las dos dietas (tratamiento o control), se detuvo el experimento y se procedió a cuantificar el consumo de cada una de ellas. Finalmente se comparó el consumo de la dieta control con el consumo de la dieta que contenía el extracto. Las diferencias de consumo entre las dietas tratamiento y control se evaluaron mediante pruebas de t pareadas empleando el programa Statgraphics Plus 5.0.

**Tabla 4.1.** Descripción de las muestras de cianobacterias bentónicas arrecifales utilizadas en los ensayos con el fin de evaluar su papel ecológico contra potenciales consumidores.

Número de muestra	Especies identificadas en la muestra *	Extracto disponible (g)	Abundancia local	CL <sub>50</sub> (ppm) 24 h contra <i>Artemia salina</i>
8	<i>Lyngbya majuscula</i> y <i>L. sordida</i>	4,5	Ocasional	400
9	<i>Oscillatoria nigroviridis</i>	4,6	Ocasional	5
11	<i>Lyngbya</i> spp. y <i>Oscillatoria margaritifera</i>	5,8	Muy frecuente	274
32	<i>Symploca hydroides</i> y <i>Phormidium submenbranaceum</i>	5,1	Muy frecuente	130
36	<i>Lyngbya</i> spp. ( <i>Lyngbya</i> sp., <i>L. cf confervoides</i> y <i>L. cf majuscula</i> )	3,8	Muy frecuente	>1000
38	<i>Lyngbya</i> spp. <i>Oscillatoria</i> spp. ( <i>L. cf semiplena</i> , <i>L. cf majuscula</i> ) ( <i>O. nigroviridis</i> , <i>O. margaritifera</i> )	1,8	Muy frecuente	60
42	<i>Oscillatoria acuminata</i> y <i>Spirulina</i> sp.	2,1	Frecuente	>1000
43	<i>Lyngbya majuscula</i> y <i>L. sordida</i>	1,1	Ocasional	127

(\*) Determinación taxonómica morfométrica tradicional siguiendo la clave de Komarek y Anagnostidis (2005), previamente presentada en el Capítulo 2.

#### 4.2.1. Ensayo de disuasión del consumo con el gastrópodo *Opisthobranchio Bursatella leachii* (Blainville, 1817)

Los moluscos opisthobranchios se caracterizan por tener una concha reducida o ausente que se ha correlacionado con la adquisición de defensas químicas provenientes de la dieta o sintetizadas *de novo* (Faulkner, 1992). Algunos opisthobranchios marinos pueden encontrarse frecuentemente en asociación con afloramientos de algas o cianobacterias (Capper y Paul, 2008) llegando incluso a “secuestrar” compuestos derivados la dieta para su defensa incorporándolos en el manto o la glándula digestiva (resumido en Capper *et al.*, 2006c). La incorporación de dichos compuestos puede cumplir funciones defensivas ante posibles depredadores (Paul y Pennings, 1991; Ginsburg y Paul, 2001), pero no siempre parece ser óptima para propósitos defensivos y podría en algunos casos ser el resultado de mecanismos de degradación o detoxificación (resumido en Capper *et al.*, 2006c; Capper *et al.*, 2008). La asociación de algunos opisthobranchios a tapetes de cianobacterias marinas defendidas químicamente, les confiere claramente a dichos moluscos un refugio ante la depredación y al mismo tiempo una fuente de alimento (Cruz-Rivera y Paul, 2000).



*Bursatella leachii* (Figura 4.1) es un herbívoro generalista que consume cianobacterias bentónicas y macroalgas (Paige, 1988; Ramos *et al.*, 1995). Las larvas de esta especie se asientan preferiblemente sobre tapetes de *Lyngbya majuscula* (Switzer-Dunlap y Hadfield, 1977). Este gastrópodo es considerado generalista porque si bien puede consumir y crecer bien sobre tapetes de la cianobacteria *Lyngbya majuscula*, tiene un amplio espectro de dietas (Paige, 1988; Ramos *et al.*, 1995). Adicionalmente esta especie no parece tener las capacidades fisiológicas para detoxificar o almacenar algunos compuestos activos de *L. majuscula* (Capper *et al.*, 2005).

*Bursatella leachii* se caracteriza por presentar un cuerpo cubierto con numerosas papilas ramificadas y alargadas que le permiten camuflarse entre las algas. El cuerpo tiene coloración variable con líneas y manchas oscuras (Masterson, 2008 Consulta *on line*, 24 de febrero de 2012 [http://www.sms.si.edu/IRLspec/Bursatella\\_leachii.htm](http://www.sms.si.edu/IRLspec/Bursatella_leachii.htm)).

**Figura 4.1.** El opistobranquio *Bursatella leachii*. Se aprecian claramente los tentáculos orales y el par de rinóforos en la cabeza. También se observan las papilas alargadas y ramificadas a lo largo de todo su cuerpo, estructuras que le permiten esconderse y mimetizarse en sustratos cubiertos con algas. Longitud aproximada del animal: 12 cm.



#### 4.2.2. Ensayo de disuasión del consumo por parte de erizos *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816)

Los erizos son herbívoros de gran importancia en los ambientes bentónicos marinos al consumir cianobacterias, algas y pastos marinos (Carpenter, 1986). Por su gran variedad de dietas son considerados consumidores generalistas. Dependiendo de su densidad, los erizos pueden causar un gran impacto sobre los productores primarios bentónicos marinos como las algas (Maciá, 2000). En ocasiones pueden formar frentes con densidades de más de 600 individuos  $m^{-2}$  los cuales pueden acabar totalmente con cientos de metros de pastos marinos (Maciá, 2000) o consumir en su totalidad gigantescos bosques de kelp hasta dejar únicamente algas coralíneas (resumido en Tegner, 2001).

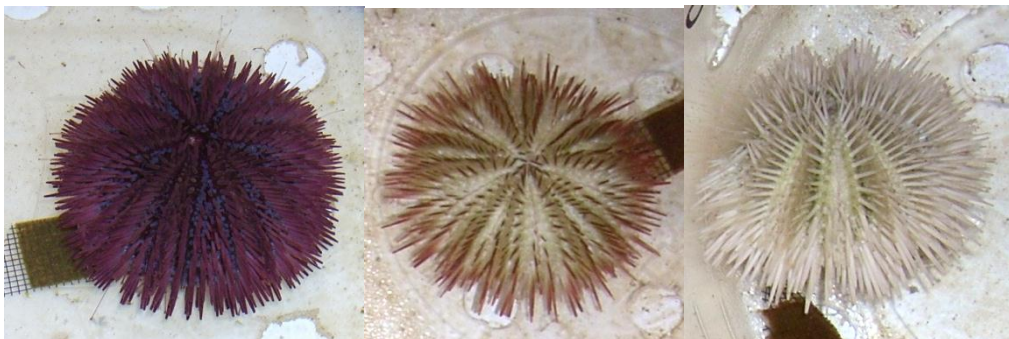
Los erizos tropicales *Lytechinus variegatus*, *Diadema* spp. y *Echinometra* spp., han sido utilizados como especies modelo en estudios de ecología química como consumidores generalistas para determinar si especies de algas o cianobacterias están o no protegidas químicamente contra la herbivoría (Nagle *et al.*, 1996; Capper *et al.*, 2006 b; Cruz-Rivera y Paul, 2007; Lima *et al.*, 2008, Bianco *et al.*, 2010; Matthew *et al.*, 2010).

El erizo verde o erizo jaspeado *Lytechinus variegatus* (Figura 4.2) es un herbívoro muy importante en términos de su capacidad de consumo y por ejercer un efecto en el control de las poblaciones de algas y cianobacterias marinas en el Atlántico occidental incluyendo el mar Caribe (Aguirre-Aguirre *et al.*, 2007). Este organismo presenta espinas cortas y abundantes, su coloración generalmente es blanca y verde sin embargo hay muchas variaciones y algunos individuos pueden tener colores rojos ó púrpura. La especie es comúnmente encontrada en las praderas de pastos marinos y fondos duros arrecifales (Gómez, 2002; Aguirre-Aguirre *et al.*, 2007). Esta especie también ha sido utilizada como controladora del *fouling* en cultivos de bivalvos en Venezuela reduciendo en más de un 70% la biomasa del *fouling* tanto en las redes de cultivo como sobre las conchas de las ostras perliíferas *Pinctada imbricata* (Lodeiros y García, 2004).

A pesar que *L. variegatus* ha demostrado tener un comportamiento generalista como herbívoro, este erizo parece presentar preferencias por ciertos tipos de alimento (Beddingfield y McClintock, 1998). Experimentos de disuasión de la herbivoría usando *L. variegatus* han demostrado que esta especie no consume macroalgas como *Caulerpa prolifera* y *Cymopolia barbata*, comportamiento asociado probablemente con la producción de los terpenos disuasores como la caulerpenina y cymopol por dichas macroalgas (McConnell *et al.*, 1982).

Las poblaciones de erizos son muy importantes al controlar las densidades de macroalgas en zonas arrecifales. La importancia de los erizos aumenta en zonas afectadas por la sobrepesca al asumir el papel de herbivoría que ejercían los peces (Hughes, 1994). Por esta razón es muy importante determinar si las especies de cianobacterias marinas presentes en los afloramientos del Caribe colombiano son consumidas por los erizos, o si por el contrario éstas se encuentran defendidas frente a estos potenciales consumidores.

**Figura 4.2.** Erizo verde *Lytechinus variegatus*. Es común hayan variaciones en el color de los diferentes individuos. Los individuos utilizados en el estudio tenían de 7 a 12 cm de diámetro.



### 4.2.3. Ensayo de disuasión del consumo por peces herbívoros arrecifales *Stegastes planifrons* (Cuvier, 1830)

Los peces herbívoros constituyen un grupo muy importante en los arrecifes coralinos ya que controlan la abundancia de algas y cianobacterias mediante el pastoreo y su efecto es de vital importancia para el mantenimiento de estos ecosistemas. La disminución en las poblaciones de peces herbívoros arrecifales ha llevado a cambios de fase donde las algas comienzan a reemplazar y crecer sobre los corales (Hay, 1991; Hughes *et al.*, 2003; Hughes *et al.*, 2007).

Los peces de la familia Pomacentridae, conocidos con el nombre vernacular de damiselas, son herbívoros importantes en los arrecifes del Caribe. La damisela de tres puntos, *Stegastes planifrons* (Figura 4.3), es una de las especies de herbívoros marinos más conspicua, común y abundante en zonas arrecifales del Caribe colombiano, como las Islas del Rosario, el Parque Tayrona y San Andrés y Providencia (Santodomingo *et al.*, 2002). Estos peces instalan un territorio donde selectivamente remueven algas indeseables y permiten el crecimiento de otras que usan como alimento. Las damiselas son peces sumamente territoriales y defienden intensamente su territorio frente a otros peces herbívoros como loros (Scaridae) y cirujanos (Acanthuridae) e incluso contra individuos de su misma especie (Santodomingo *et al.*, 2002).

*Stegastes planifrons* (Figura 4.3) alcanza una talla máxima de unos 13 cm. Los adultos se caracterizan por presentar una coloración entre café y gris con líneas verticales oscuras, con una gran mancha negra que cubre la base de las aletas pectorales y una región oscura en la parte superior dorsal (Tomado de <http://www.fishbase.org/summary/Stegastes-planifrons.html>).

**Figura 4.3.** Fotografía submarina de *Stegastes planifrons* (en el centro), Islas del Rosario. El pez se encuentra nadando sobre una de las tiras de dietas artificiales usadas en los experimentos de disuasión de la alimentación. Longitud aproximada: 10 cm.



Dado que *S. planifrons* es un herbívoro generalista abundante en el Caribe colombiano, es un organismo ecológicamente relevante para evaluar el efecto disuasor del consumo por parte de extractos de las cianobacterias. Por esta razón, en este trabajo se decidió realizar experimentos de disuasión del consumo utilizando *Stegastes planifrons* como un herbívoro modelo.

### 4.3. Metodología

#### 4.3.1. Ensayo de disuasión del consumo con el gastrópodo Opistobranquio *Bursatella leachii* (Blainville, 1817)

Los ensayos de disuasión de la alimentación con el opistobranquio *Bursatella leachii* se realizaron en las instalaciones del acuario Mundo Marino en el Rodadero (Santa Marta, Magdalena) durante febrero de 2011. Los individuos fueron recolectados en litorales rocosos en zonas alledañas entre el Rodadero y Santa Marta y fueron mantenidos en las instalaciones del acuario 10 días antes de la realización de los experimentos.

Los experimentos fueron realizados ubicando a cada individuo de *B. leachii* en un recipiente plástico por separado, con aireación individual. Los recipientes fueron dispuestos a su vez dentro de un tanque grande de unos 10.000 litros con agua de mar en flujo constante, con el fin de evitar los cambios de temperatura que se pueden dar en volúmenes más pequeños.

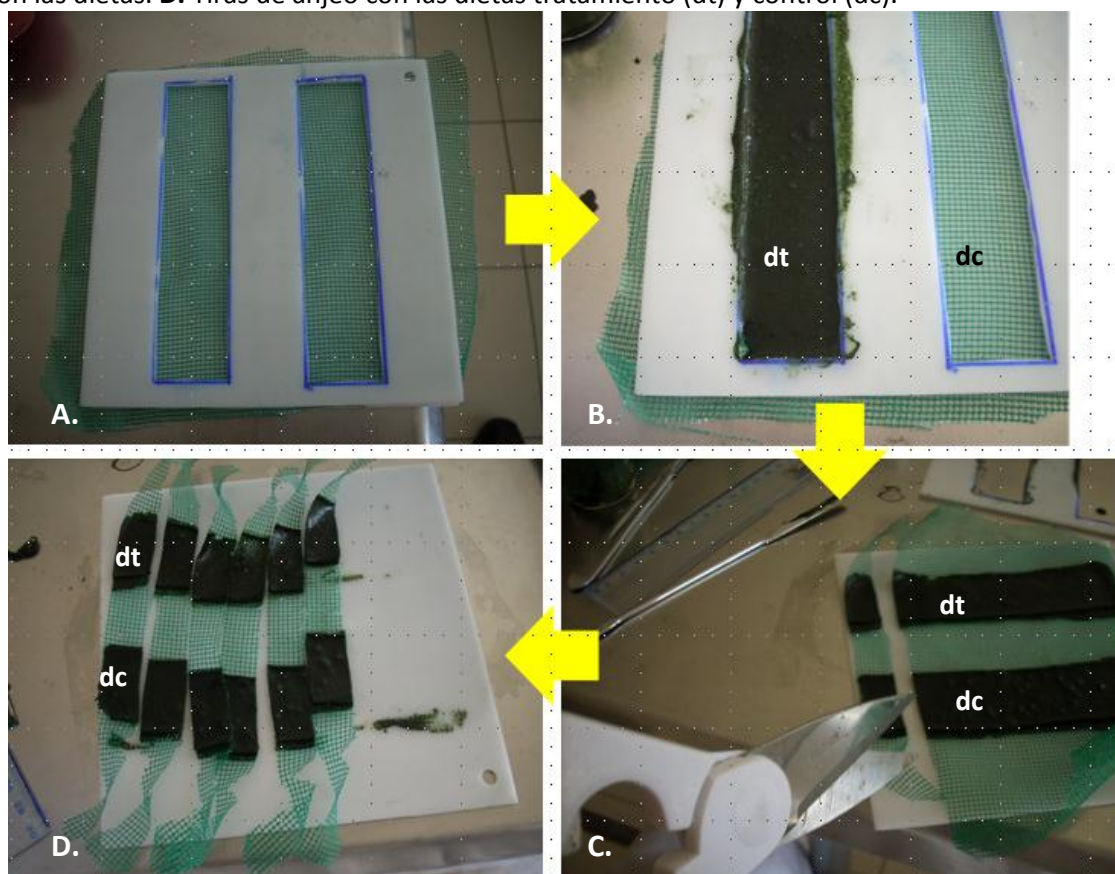
Se ensayaron cinco extractos de cianobacterias marinas mezclados en dietas artificiales con el fin de evaluar sus propiedades disuasorias frente a un herbívoro que ocasionalmente se alimenta de cianobacterias. Las dietas se prepararon según lo propuesto por Hay *et al.* (1998). Brevemente, cada dieta se preparó mezclando 0,9 g de la cianobacteria *Spirulina* liofilizada y pulverizada (como base de la dieta y estimulante de alimentación), 0,17 g de agar (agente gelificante de la dieta), 60 mg del extracto orgánico a evaluar y 12 ml de agua.

Los extractos se evaluaron a su concentración natural. Ésta fue calculada basada en los rendimientos previos de las extracciones, es decir, de la cantidad de extracto (en peso seco) obtenida a partir de una cantidad dada de biomasa seca. De esta manera, se calculó que la concentración natural de extracto (en peso seco) obtenido a partir de las cianobacterias era cercana al 6%. Por esta razón esa fue la concentración de extracto que se utilizó en la preparación de las dietas.

Cada extracto fue resuspendido utilizando cantidades mínimas de etanol al 96% y acetona. El extracto fue posteriormente incorporado a la *Spirulina* en polvo mezclando vigorosamente para garantizar la homogeneidad en la incorporación del extracto. Luego que los solventes se evaporaron en su totalidad, la *Spirulina* con el extracto fueron mezclados con una solución de agar en agua caliente sin sobrepasar los 60°C. Los controles se prepararon de la misma manera incluyendo la adición de los solventes, pero sin agregar extractos. Las dietas fueron vertidas en moldes de acrílico con aberturas de 13x2 cm, cuyo fondo estaba recubierto con anjeo plástico. Una vez la dieta artificial se solidificó, se retiró el molde y se cortaron tiras de anjeo de dos

rectángulos de manera que en un rectángulo se tenía la dieta tratamiento y en el otro la dieta control para ser ofrecidas al tiempo a los moluscos. Cada rectángulo con el tipo de dieta medía aproximadamente 1,5 x 2 cm (Figura 4.4).

**Figura 4.4.** Preparación de las dietas artificiales para el ensayos de disuasión de la alimentación con el gasterópodo *Bursatella leachii*. **A.** Molde de acrílico con anejo plástico debajo. **B.** Vertimiento de la dieta tratamiento (dt) en el molde. **C.** Retirado el molde se cortaron las tiras con las dietas. **D.** Tiras de anejo con las dietas tratamiento (dt) y control (dc).



Para el ensayo se ubicó un ejemplar de *Bursatella leachii* por recipiente y para cada extracto evaluado se usaron seis individuos de *B. leachii* (Figura 4.5). Las tiras de anejo con la dieta tratamiento y la dieta control fueron ofrecidas a los moluscos que estaban en cada uno de los recipientes (Figura 4.6).

Se realizaron observaciones durante 12 horas para evaluar el consumo de las dos dietas. Después de ese tiempo las dietas comenzaron a descomponerse y fueron retiradas. El experimento se consideró terminado cuando el organismo consumió más del 50 % de una de las dos dietas, tratamiento o control (Nagle y Paul, 1998). La temperatura de los tanques durante el experimento estuvo entre 29-31°C y la salinidad fue de 30 g/L.

**Figura 4.5.** Montaje del Ensayo de disuasión de la alimentación con el molusco *Bursatella leachii*. Disposición de los recipientes individuales dentro del tanque con agua de mar. Cada recipiente tenía un animal y contaba con aireación individual. (Instalaciones de Mundo Marino, El Rodadero).



**Figura 4.6.** Ensayos de disuasión de la alimentación con el opistobranquio *Bursatella leachii*. Se aprecia el consumo de más del 50% de la dieta control (izquierda), denotando preferencia por esta dieta sin incorporación de extracto.



El consumo por parte de los opistobranquios se evaluó contando el número de cuadros de cada dieta (sobre el anejo plástico) que fueron removidos por el animal, tanto en las dietas tratamiento como en la dieta control (Figura 4.6).

Los individuos que no consumieron ninguna dieta o que consumieron menos del 50% de alguna de ellas, no se incluyeron en los análisis para evitar sesgos en los resultados de acuerdo a lo propuesto por Hay *et al.* (1998); Nagle y Paul (1998) y Cruz-Rivera y Paul (2007). Para determinar si existieron diferencias significativas entre el consumo de dietas tratamiento y control, se emplearon pruebas t-pareadas usando el programa Statgraphics Plus 5.0.

#### **4.3.2. Ensayo de disuasión del consumo por parte de erizos *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816)**

Los ensayos de disuasión del consumo con erizos *Lytechinus variegatus* fueron realizados entre el 21 y 18 de agosto de 2011 en las instalaciones de la Estación Marina del Instituto Smithsonian en Fort Pierce, Florida EEUU (SMS Smithsonian Marine Station at Fort Pierce).

En los meses previos al experimento, los erizos fueron recolectados y mantenidos en los laboratorios de la estación marina por el investigador Jonathan Craft. Una buena cantidad de erizos *L. variegatus* estuvo disponible para la realización de los experimentos. Se utilizó un total de 75 erizos en los ensayos de disuasión de la alimentación.

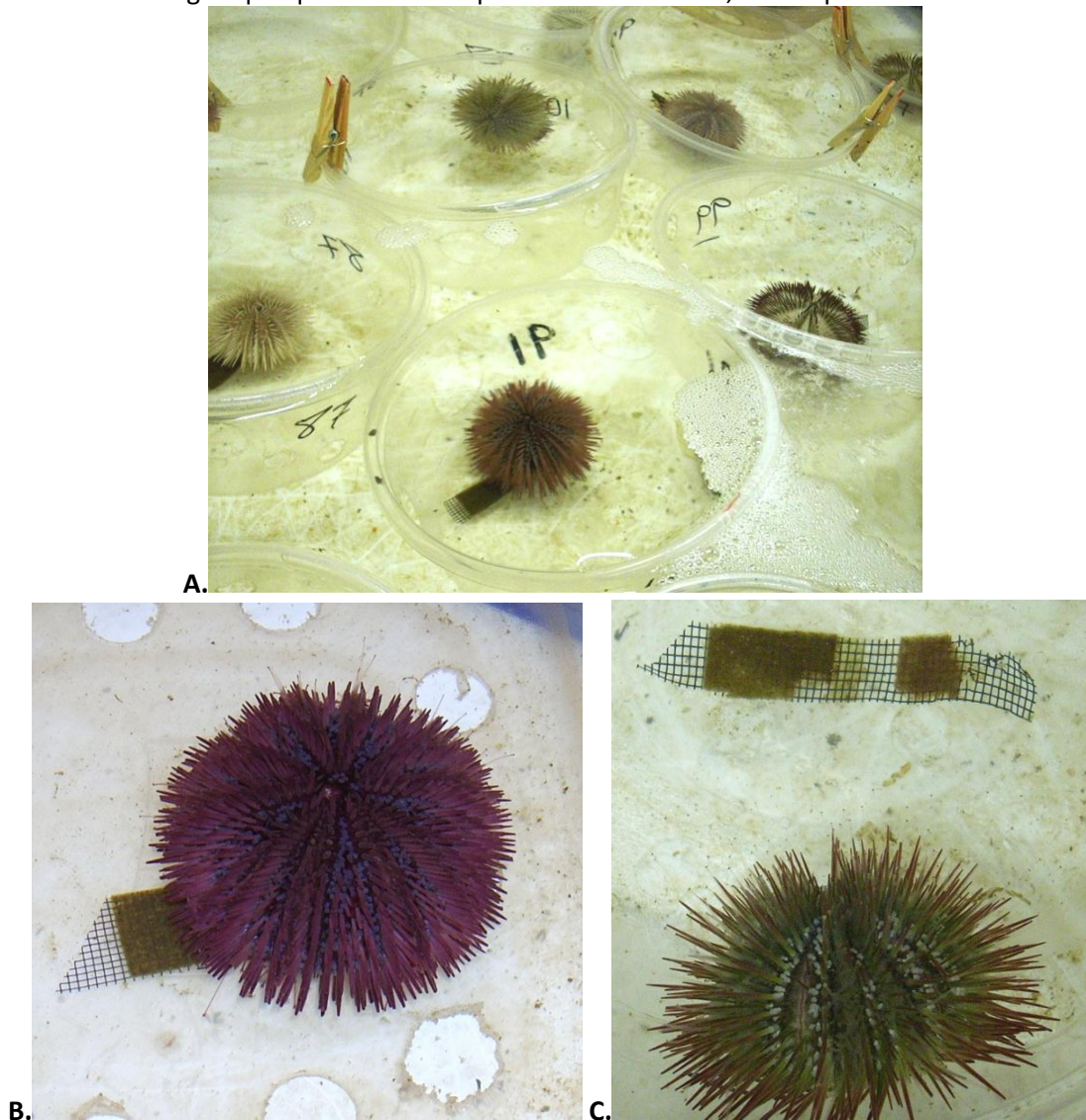
Las dietas artificiales se prepararon de la misma manera como se indicó en el ensayo realizado con el opistobranquio *Bursatella leachii*, siguiendo lo establecido por Hay *et al.* (1998). De igual manera se utilizó la concentración natural de extracto en relación a lo calculado según los rendimientos de las extracciones de las muestras, a partir del peso seco de las mismas (cercasas al 6%). Para el caso de los erizos no se utilizó *Spirulina* liofilizada y pulverizada como agente estimulante de la alimentación, sino 0,9 g del alga roja *Gracilaria* sp. liofilizada y pulverizada, debido a que en ensayos previos se determinó que esta alga era bastante aceptada y atractiva para el consumo por parte de los erizos. Los controles se prepararon de la misma manera usando *Gracilaria* sp. sin añadir extractos orgánicos.

En total se evaluaron siete extractos (8, 9, 11, 32, 36, 42 y 43), esto fue posible debido a la suficiente disponibilidad de erizos para la realización del experimento. Los extractos fueron seleccionados teniendo en cuenta la abundancia de los tapetes durante los afloramientos, la toxicidad de los extractos frente a *Artemia salina* y la disponibilidad del extracto de manera que su cantidad fuese suficiente para la realización del experimento. Para ensayar cada extracto, se utilizaron 15 erizos (15 réplicas). Los erizos fueron dispuestos en recipientes plásticos individuales con perforaciones que permitían el flujo de agua (Figura 4.7.). Los recipientes individuales estaban sumergidos en tanques grandes con agua de mar circulante y aireación constante. La temperatura del agua estuvo entre 29 y 31°C y la salinidad se mantuvo en 30 g/L.

Se tuvo especial cuidado en ubicar los erizos justo en el medio de la tira de anejo con las dos dietas (control o tratamiento), para no influir en su elección. Los erizos se dejaron alimentar por periodos de 2,5 horas en promedio. Las diferencias en el consumo se comenzaron a observar 30

minutos después de iniciar el experimento. Los erizos que no consumieron más del 50% de una de las dietas no fueron tomados en cuenta para los análisis, con el fin de evitar sesgos en los resultados (Hay *et al.*, 1998; Nagle y Paul, 1998 y Cruz-Rivera y Paul, 2007). El consumo por parte de los erizos se valoró contando el número de cuadros de cada dieta que fueron consumidos por el animal, tanto en las dietas tratamiento como control. Para determinar si existieron diferencias significativas entre tratamientos y controles se emplearon pruebas t-pareadas usando el programa Statgraphics Plus 5.0.

**Figura 4.7.** Ensayo de disuasión del consumo por el erizo *Lytechinus variegatus*. **A.** Erizos en recipientes individuales con agua de mar bajo flujo constante. **B.** Erizo alimentándose. **C.** Aspecto de una tira de comida después del consumo selectivo por parte de un erizo, se pueden observar los cuadros del angeo que quedan visibles posterior al consumo, lo cual permite cuantificarlo.





### 4.3.3. Ensayo de disuasión del consumo por peces herbívoros arrecifales *Stegastes planifrons* (Cuvier, 1830)

Los ensayos de disuasión del consumo de dietas artificiales con extractos de cianobacterias contra los peces *Stegastes planifrons* fueron realizados en los arrecifes alrededor de la Isla San Martín de Pajarales, Archipiélago de las Islas del Rosario durante septiembre de 2011. Estos experimentos fueron realizados *in situ*, dado que la captura de los peces puede causar estrés en los mismos y conllevar a cambios en sus preferencias alimentarias. En este ensayo se probaron cinco extractos debido a la complejidad del experimento en campo. Los cinco extractos ensayados, fueron seleccionados teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las pruebas con erizos y con opistobranquios, la toxicidad frente a *Artemia salina*, la abundancia de los tapetes en los afloramientos y la cantidad de extracto disponible para poder elaborar las dietas artificiales.

La preparación de las dietas artificiales se llevó a cabo siguiendo la misma metodología utilizada en los ensayos de disuasión del consumo con los opistobranquios *Bursatella leachii* y propuesta por Hay *et al.* (1998). Sin embargo, en vez de utilizar la cianobacteria *Spirulina* como base de la dieta y estimulante de alimentación, ésta se basó en alimento comercial macerado para peces herbívoros, ya que el mismo tuvo una muy buena aceptación por parte de los peces. Los otros ingredientes fueron los mismos y en la misma proporción a los empleados previamente en el numeral 4.3.2, 0,17 g de agar (agente gelificante de la dieta), 60 mg del extracto orgánico a evaluar y 12 ml de agua. El tamaño de las dietas artificiales para los peces fue mayor al utilizado para los erizos y los opistobranquios, esto, debido a que el tamaño de la porción ofrecida a los herbívoros debe ser proporcional al tamaño del organismo de ensayo. En este caso, cada dieta midió 2 x 2 cm sobre las tiras de anejo.

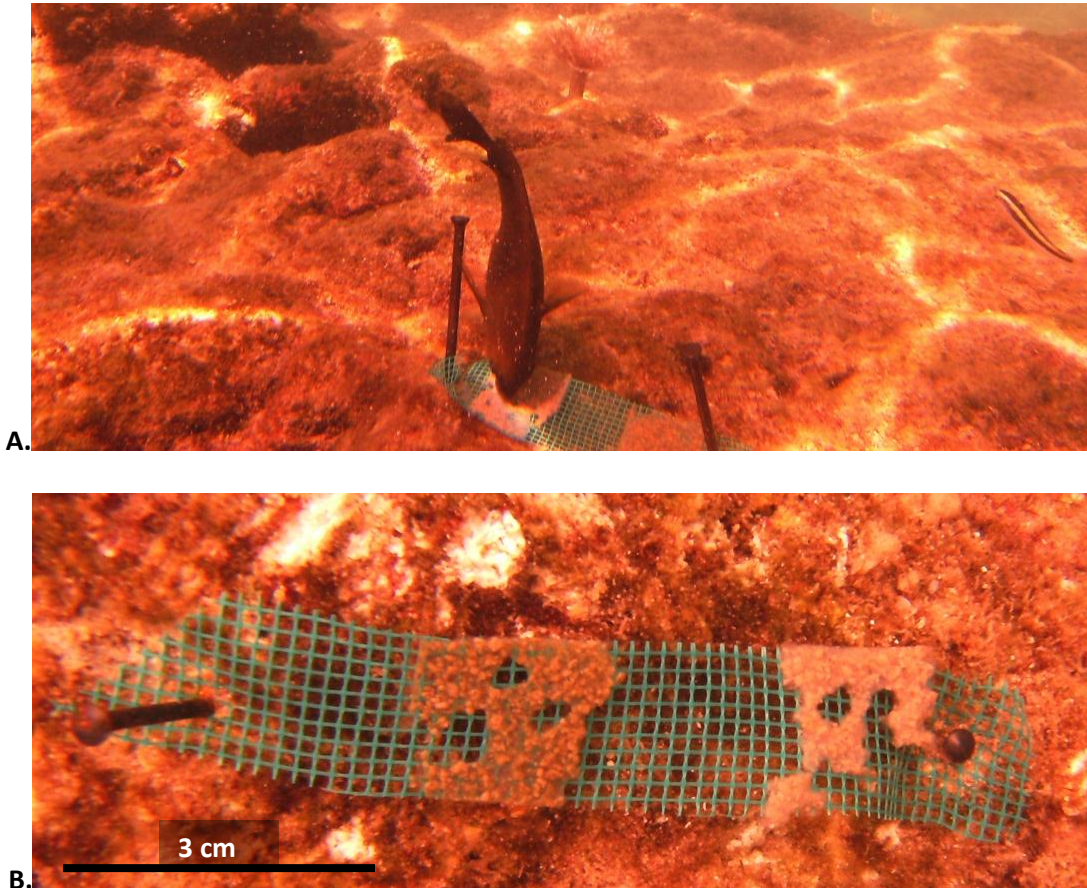
Para cada extracto se prepararon de 12 a 15 tiras de comida que fueron dispuestas dentro de los territorios de individuos de *S. planifrons*. Estos peces no se asustan con facilidad, al contrario, cubren un territorio de unos 50 cm de diámetro y lo defienden “atacando” incluso a los buzos con pequeños mordiscos de manera muy rápida (Obs. pers.).

Las tiras de alimento fueron transportadas al sitio del ensayo en cajas plásticas para evitar su desintegración. Posteriormente cada tira fue fijada al sustrato mediante clavos de acero, a profundidades entre 1 y 5 m.

Dentro de cada territorio, el consumo de las dietas experimentales por parte de cada individuo fue monitoreado constantemente hasta que consumieran un poco más del 50% de una de las dos dietas (tratamiento o control) (Figura 4.8). Posteriormente, la tira de anejo fue retirada y el consumo de cada una de las dietas cuantificado. El tiempo de consumo fue variable, los peces tardaron aproximadamente una hora en consumir la mitad de una de las dietas pero hubo casos en que en los primeros diez minutos ya se había consumido más del 50% de una de ellas debido tal vez a diferencias en la paladeabilidad de las dietas o grados de saciedad variables por parte de los peces. Los peces que no consumieron más del 50% de alguna de las dietas, no fueron tomados en cuenta para los análisis (Hay *et al.*, 1998; Nagle y Paul, 1998 y Cruz-Rivera y Paul, 2007).

Para determinar si existieron diferencias significativas entre el consumo de dietas tratamiento y control se emplearon pruebas t-pareadas usando el programa Statgraphics Plus 5.0.

**Figura 4.8.** Ensayos de disuasión de la alimentación con el pez damisela *Stegastes planifrons*. **A.** Consumo de la dieta artificial por parte de un individuo. **B.** Tira de anejo con dietas experimentales. Consumo preferencial de la dieta control (derecha) respecto a la dieta con extracto (izquierda). Se aprecian claramente los mordiscos sobre las dietas.

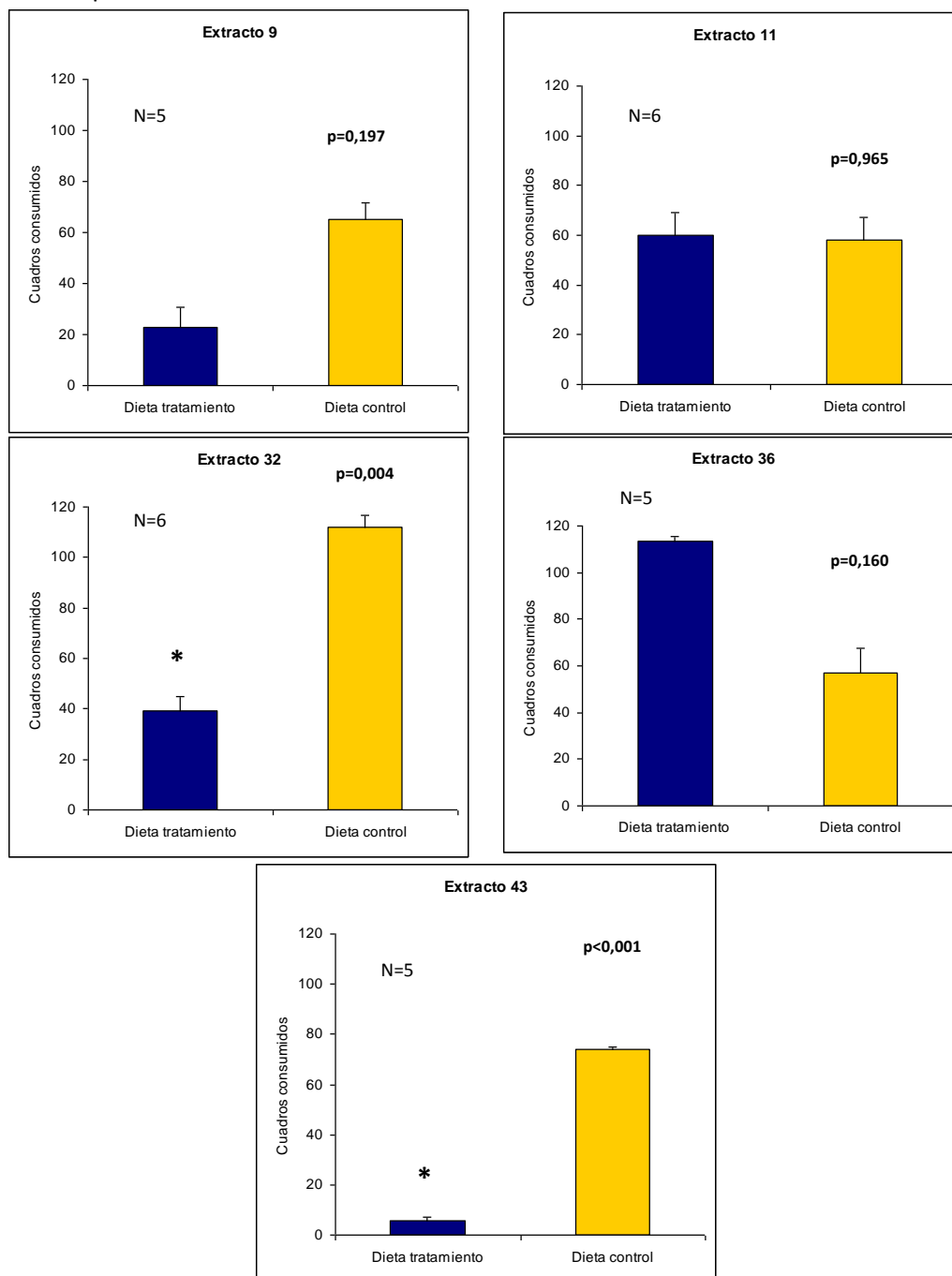


## 4.4. Resultados.

### 4.4.1. Ensayo de disuasión del consumo con el gastrópodo *Bursatella leachii* (Blainville, 1817)

Las dietas tratamiento con los extractos orgánicos 32y 43 presentaron un efecto disuasor del consumo muy claro, ya fueron consumidas en cantidades significativamente menores que los controles según los resultados de las pruebas t-pareadas. Los resultados de los ensayos y los valores calculados de p se muestran en la Figura 4.9.

**Figura 4.9.** Resultados de los ensayos de disuasión de la alimentación con el opistobranquio *Bursatella leachii*. Los gráficos muestran las diferencias en el consumo (número de cuadros consumidos  $\pm$  error estándar) entre las dietas tratamiento a las cuales se les incorporó extractos de cianobacterias (columnas azules) vs. las dietas control (sin extracto) (columnas amarillas). N= número de réplicas para cada ensayo. El asterisco (\*) indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en las pruebas t-pareadas.



En el ensayo con el opistobranquio *B. leachii* los tratamientos que contenían extractos de *Lyngbya* spp. (Extracto 43) de la isla de Providencia y de *Symploca hydroides* con *Phormidium submembranaceum* (Extracto 32) de la isla de Providencia, mostraron tener un claro efecto disuasor del consumo.

*Lyngbya majuscula* ha sido reconocida por producir extractos y compuestos disuasores de la herbivoría en diferentes experimentos en regiones tropicales (Paul y Pennings, 1991; Thacker *et al.*, 1997; Nagle y Paul, 1998; Cruz-Rivera y Paul, 2007).

En la literatura aún no se han reportado ensayos de disuasión de la herbivoría del extracto 32 (consorcio formado por *S. Hydroides* y *P. submembranaceum*), en este caso, este es el primer trabajo a nivel mundial, que aporta información respecto a las propiedades disuasoras de extractos obtenidos de tapetes algodonosos formados por *S. hydroides* y *P. submembranaceum*.

Adicionalmente, el presente experimento constituye la primera evidencia de posibles mecanismos de defensa química en ensamblajes de cianobacterias en el Caribe colombiano, lo cual al menos parcialmente, podría explicar la gran abundancia de este tipo de tapetes en la isla de Providencia.

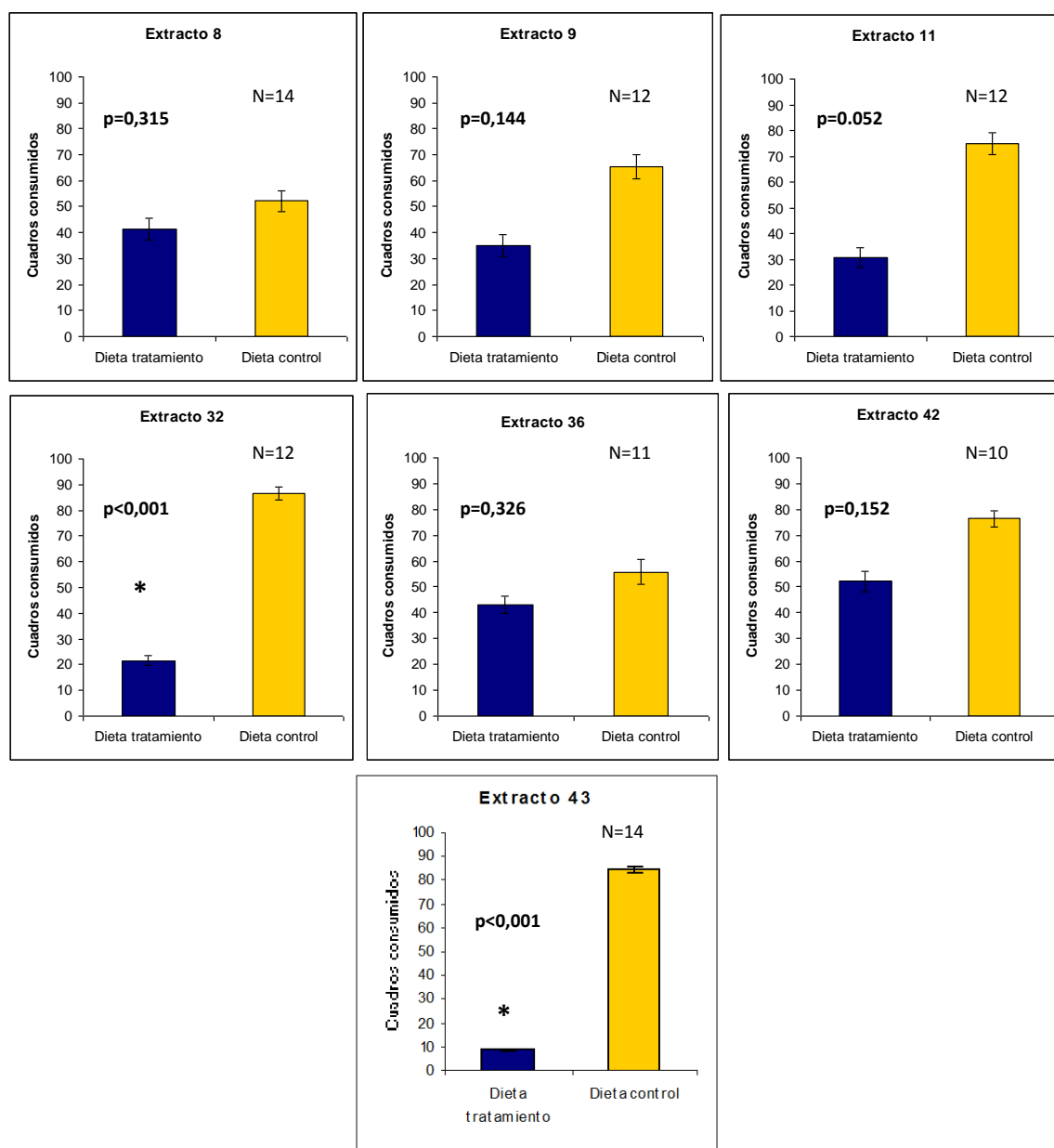
#### **4.4.2. Ensayo de disuasión del consumo por parte de erizos *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816)**

Después de ensayar siete dietas artificiales con diferentes extractos de cianobacterias marinas en concentraciones naturales, se encontró que solo dos de los siete extractos ensayados mostraron tener una actividad disuasoria significativamente mayor a la dieta control frente al consumo por parte de los erizos. Los resultados de los experimentos se presentan en la Figura 4.10.

Al igual que en el ensayo de disuasión frente al opistobranquio, los extractos 32 (*Symploca hydroides* y *Phormidium submembranaceum* de Providencia) y 43 (*Lyngbya majuscula* y *L. sordida* de Providencia) presentaron un efecto disuasor del consumo muy claro, mostrando diferencias significativas en el consumo entre los tratamientos y controles según se observa en los histogramas y se determinó a partir de las pruebas t-pareadas.

Los extractos de *Lyngbya majuscula* han mostrado un efecto disuasor de la herbivoría en varias ocasiones frente a diferentes herbívoros marinos (Paul y Pennings, 1991; Thacker *et al.*, 1997; Nagle y Paul, 1998; Cruz-Rivera y Paul, 2007). En este caso, los extractos de *Symploca hydroides* y *Phormidium submembranaceum* mostraron de nuevo un efecto disuasor del consumo, esta vez frente a erizos.

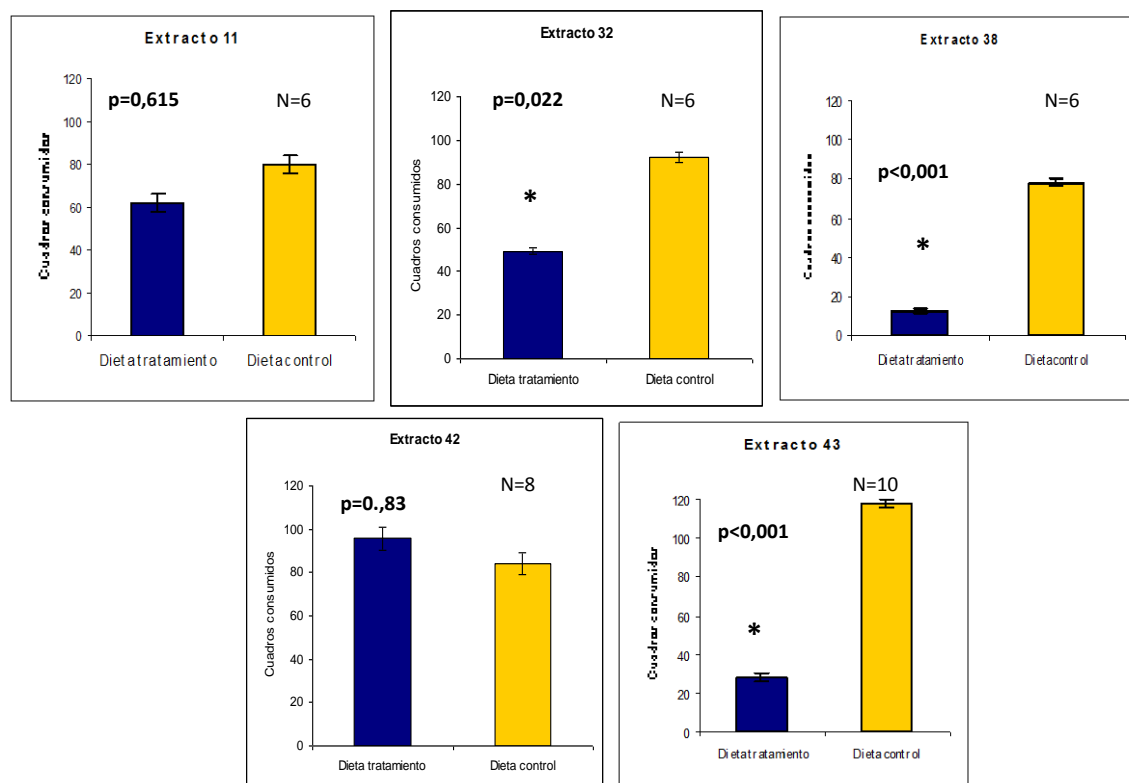
**Figura 4.10.** Resultados de los ensayos de disuasión de la alimentación con los erizos *Lytechinus variegatus*. Los gráficos muestran las diferencias en el consumo (número de cuadros consumidos  $\pm$  error estándar) entre las dietas tratamiento a las cuales se les incorporó extractos de cianobacterias (columnas azules) vs. las dietas control (sin extracto) (columnas amarillas). N= número de replicas para cada ensayo. El asterisco (\*) indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) determinadas mediante pruebas t pareadas.



#### 4.4.3. Ensayo de disuasión del consumo por peces herbívoros arrecifales *Stegastes planifrons* (Cuvier, 1830)

Se encontró que tres de los cinco extractos ensayados presentaron un efecto disuasor del consumo por parte de los peces. Los extractos 32 (*Symploca hydroides* y *Phormidium submembranaceum* de Providencia), 38 (*Lyngbya* spp. y *Oscillatoria* spp. de Providencia) y 43 (*Lyngbya majuscula* y *L. sordida* de Providencia) mostraron un consumo significativamente menor al de los controles ( $p < 0,05$ ) según las pruebas estadísticas de t pareada realizadas (Figura 4.11).

**Figura 4.11.** Resultados de los ensayos de disuasión de la alimentación con los peces damisela *Stegastes planifrons*. Los gráficos muestran las diferencias en el consumo (número de cuadros consumidos  $\pm$  error estándar) entre las dietas tratamiento a las cuales se les mezcló extractos de cianobacterias (columnas azules) vs. las dietas control (sin extracto) (columnas amarillas). N= número de réplicas para cada ensayo. El asterisco (\*) indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) mediante pruebas t pareadas.



#### 4.4.4. Resultados generales

Los resultados generales de los experimentos de disuasión del consumo por parte de los extractos de cianobacterias incluidos en dietas artificiales se pueden observar compilados en la Tabla 4.2.

**Tabla 4.2.** Efecto disuasor del consumo por el molusco por parte de extractos de cianobacterias frente a el opistobranquio *Bursatella leachii*, el erizo *Lytechinus variegatus* y el pez *Stegastes planifrons*.

Extracto Organismo	8	9	11	32	36	38	42	43
Moluscos	ne	-	-	+++	-	ne	ne	+++
Erizos	-	-	-	+++	-	ne	-	+++
Peces	ne	ne	-	+++	-	+++	-	+++

\* (-) No se observó un efecto disuasor (+++) Se encontró un claro efecto disuasor (ne) Extracto no ensayado por razones de cantidad disponible o logísticas.

En resumen, los resultados obtenidos mostraron que de ocho extractos ensayados sólo tres (extractos 32, 38 y 43) mostraron un efecto disuasor del consumo al menos frente a uno de los herbívoros empleados en las pruebas. Los extractos 32 y 43 presentaron un claro efecto disuasor del consumo que fue consistente para los tres tipos de herbívoros usados en los ensayos.

## 4.5. Discusión

Los resultados aquí presentados muestran un efecto disuasorio de algunas especies presentes en los afloramientos del Caribe colombiano sugiriendo que éstas estarían químicamente protegidas. De ser así, esto les daría a las cianobacterias una ventaja ecológica para su supervivencia, desarrollo a gran escala y permanencia en los arrecifes. Los peces y erizos son herbívoros de gran importancia en los arrecifes por su capacidad de afectar fuertemente las comunidades algales al consumir grandes cantidades de la biomasa disponible, controlando de esa manera la abundancia de sus poblaciones (resumido en Duffy y Hay, 1990). Por esta razón estos herbívoros fueron utilizados en los ensayos realizados en este trabajo. Los moluscos opistobranquios al consumir ocasionalmente cianobacterias también fueron incluidos en estos experimentos (Capper *et al.*, 2006a; Capper *et al.*, 2006b).

En los ensayos de disuasión de la alimentación con diferentes tipos de herbívoros, se encontró un patrón de actividad disuasoria bastante claro y común frente a los tres tipos de organismos utilizados. Los extractos 32 (*Symploca hydroides* y *Phormidium submembranaceum* de Providencia) y 43 (*Lyngbya majuscula* y *L. sordida* de Providencia) presentaron un efecto disuasorio del consumo notorio y significativo, frente a los opistobranquios *Bursatella leachii*, los erizos de mar *Lytechinus variegatus* y los peces *Stegastes planifrons*. Estos tres organismos invariablemente evitaron consumir dichas dietas artificiales y prefirieron consumir los controles. El extracto 38 (*Lyngbya* spp. y *Oscillatoria* spp. de Providencia) mostró tener efecto disuasorio del consumo frente a los peces. Éste fue ensayado únicamente frente a un tipo de herbívoro debido a la limitada cantidad disponible del extracto.

*Lyngbya majuscula* es una cianobacteria circuntropical y llama la atención que invariablemente sus extractos crudos, fracciones y compuestos presentan un efecto disuasorio frente al consumo por herbívoros como anfípodos, opistobranquios, erizos y peces herbívoros como los peces loro y los peces conejo (Paul y Pennings, 1991; Thacker *et al.*, 1997; Nagle y Paul, 1998; Capper *et al.*,

2006a; Cruz-Rivera y Paul, 2007). *Lyngbya majuscula* ha sido reconocida por la producción de compuestos que tienen un efecto disuasorio de la alimentación en anfípodos, opistobranquios, erizos y peces herbívoros, como por ejemplo la ypaoamida, las malyngamidas A y B, el malyngólido y el pitipeptólido A ; sin embargo, dichos resultados pueden ser reevaluados a la luz de los resultados obtenidos por Engene *et al.* (2012) donde se plantea que es posible que se haya confundido la especie *L. majuscula* con la recientemente descrita *Moorea producens*, debido a sus similitudes morfológicas (Thacker *et al.*, 1997; Nagle y Paul, 1998; Cruz-Rivera y Paul, 2007). En el presente trabajo se encontró que al igual que en otros reportes de disuasión de la herbivoría por cianobacterias vivas, extractos e incluso compuestos obtenidos de extractos de *Lyngbya majuscula*, los extractos evaluados, obtenidos a partir de tapetes compuestos por *L. majuscula* y *L. sordida* recolectados en Providencia (extracto 43) en el Caribe colombiano, presentaron también un marcado efecto disuasorio del consumo frente a los herbívoros aquí ensayados. Es probable que el contenido y cantidad de los metabolitos que causen el efecto disuasorio en los diferentes extractos de los tapetes de *Lyngbya* spp. ensayados, no sea el mismo. Ya se ha demostrado que la composición química de tapetes de cianobacterias de la misma especie que crecen en distintos sitios, incluso dentro del área de una misma región, puede ser y frecuentemente es diferente entre sí (Nagle y Paul, 1999; Sharp *et al.*, 2009). A pesar de dichas variaciones, el efecto disuasorio de nueve de diez diferentes quimiotipos de tapetes de *Lyngbya majuscula* recolectados en la isla de Guam, demostraron tener un fuerte efecto disuasor de la herbivoría contra el pez loro *Scarus schlegeli* (Nagle y Paul, 1999).

El efecto disuasorio del consumo por parte de *Lyngbya majuscula* ha sido ampliamente reconocido (Paul y Pennings, 1991; Thacker *et al.*, 1997; Nagle y Paul, 1998; Cruz-Rivera y Paul, 2007). Sin embargo, son muy pocos los estudios donde se reporte ese efecto disuasorio por parte de otras especies de cianobacterias marinas bentónicas. Tal vez el único reporte de otra especie de cianobacterias protegida químicamente fue realizado por Pennings *et al.* (1997) con *Hormothamnion enteromorphoides* recolectada en Guam.

En el presente trabajo se tuvo la posibilidad de ensayar extractos aislados de cianobacterias marinas de diferentes especies y se encontró que los tapetes de *Symploca hydroides* y *Phormidium submembranaceum* (extracto 32) también tuvieron una actividad disuasoria del consumo. Adicionalmente esta actividad fue común en los tres tipos de herbívoros utilizados en los experimentos. Esto resulta ser muy interesante y sugiere que dichos tapetes están protegidos químicamente contra la herbivoría por parte de herbívoros generalistas. Esto explicaría en parte la gran abundancia de estos tapetes de cianobacterias en algunas las zonas del Caribe (Providencia y las Islas del Rosario) donde eran muy conspicuos. En este caso es evidente como las defensas químicas contra la herbivoría pueden ser un factor importante para la formación de grandes tapetes y afloramientos especialmente en presencia de herbívoros (Nagle y Paul, 1999). De igual manera el efecto disuasorio del extracto 43 obtenido a partir de del consorcio conformado por *L. majuscula* y *L. sordida* podría explicar en parte las grandes coberturas que se observaron en las Islas del Rosario por tapetes conformados por dichas especies (Capítulo 3), teniendo en cuenta que las mismas, o al menos una de ellas, parece estar defendida químicamente, lo cual hace más difícil su control.

Otro factor importante en los procesos de herbivoría es la especialización de ciertos consumidores para alimentarse de organismos defendidos químicamente. Por ejemplo, algunos moluscos opistobranquios son capaces de tolerar algunos compuestos de cianobacterias que



disuadirían a otros herbívoros e incluso pueden ser estimulados a alimentarse de ellas una vez los detectan, lo cual los convierte en herbívoros especialistas (Capper y Paul, 2008). Esto les permite aprovechar ese recurso transitorio de alimento que no es aprovechado por otros consumidores. *Bursatella leachii* y *Stylocheilus striatus* pueden consumir cantidades variables de cianobacterias defendidas químicamente como *Lyngbya majuscula*, dependiendo de su historia dietaria (Capper *et al.*, 2006a; Capper *et al.*, 2006b). Ambas especies consumen mayores cantidades de biomasa de cianobacterias cuando ya están acostumbradas a ellas (consumidores recolectados de sitios donde se dan los afloramientos de *L. majuscula*) comparados con individuos recolectados de sitios sin afloramientos (Capper *et al.*, 2006a; Capper *et al.*, 2006b). De esta manera las especies o cepas de cianobacterias que están más defendidas químicamente contra el consumo, persistirán en zonas con alta herbivoría como los arrecifes de coral (Capper *et al.*, 2006b).

Estudios diversos han demostrado que el factor más importante en controlar las poblaciones de algas en zonas arrecifales es la herbivoría y que su efecto en la magnitud de los cambios de fase es incluso más fuerte que la eutrofización, especialmente en el Caribe (Burkepile y Hay, 2006). De esta manera las especies de cianobacterias protegidas químicamente contra la herbivoría podrían crecer sin control y causar grandes problemas ecológicos y ambientales en los arrecifes, favorecidas por factores como el calentamiento global y el aumento en el aporte de nutrientes a los cuerpos de agua (Paerl y Paul, 2012).

Además de no ser consumidas por los herbívoros, las cianobacterias protegidas químicamente podrían verse favorecidas por las actividades de búsqueda y consumo selectivo por parte de peces herbívoros y erizos sobre macroalgas paladeables, removiendo así potenciales competidores de las cianobacterias y favoreciendo su establecimiento y expansión en las zonas arrecifales (Paerl y Paul, 2012).

Los herbívoros más importantes en las zonas tropicales en cuanto a su consumo y efectos sobre las comunidades algales son los peces y los erizos (Duffy y Hay, 1990). Si algunas especies de cianobacterias como las presentes en los tapetes 32, 43 y 38, disuaden el consumo por peces y erizos como se observó a partir de las especies evaluadas en este trabajo, podrían volverse cada vez más abundantes y persistentes en las zonas arrecifales, sin poder ser controladas por el efecto *top down* de la herbivoría. Esto puede convertir a dichas especies en riesgos potenciales para los arrecifes de coral (Hughes *et al.*, 2003; Paul, *et al.*, 2005; Hughes *et al.*, 2007).

Además de constituir un riesgo directo para los arrecifes de coral y de esta manera un problema indirecto para el hombre, el aumento, dominancia y persistencia de cianobacterias arrecifales puede constituir un alto riesgo para la salud humana en caso de que las especies de cianobacterias sean tóxicas (Ramos *et al.*, 2012).

Los resultados obtenidos en esta investigación permiten sugerir que algunas de las especies de cianobacterias presentes en los afloramientos en el Caribe colombiano se encuentran protegidas químicamente contra diferentes tipos de herbívoros. Adicionalmente se reporta por primera vez el efecto disuasorio del consumo por parte de extractos obtenidos de especies como *Symploca hydroides* y *Phormidium submembranaceum*. Esto constituye un aporte al conocimiento de la ecología química de las cianobacterias bentónicas ya que la mayoría de estos estudios han sido con *Lyngbya majuscula*. Teniendo en cuenta la importancia de la herbivoría sobre el estado y composición de los arrecifes, los resultados aquí obtenidos constituyen una valiosa información

para comprender dichos procesos y generar advertencias con el fin de plantear estrategias de manejo que permitan mitigar los efectos de los afloramientos de cianobacterias en zonas arrecifales del Caribe.

## 4.6. Bibliografía

- Aguirre-Aguirre A, Duque G, Gómez-López DI. 2007. Characterization of the epibenthic macroinvertebrates associated with the seagrass beds of *Thalassia testudinum* (Banks ex König, 1805) in La Guajira, Colombian Caribbean. 58th Gulf and Caribbean Fisheries Institute, 56-61.
- Beddingfield SD, McClintock JD. 1998. Differential survivorship, reproduction, growth and nutrient allocation in the regular echinoid *Lytechinus variegatus* (Lamarck) fed natural diets. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 226: 195–215.
- Bianco EM, Teixeira VL, Pereira, RC. 2010. Chemical defenses of the tropical marine seaweed *Canistrocarpus cervicornis* against herbivory by sea urchin. *Brazilian Journal of Oceanography*, 58(3):213-218.
- Burja A, Banaigs B, Abou-Mansour E, Burgess J, Wright P. 2001. Marine cyanobacteria - a prolific source of natural products. *Tetrahedron*, 57: 9347-9377.
- Burkepile DE, Hay ME. 2006. Herbivore versus nutrient control of marine primary producers: Context-dependent effects. *Ecology*, 87: 3128-3139.
- Capper A, Tibbets IR, O'Neil JM, Saw GR. 2005. The fate of *Lyngbya majuscula* toxins in three potential consumers. *Journal of Chemical Ecology*, 31(7): 1595-1604.
- Capper A, Tibbets IR, O'Neil JM, Shaw GR. 2006 a. Feeding preference and deterrence in rabbitfish *Siganus fuscescens* for the cyanobacterium *Lyngbya majuscula* in Moreton Bay, south-east Queensland, Australia. *Journal of Fish Biology*, 68: 1589-1609.
- Capper A, Cruz-Rivera E, Paul VJ, Tibbets IR. 2006 b. Chemical deterrence of a marine cyanobacterium against sympatric and non-sympatric consumers. *Hydrobiologia*, 553: 319-326.
- Capper A, Tibbets IR, O'Neil JM, Shaw GR. 2006 c. Dietary selectivity for the toxic cyanobacterium *Lyngbya majuscula* and resultant growth rates in two species of opisthobranch mollusc. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 331: 133-144.
- Capper A, Paul VJ. 2008. Grazer interactions with four species of *Lyngbya* in southeast Florida. *Harmful Algae*, 7: 717-728.
- Carpenter RC. 1986. Partitioning herbivory and its effects on coral reef algal communities. *Ecological Monographs*, 56(4): 345-363.

- Cruz-Rivera E, Paul VJ. 2000. Coral reef benthic cyanobacteria as food and refuge: Diversity, chemistry and complex interactions. Proceedings 9th International Coral Reef Symposium, Bali, Indonesia 23-27 October 2000, Vol. 1.
- Cruz-Rivera E, Paul VJ. 2007. Chemical deterrence of a cyanobacterial metabolites against generalized and specialized grazers. *Journal of Chemical Ecology*, 33: 213-217.
- Dobretsov S, Teplitski M, Paul VJ. 2009. Mini-review: quorum sensing in the marine environment and its relationship to biofouling. *Biofouling*, 25 (5): 413-427.
- Duffy JE, Hay ME. 1990. Seaweed adaptations to herbivory. *Bioscience*, 40:368-376.
- Engel S, Jensen PR, Fenical W. 2002. Chemical ecology of marine microbial defense. *Journal of Chemical Ecology*, 28(10): 1971-1985.
- Faulkner DJ. 1992. Chemical defenses in marine mollusks. 119-163 p. En Paul VJ (Ed). *Ecological Roles of Marine Natural Products*. Comstock Press. Ithaca, NY, 264 pp.
- Ginsburg DW, Paul VJ. 2001. Chemical defenses in the sea hare *Aplysia parvula*: importance of diet and sequestration of algal secondary metabolites. *Marine Ecology Progress Series*, 215: 261-274.
- Gómez A. 2002. Abundancia de erizo *Lytechinus variegatus* (Lamarck) en la costa norte, este y oeste de la isla de Margarita (Venezuela). *Acta Científica Venezolana*, 53(1): 15-20.
- Hay ME, Fenical W, Gustafson K. 1987. Chemical defense against diverse coral reef herbivores. *Ecology*, 8: 1581-1591.
- Hay ME, Fenical W. 1988. Marine plant-herbivore interactions: The ecology of chemical defense. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 19: 111-145.
- Hay ME. 1991. Marine-terrestrial contrasts in the ecology of plant chemical defenses against herbivores. *Trends in Ecology and Evolution*, 6: 362-365.
- Hay ME. 1992. The role of seaweed chemical defenses in the evolution of feeding specialization and in the mediation of complex interactions. 93-118 p. en Paul VJ (Ed.). *Ecological Roles for Marine Natural Products*. Comstock Press. Ithaca, NY, 264 pp.
- Hay ME, Steinberg PD. 1992. The chemical ecology of plant-herbivore interactions in marine versus terrestrial communities. 371-413 p. En, Rosenthal J, Berenbaum M. (Eds.), *Herbivores: Their Interaction with secondary metabolites, evolutionary and ecological processes*. Academic Press. San Diego, 493 pp.
- Hay ME, QE Kappel, Fenical W. 1994. Synergisms in plant defenses against herbivores: interactions of chemistry, calcification, and plant quality. *Ecology*, 75: 1714-1726.

- Hay ME, Stachowicz JJ, Cruz-Rivera E, Bullard S, Deal MS, Lindquist N. 1998. Bioassays with marine and freshwater macroorganisms. 39-141 p. En Haynes KF, Millar JG (Eds.). *Methods in Chemical Ecology*. Volume 2, Bioassay Methods. Chapman and Hall, New York, 406 pp.
- Hughes TP. 1994. Catastrophes, phase shifts, and large-scale degradation of a Caribbean coral reef. *Science*, 265(5178): 1547-1551.
- Hughes TP, Baird AH, Bellwood DR, Card M, Connolly SR, Folke C, Grosberg R, Hoegh-Guldberg O, Jackson JBC, Kleypas J, Lough JM, Marshall P, Nyström M, Palumbi SR, Pandolfi JM, Rosen B, Roughgarden J. 2003. Climate change, human impacts, and the resilience of coral reefs. *Science*, 301: 929-933.
- Hughes TP, Rodrigues MJ, Bellwood DR, Ceccarelli D, Hoegh-Guldberg O, McCook L, Moltschanowskyj N, Pratchett MS, Steneck RS, Willis B. 2007. Phase shifts, herbivory, and the resilience of coral reefs to climate change. *Current Biology*, 17: 360-365.
- INVEMAR. 2005. Informe del los ambientes marinos y costeros en Colombia: Año 2005. Serie de publicaciones periódicas, INVEMAR; No. 8. Santa Marta. 360 pp.
- Kuffner IB, Walters LJ, Becerro MA, Paul VJ, Ritson-Williams R, Beach KS. 2006. Inhibition of coral recruitment by macroalgae and cyanobacteria. *Marine Ecology Progress Series*, 323: 107-117.
- Lima LM de S, Alor R, Uriostegui R, Murray SN, Pereira RC. 2008. Within-plant variation in palatability and chemical defenses in the green seaweed *Avrainvillea elliotii*. *Botanica Marina*, 51: 21-25.
- Littler MM, Littler DS, Brooks BL. 2009. Herbivory, nutrients, stochastic events, and relative dominances of benthic indicator groups on coral reefs: a review and recommendations. *Smithsonian Contributions to the Marine Sciences*, 38: 401-414.
- Lodeiros C, García N. 2004. The use of sea urchins to control fouling during suspended culture of bivalves. *Aquaculture*, 231: 293-298.
- Maciá S. 2000. The effects of sea urchin grazing and drift algal blooms on a subtropical seagrass bed community. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 246: 53-67.
- Matthew S, Ratnayake R, Becerro MA, Ritson-Williams R, Paul VJ, Luesch H. 2010. Intramolecular Modulation of Serine Protease Inhibitor Activity in a Marine Cyanobacterium with Antifeedant Properties. *Marine Drugs*, 8: 1803-1816.
- McConnell OJ, Hughes PA, Targett NM, Daley J. 1982. Effects of secondary metabolites from marine algae on feeding by the sea urchin, *Lytechinus variegatus*. *Journal of Chemical Ecology*, 8: 1437-1453.
- McCook LJ, Jompa J, Díaz-Pulido G. 2001. Competition between corals and algae on coral reefs: A review of evidence and mechanisms. *Coral Reefs*, 19: 400-417.

- Mumby PJ, Steneck RS, Edwards AJ, Ferrari R, Coleman R, Harborne AR, Gibson PJ. 2012. Fishing down a Caribbean food web relaxes trophic cascades. *Marine Ecology Progress Series*, Vol. 445: 13–24.
- Nagle D, Paul VJ, Roberts M. 1996. Ypoamide, a new broadly acting feeding deterrent from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Tetrahedron Letters*, 37(35): 6263-6266
- Nagle D, Paul VJ. 1998. Chemical defense of a marine cyanobacterial bloom. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 225: 29-38.
- Nagle D, Paul VJ. 1999. Production of secondary metabolites by filamentous tropical marine Cyanobacteria: ecological functions of the compounds. *Journal of Phycology*, 35: 1412-1421.
- Paerl HW, Paul VJ. 2012. Climate change: Links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water Research*, 49(5): 1349-1363.
- Paige JA. 1988. Biology, metamorphosis and postlarval development of *Bursatella leachii plei* Rang (Gastropoda: Opisthobranchia). *Bulletin of Marine Science*, 42: 65-75
- Pandolfi JM, Bradbury RH, Sala E, Hughes TP, Bjorndal KA, Cooke RG, McArdle D, McClenachan L, Newman MJH, Paredes G, Warner RR, Jackson JBC. 2003. Global trajectories of the long-term decline of coral reef ecosystems. *Science*, 301: 955-958.
- Paul, V. J. and M. E. Hay. 1986. Seaweed susceptibility to herbivory: chemical and morphological correlates. *Marine Ecology Progress Series*, 33:255-264.
- Paul VJ, Pennings SC. 1991 Diet-derived chemical defenses in the sea hare *Stylocheilus longicauda* (Quoy et Gaimard, 1824). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 151:227-243.
- Paul VJ, Thacker R, Banks K, Golubic S. 2005. Benthic cyanobacterial blooms impact the reef of south Florida (Broward County, USA). *Coral Reefs*, 24: 693-697.
- Pennings, S. C., A. M. Weiss & V. J. Paul, 1996. Secondary metabolites of the cyanobacterium *Microcoleus lyngbyaceus* and the sea hare *Stylocheilus longicauda*: Palatability and toxicity. *Marine Biology*, 126: 735–743.
- Pennings S, Pablo SR, Paul VJ. 1997. Chemical defenses of the tropical, benthic marine cyanobacterium *Hormothamnion enteromorphoides*: Diverse consumers and synergisms. *Limnology and Oceanography*, 42(5): 911-917.
- Ramos LJ, Rocafort JLL, Miller MW. 1995. Behavior patterns of the Aplysiid gastropod *Bursatella leachii* in its natural habitat and in the laboratory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 63: 246-259.
- Sharp K, Arthur K, Gu L, Ross C, Harrison G, Gunasekera SP, Meickle T, Matthew S, Luesch H, Thacker R, Sherman D, Paul VJ. 2009. Phylogenetic and Chemical Diversity of Three Chemotypes of Bloom-Forming *Lyngbya* Species (Cyanobacteria: Oscillatoriales) from Reefs of Southeastern Florida. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(9): 2879-2888.

- Switzer-Dunlap M, Hadfield MG. 1977. Observations on development, larval growth and metamorphosis of four species of Aplysiidae (Gastropoda:Opisthobranchia) in laboratory culture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 29: 245-261.
- Santodomingo N, Rodríguez-Ramírez A, Garzón-Ferreira J. 2002. Territorios del pez *Stegastes planifrons* en formaciones coralinas del Parque Nacional Natural Tayrona, Caribe colombiano: un panorama general. *Boletín de investigaciones marinas y costeras*, 31: 65-84.
- Thacker R, Nagle D, Paul VJ. 1997. Effects of repeated exposures to marine cyanobacterial secondary metabolites on feeding by juvenile rabbitfish and parrotfish. *Marine Ecology Progress Series*, 147: 21-29.
- Tegner MJ. 2001. The ecology of *Strongylocentrotus franciscanus* and *Strongylocentrotus Purpuratus*. 307-331 p. En Lawrence JM (Ed.). *Edible Sea Urchins: Biology and Ecology*, Volume 32. Amsterdam, 419 pp.
- Valentine JF, Heck KL, Kirsch KD, Webb D. 2000. Role of sea urchin *Lytechinus variegatus* grazing in regulating subtropical turtlegrass *Thalassia testudinum* Meadows in the Florida Keys (USA). *Marine Ecology Progress Series*, 200: 213-228.

## **5. Capítulo 5. Evaluación del posible papel ecológico de las cianobacterias marinas bentónicas arrecifales: Interacciones alelopáticas con embriones de coral y corales adultos.**

### **5.1. Introducción**

Los arrecifes de coral constituyen uno de los ecosistemas más importantes, diversos y productivos en el planeta. Éstos proveen un gran número de bienes, servicios económicos y ecológicos a la sociedad y al medio ambiente como la protección a las zonas costeras de la erosión y de otros ecosistemas adyacentes como los pastos marinos y los manglares (Moberg y Folke, 1999; Hughes *et al.*, 2003; Ritson-Williams *et al.*, 2009), la producción de diferentes fuentes de alimento, hábitat para peces, moluscos y crustáceos de interés comercial como cangrejos, langostas, pulpos y caracoles (Jennings y Polunin, 1996; Birkeland, 1997; Mumby y Steneck, 2008).

A nivel global se ha incrementado considerablemente la degradación de los arrecifes de coral, (al menos desde donde tenemos registros del fenómeno, pues en realidad no se tiene una idea clara de lo que significa un paisaje pristino de los arrecifes de coral en la historia (Jackson, 1997), debido principalmente a impactos y actividades antrópicas, por lo cual existe una gran preocupación sobre la permanencia de dichos ecosistemas y las consecuencias de su degradación como la pérdida de bienes y servicios económicos, ecológicos y sociales que los arrecifes de coral proporcionan (Pandolfi *et al.*, 2003; Hughes *et al.*, 2007; Birrell *et al.*, 2008).

La resiliencia o capacidad de resistir y recuperarse de los fenómenos negativos que afectan a los arrecifes de coral, juega un papel esencial para su persistencia. La recuperación después de cada disturbio implica el reestablecimiento de la cobertura coralina, el crecimiento de los fragmentos de coral supervivientes, el éxito reproductivo, el posterior asentamiento y supervivencia de los embriones de coral (Birrell *et al.*, 2008; Díaz-Pulido *et al.*, 2010).

El proceso de recuperación de los arrecifes de coral se dificulta porque en la actualidad éstos deben desarrollarse en medios donde frecuentemente dominan algas y cianobacterias, que colonizan eficientemente el sustrato tras disturbios y se vuelven dominantes en arrecifes degradados (Hughes, 1994; McCook *et al.*, 2001; Hughes *et al.*, 2007; Díaz-Pulido *et al.*, 2010). Estas condiciones reducen considerablemente la capacidad de recuperación de los arrecifes de coral (Hughes *et al.*, 2003; Hughes *et al.*, 2007). La dominancia algal puede convertirse en un serio

cuello de botella para el reestablecimiento coralino, dependiendo de las características de los ensamblajes algales dominantes en cada lugar (McCook *et al.*, 2001; Díaz-Pulido *et al.*, 2010).

La competencia, se constituye como un proceso que determina la estructura y composición de las comunidades en arrecifes de coral (Birkeland, 1997; Logan, 1984; López-Victoria *et al.*, 2006; Chaves-Fonnegra y Zea, 2010). En los arrecifes coralinos, la competencia entre organismos sésiles bentónicos como algas y corales, se ha vuelto incluso más importante para la resiliencia de los corales que los disturbios antropogénicos, debido sobretodo, a la dominancia de algas y cianobacterias en arrecifes afectados (McCook *et al.*, 2001). Del mismo modo se conoce que la competencia por el espacio limitado puede generar grandes impactos en la diversidad y composición de las comunidades arrecifales (Chadwick y Morrow, 2011).

Muchas de las interacciones entre organismos como la competencia, defensa contra patógenos o depredadores y la atracción de polinizadores o presas, entre otras, son mediadas a través de agentes químicos (Whittaker y Feeny, 1971; Berry *et al.*, 2008; Paul *et al.*, 2011). Los aleloquímicos comprenden un grupo de compuestos que median las interacciones interespecificas entre organismos. Entre los aleloquímicos se incluye a los compuestos denominados alelopáticos, que son compuestos químicos que afectan negativamente el crecimiento, desarrollo, salud, comportamiento, reproducción ó la biología poblacional de organismos de otras especies (Whittaker y Feeny, 1971; Zak *et al.*, 2012).

La evidencia experimental sugiere que la alelopatía es un mecanismo frecuente de competencia en organismos sésiles por recursos como el espacio, alimento o acceso a la luz (De Nys *et al.* 1991; Antonelli *et al.*, 1993; Littler y Littler, 1997; Titlyanov *et al.*, 2007). Una vez son emitidos, y se asume que efectivamente son liberados, los compuestos producidos por diversos organismos pueden repercutir en otros, afectando su crecimiento, fisiología e incluso comportamiento reproductivo (Thacker *et al.*, 1998; Chaves-Fonnegra *et al.*, 2005; Chaves Fonnegra *et al.*, 2008; Morrow *et al.*, 2011).

Sin embargo, la alelopatía ha sido difícil de demostrar en medios acuáticos por diversas razones como la complejidad de las comunidades que habitan en estos ambientes y por el carácter hidrodinámico en los mismos. A pesar de esto, a nivel experimental se han realizado buenas aproximaciones hacia la comprensión del fenómeno y se ha logrado establecer diferentes evidencias las cuales muestran que el la alelopatía, puede ser un mecanismo frecuente y exitoso dada la complejidad de las interacciones de competencia de los organismos del bentos como algas rojas, esponjas y cnidarios (de Nys *et al.*, 1991; Suzuki *et al.*, 1998; Steinberg *et al.*, 1998; Engel y Pawlik, 2000; Richelle-Maurer *et al.*, 2003; Titlyanov *et al.*, 2007; Chaves-Fonnegra *et al.*, 2008).

De otro lado, las cianobacterias han sido reconocidas por producir compuestos que tienen un efecto alelopático sobre otros organismos. Compuestos aislados de cianobacterias dulceacuícolas como las microcistinas, notocyclamidas, fisherelinas y las cianobacterinas, entre otros, pueden inhibir el crecimiento de posibles competidores como micro y macroalgas, plantas acuáticas e incluso de otras especies de cianobacterias (Jüttner *et al.*, 2001; Berry *et al.*, 2008).

Las cianobacterias marinas producen una gran cantidad de compuestos biológicamente activos, importantes para su supervivencia (Nagle y Paul, 1998; Engene *et al.*, 2011; Tan y Goh, 2009; Leao



*et al.*, 2012). De esta manera, en las cianobacterias marinas, se esperaría que la alelopatía fuera un mecanismo de competencia frecuente, bien sea sobre organismos con los cuales compite directamente por espacio (Titlyanov *et al.*, 2007) o contra embriones de sus potenciales competidores como los corales (Kuffner y Paul, 2004; Kuffner *et al.*, 2006). Adicionalmente, se considera que la alelopatía es un factor importante para la formación y mantenimiento de los afloramientos de cianobacterias dulceacuícolas y marinas (Zak *et al.*, 2012).

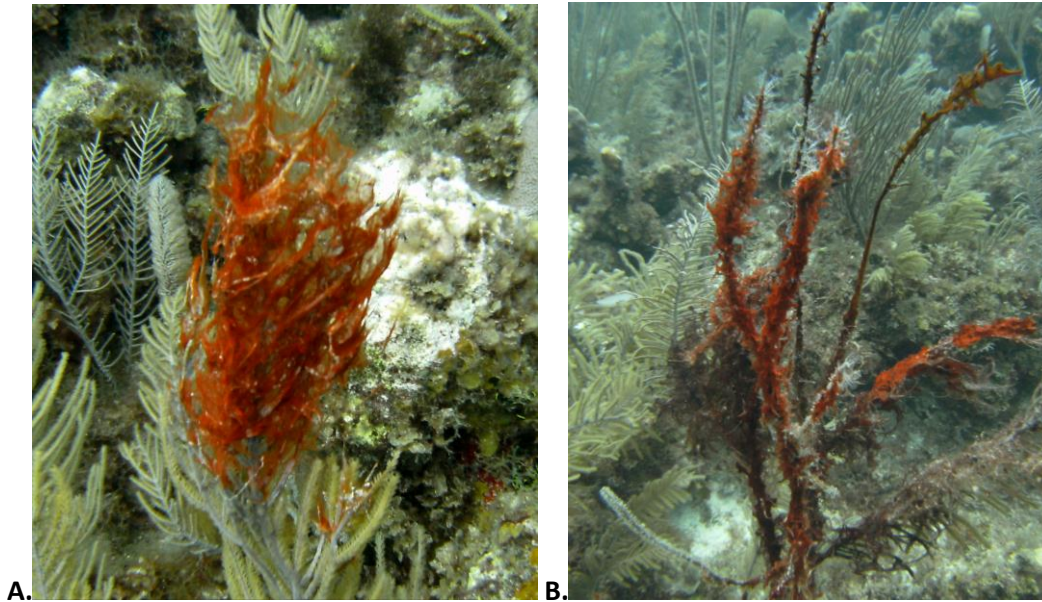
En diferentes localidades del Mar Caribe se ha observado que los tapetes de cianobacterias crecen frecuentemente sobre otros organismos como corales y octocorales (Figuras 5.1 y 5.2). No es infrecuente observar la muerte del tejido coralino bajo tales tapetes o en las áreas donde dichos tapetes entran en contacto directo con los corales.

**Figura 5.1.** Dos tipos de tapetes de cianobacterias (coloraciones roja y marrón) formados por ensambles de *Oscillatoria* spp. y *Lyngbya* spp. creciendo masivamente sobre el sustrato. Se observa como el crecimiento masivo de las cianobacterias llega a sofocar a los corales *Porites porites* (señalados con flechas blancas). La imagen corresponde a afloramientos observados durante septiembre de 2011 en las Islas del Rosario, Caribe colombiano.



Este mismo fenómeno se ha observado también en otros sitios del mundo como Hawaii donde se encontró que numerosos corales *Porites compressa* se encontraban muertos debajo de tapetes de la cianobacteria *Leptolyngbya crosbyana* después de retirar dichos tapetes (Smith *et al.*, 2008) y en Florida donde se observaron efectos negativos de tapetes de cianobacterias del género *Lyngbya* sobre gran variedad de corales y octocorales (Paul *et al.*, 2005). Es posible que estos efectos negativos puedan explicarse en parte a efectos alelopáticos de las cianobacterias sobre los corales.

**Figura 5.2. A y B** Biopelículas de cianobacterias creciendo sobre octocorales del género *Pseudopterogorgia* en arrecifes de la isla de Providencia. El tejido bajo del tapete de cianobacterias estaba muerto y se desintegraba fácilmente al contacto permitiendo a las cianobacterias crecer sobre el esqueleto remanente del octocoral.



## 5.2. Evaluación del efecto alelopático de extractos de cianobacterias contra embriones de coral y corales adultos.

Diferentes extractos orgánicos obtenidos a partir de cianobacterias bentónicas recolectadas en varias localidades del Caribe colombiano, fueron usados para realizar ensayos en campo y laboratorio con el fin de evaluar el potencial efecto alelopático de los mismos contra fragmentos y embriones de coral. Los experimentos fueron realizados usando fragmentos del coral *Madracis mirabilis* y sobre embriones del coral *Montastrea annularis*.

Los extractos se seleccionaron con base en su toxicidad contra *Artemia salina*, su abundancia local y la cantidad de extracto disponible. Los extractos evaluados aparecen en la Tabla 5.1. En este caso, se escogieron cuatro extractos provenientes de cianobacterias que fueron muy abundantes en los afloramientos.

Además, se eligieron extractos que hubiesen tenido resultados muy diferentes en los ensayos de toxicidad realizados contra *Artemia salina* de manera que dos de ellos fueran muy tóxicos (extractos 32 y 38) y los otros dos no hubieran presentado toxicidad incluso a concentraciones altas como 1000 ppm (extractos 36 y 42).

**Tabla 5.1.** Extractos de cianobacterias marinas utilizados en los experimentos para evaluar su papel alelopático contra corales adultos y embriones de coral.

Número de extracto	Especies identificadas en la muestra*	Extracto disponible (g)	CL <sub>50</sub> (ppm) a 24 horas para <i>Artemia salina</i>
32	<i>Symploca hydroides</i> y <i>Phormidium submembranaceum</i>	5,1	130
36	<i>Lyngbya</i> spp.: <i>Lyngbya</i> sp., <i>L. cf confervoides</i> y <i>L. cf majuscula</i>	3,8	> 1000
38	<i>Lyngbya</i> spp. y <i>Oscillatoria</i> spp.: <i>L.cf semiplena</i> , <i>L.cf majuscula</i> , <i>Oscillatoria nigroviridi</i> y <i>O. margaritifera</i>	1,8	60
42	<i>Oscillatoria acuminata</i> y <i>Spirulina</i> sp.	2,1	> 1000

(\*) Determinación taxonómica morfométrica siguiendo la clave de Komarek y Anagnostidis (2005), presentada previamente en el Capítulo 2.

### 5.2.1. Ensayos de toxicidad contra embriones del coral *Montastrea annularis* (Ellis y Solander, 1786)

Los efectos adversos de los afloramientos de cianobacterias marinas arrecifales sobre las comunidades coralinas, no solamente pueden darse por el contacto directo con corales adultos, sino que además pueden afectar las embriones de los corales matándolas o inhibiendo su reclutamiento (Kuffner *et al.*, 2006; Birrell *et al.*, 2008). Dado que el reclutamiento es un proceso clave en el mantenimiento y recuperación de los ecosistemas de arrecifes de coral (Kuffner *et al.*, 2006; Díaz-Pulido *et al.*, 2010), el que haya organismos que afecten este proceso tiene connotaciones negativas para la persistencia y resiliencia de los corales en el ecosistema.

El conocimiento de las interacciones de competencia y en especial alelopáticas, entre corales y algas o cianobacterias es bastante limitado (DeNys, 1991; McCook *et al.*, 2001; Kuffner *et al.*, 2006; Díaz-Pulido *et al.*, 2010). Es aún menos conocido el efecto de las cianobacterias sobre etapas tempranas de la historia de vida de los corales como sus embriones o embriones (resumido en Birrell *et al.*, 2008).

Los tapetes de algas o de cianobacterias o pueden obstruir físicamente el reclutamiento coralino y reducir el espacio disponible para el mismo (McCook *et al.*, 2001), pueden tener efectos mediados químicamente inductivos o inhibitorios del asentamiento larval (Kuffner *et al.*, 2004; Kuffner *et al.*, 2006; Díaz-Pulido *et al.*, 2010) y podrían tener efectos tóxicos sobre los embriones o embriones (Kuffner *et al.*, 2004). Solamente se han realizado dos trabajos que evalúan los efectos de especies de cianobacterias marinas sobre la supervivencia de las embriones de coral encontrando que la presencia de cianobacterias marinas del género *Lyngbya* causa efectos significativos sobre la supervivencia y reclutamiento de las embriones de corales escleractíneos (Kuffner *et al.*, 2004; Kuffner *et al.*, 2006). Estos trabajos fueron realizados en laboratorios marinos en Guam, con embriones de *Acropora surculosa* y *Pocillopora damicornis* (Kuffner *et al.*, 2004) y en la Florida, EEUU, con embriones de *Porites astreoides* (Kuffner *et al.*, 2006).

En este trabajo se evaluó el efecto de algunos extractos orgánicos de cianobacterias marinas recolectadas en afloramientos del Caribe colombiano sobre embriones del coral escleractíneo *Montastrea annularis*, con el fin de evaluar los posibles efectos nocivos de extractos de tales microorganismos sobre la supervivencia de los embriones de coral.

Se seleccionó el coral *M. annularis* porque es un importante formador de arrecifes en ambientes arrecifales del Caribe colombiano y tiene una amplia distribución en el Caribe continental e insular (Reyes *et al.*, 2010).

Adicionalmente, el ciclo gamético y la fecha del desove masivo de la especie es bien conocido se conoce lo cual hace posible la recolección exitosa de sus embriones. El desove de *M. annularis* en el Caribe colombiano ocurre durante el mes de septiembre de seis a siete días después de la luna llena entre las 20:40 y las 21:40 horas (Alvarado, 2008).

### **5.2.2. Evaluación del potencial alelopático de extractos orgánicos de cianobacterias sobre pólipos del coral *Madracis mirabilis* (=auretenra) (Locke, Weil y Coates, 2007).**

Una forma rápida y sensible de evaluar el potencial papel alelopático de compuestos orgánicos es la evaluación de la retracción de pólipos en corales (Petritchtcheva *et al.*, 2002; Richelle-Maurer *et al.*, 2003). Los corales son organismos sumamente sensibles a compuestos exógenos y retraen rápidamente sus pólipos si las condiciones ambientales son desfavorables. El ensayo consiste en exponer corales sanos a concentraciones variables de la(s) sustancia(s) a ensayar y monitorear su comportamiento durante un período de tiempo. Posteriormente, los corales son transferidos a contenedores con agua de mar fresca, para evaluar su comportamiento y eventual recuperación.

Los ensayos de retracción de pólipos fueron realizados con fragmentos del coral *Madracis mirabilis* (=auretenra). Esta especie se encuentra ampliamente distribuida en el Caribe y en Colombia se ha registrado en numerosos sitios incluyendo San Andrés, Providencia y las Islas del Rosario (Reyes *et al.*, 2010).

Este coral es abundante en los arrecifes de las Islas de Rosario (lugar de recolección y realización de los experimentos) y estuvo presente en los lugares donde se observaron los afloramientos y se recolectaron los tapetes de cianobacterias. De otra parte, frecuentemente se encuentran fragmentos sueltos lo cual facilita su recolección y transporte al laboratorio, evitando romper colonias para su obtención. *M. mirabilis* tiene además una gran capacidad de regeneración del tejido, baja susceptibilidad a enfermedades y se puede reproducir exitosamente de manera asexual por fragmentación (Reyes *et al.*, 2010)

### 5.3. Metodología

#### 5.3.1. Ensayos de toxicidad contra embriones del coral *Montastrea annularis* (Ellis y Solander, 1786).

Para la realización del ensayo de toxicidad con embriones de *Montastrea annularis*, se recolectaron paquetes gaméticos del coral mediante el uso de trampas gaméticas, durante el desove natural que ocurrió el 18 de septiembre de 2011 en horas de la noche al norte de Isla Grande, en las Islas del Rosario.

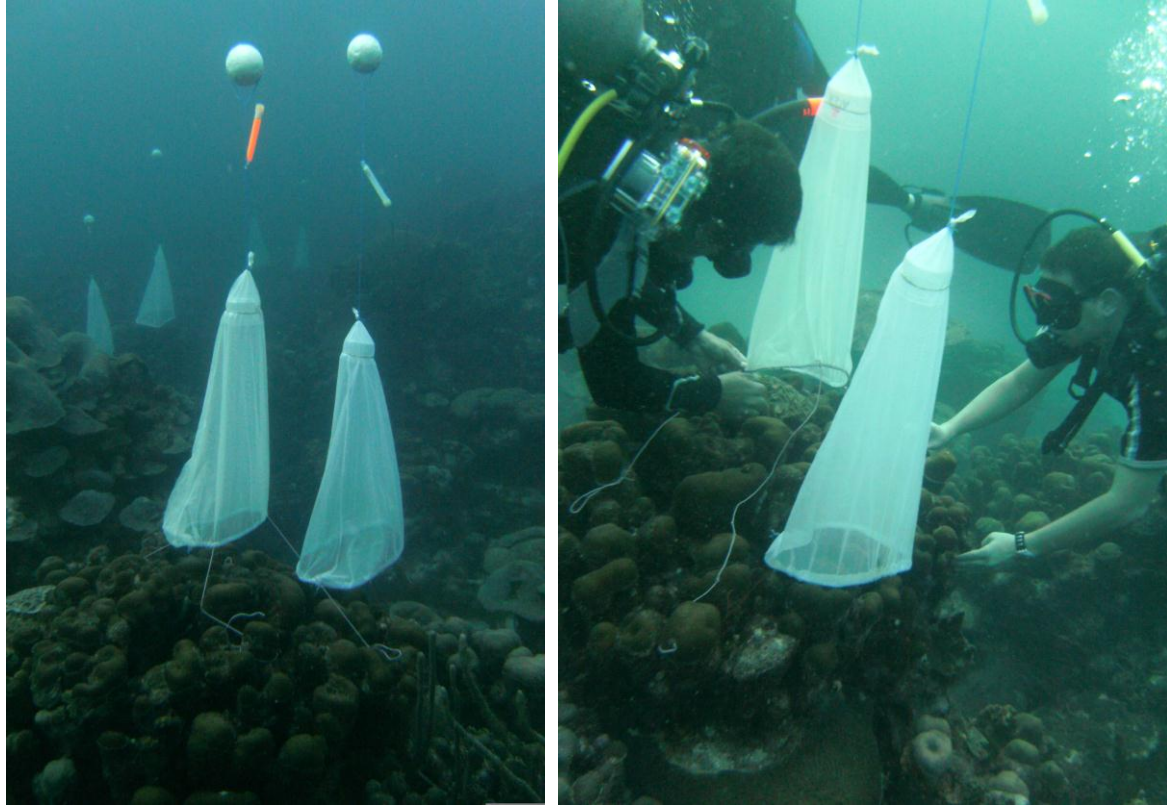
Las trampas gaméticas consisten en conos invertidos de velo suizo con un flotador que permite mantener el cono completamente extendido. El cono tiene en su extremo superior un frasco plástico recolector en el cual quedan atrapados los paquetes gaméticos una vez son liberados (Figura 5.3). El día del desove, las trampas fueron dispuestas en horas de la tarde sobre colonias saludables de *Montastrea annularis* mediante buceo autónomo. Las trampas se sujetaron al fondo con cuerdas amarradas a clavos de acero. Todo el proceso se realizó teniendo extrema precaución con la disposición de las trampas para evitar al máximo el contacto con los corales.

Posteriormente se realizó una inmersión nocturna para monitorear el desove e inmediatamente terminó el evento, los colectores gaméticos de las trampas fueron sellados y llevados cuidadosamente a la superficie para ser transportados rápidamente al laboratorio del Centro de Investigaciones, Educación y Recreación-CEINER en la isla San Martín de Pajarales. Una vez en el laboratorio, los gametos fueron resuspendidos en agua de mar y filtraron a través de una membrana de 100  $\mu\text{m}$  para separarlos de potenciales depredadores como copépodos y otros invertebrados planctónicos que pudieran consumir los gametos. Posteriormente, con el fin de realizar una fecundación cruzada se rompieron los paquetes gaméticos e inmediatamente se separaron los gametos masculinos y femeninos mediante membranas de nylon de 63  $\mu\text{m}$ .

Los gametos masculinos de una colonia se usaron para fertilizar óvulos obtenidos de otra colonia diferente. Pasadas ocho horas después de la fertilización, se separaron los huevos fecundados en buen estado de los gametos sin fecundar que se descomponen fácilmente. Para ellos se utilizaron capilares de vidrio bajo magnificación al esteroscopio.

Los embriones tienen ciertas características como su coloración y su forma que permiten identificar si se están vivos o no, una coloración rosada a rojiza y una forma ovalada son propias de embriones vivos, de igual manera se pueden observar frecuentemente desplazamientos por natación. La forma definida y textura lisa características de embriones vivos se pierden rápidamente cuando éstos mueren. Los embriones en buen estado fueron transferidos a recipientes plásticos con agua de mar fresca y filtrada. La temperatura durante todo este proceso fue de 28°C y la salinidad de 35 g/L.

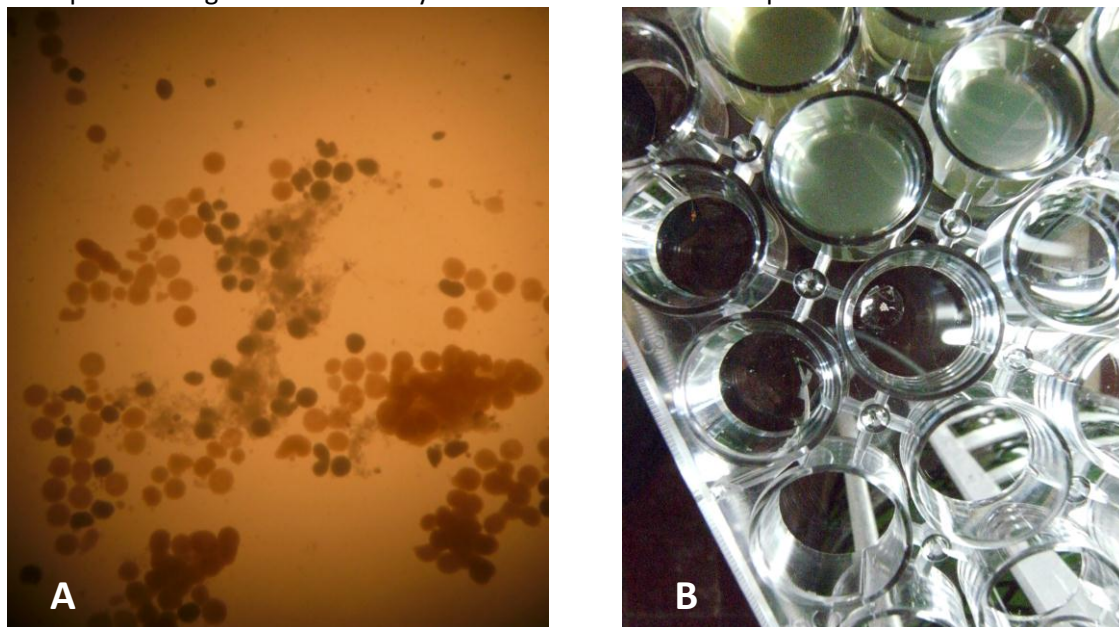
**Figura 5.3.** Disposición de las trampas gaméticas sobre las colonias del coral *Montastrea annularis* durante las horas de la tarde del 18 de septiembre de 2011, en la estación Ministerio para la recolección de los paquetes gaméticos y la posterior realización de las pruebas de toxicidad con extractos orgánicos de cianobacterias.



El experimento de toxicidad contra embriones de *Montastrea annularis* se inició aproximadamente 14 horas después de la fecundación. Se utilizaron placas multipozo de 24 pozos, cada con una capacidad de 3 ml aproximadamente (Figura 5.4). El ensayo consistió en someter los embriones del coral a exposición aguda a diferentes concentraciones de extractos de cianobacterias de una manera similar al ensayo realizado con *Artemia salina* presentado en el capítulo 3 (Sam, 1993) y evaluar la mortalidad de los mismos a las 6, 18 y 24 horas de exposición. Las observaciones se realizaron teniendo en cuenta que la supervivencia de los embriones en los controles fuera superior al 75% (Fearon y Cameron, 1997).

En este ensayo se evaluaron los extractos 32, 36, 38 y 42 los cuales fueron resuspendidos en cantidades muy bajas de etanol y se ensayaron a concentraciones de 1000, 500, 100 y 10 ppm en agua de mar. Como controles se usaron embriones en pozos con solo agua de mar. Para descartar eventuales efectos tóxicos del etanol usado para resuspender los extractos, se usaron controles en agua de mar con la misma cantidad de etanol empleado para resuspender los extractos. Para cada concentración y control se dispusieron 3 réplicas. En cada pozo o réplica se añadieron de 10 embriones vivos y en buen estado.

**Figura 5.4.** Ensayos de toxicidad con embriones del coral *Montastrea annularis*. **A.** Embriones saludables (de color naranja, con borde bien definido) y muertos (oscuros, irregulares). **B.** Placa multipozo con algunos embriones y extractos utilizados en el experimento.



La mortalidad de los embriones se detectó por la pérdida de movilidad y por alteraciones en su forma ovalada definida y textura lisa. Luego del montaje y adición de los extractos a ensayar se contó el número de embriones vivos y muertos para cada réplica en los tratamientos y controles a las 6, 18 y 24 horas utilizando un esteroscopio.

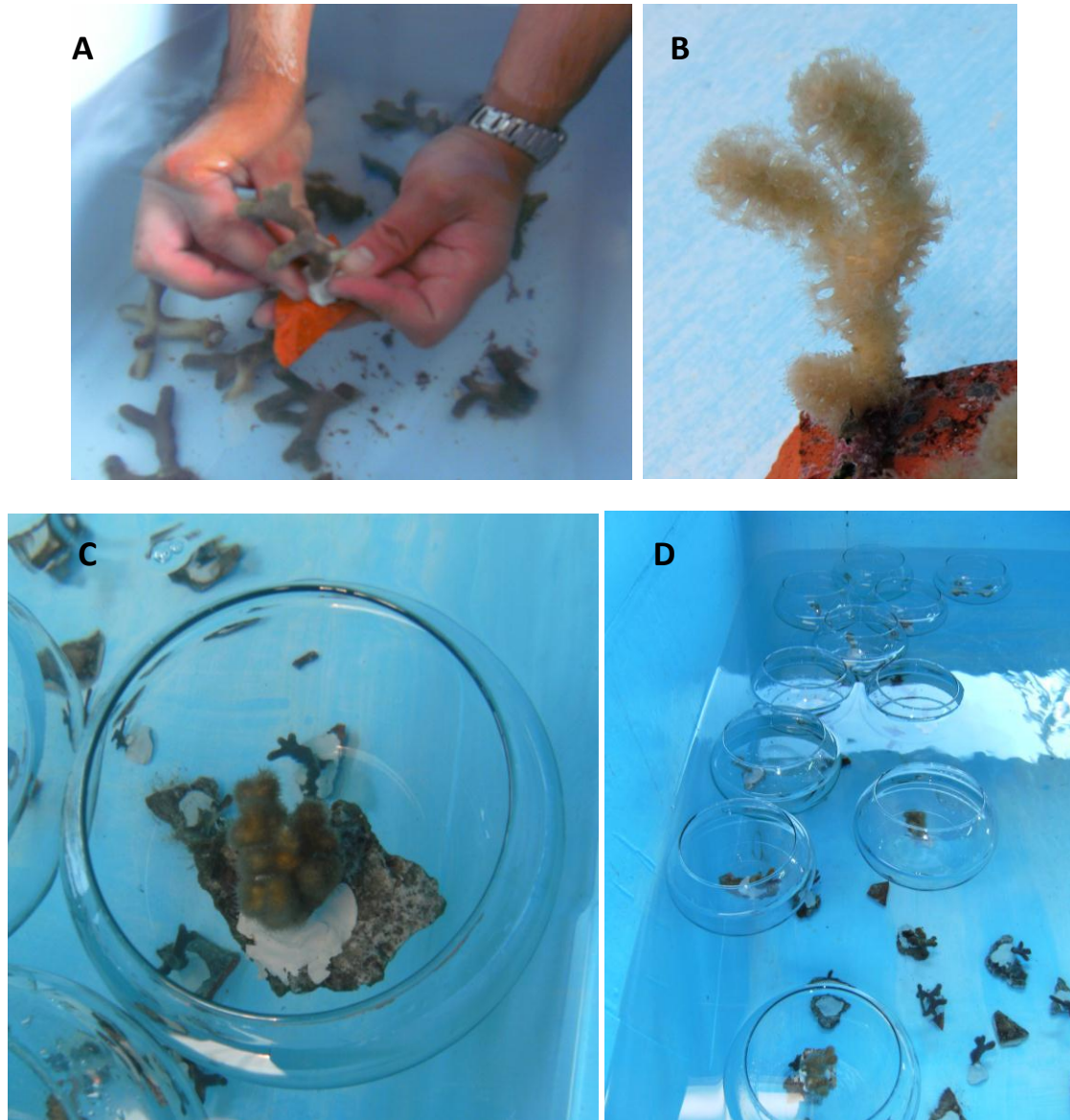
### **5.3.2. Evaluación del potencial alelopático de extractos orgánicos de cianobacterias sobre pólipos del coral *Madracis mirabilis* (=auretenra) (Locke, Weil y Coates, 2007).**

Los fragmentos del coral fueron recolectados manualmente mediante buceo autónomo, en arrecifes al norte de Isla Grande, Islas del Rosario en septiembre de 2011. Los fragmentos fueron almacenados en bolsas plásticas con cierre hermético y llevados de esa manera a la superficie, donde fueron transferidos inmediatamente a contenedores de 40 litros para así, ser transportados a las instalaciones del CEINER en la Isla de San Martín de Pajarales. Los fragmentos se ubicaron en tanques de 4000 litros con agua de mar filtrada, buena iluminación natural y recirculación continua. Cada fragmento fue fijado a pequeñas baldosas individuales de cerámica utilizando una resina epóxica de manera que pudieran mantenerse rectos (Figura 5.5). Los fragmentos de coral se sometieron en un periodo de aclimatación de tres días durante los cuales se alimentaron con nauplios recién eclosionados de *Artemia salina* (Petritchtcheva *et al.*, 2002).

Para la realización de los ensayos, se usaron recipientes de vidrio individuales con capacidad de 600 ml. Cada fragmento de coral fue ubicado individualmente en un recipiente de vidrio. Los recipientes individuales se ubicaron dentro del mismo tanque donde se encontraban los corales inicialmente con el fin de mantener estables las condiciones ambientales (Figura 5.5). Los corales

fueron aclimatados de nuevo durante una hora dentro de los recipientes individuales, para permitir que extendieran de nuevo totalmente sus pólipos. Una vez los fragmentos estuvieron aclimatados con la totalidad de sus pólipos extendidos, se agregaron los extractos resuspendidos en etanol y agua de mar y se registró el comportamiento de los corales.

**Figura 5.5.** Ensayo de retracción de pólipos con fragmentos del coral *Madracis mirabilis*. **A.** Proceso de fijación de los fragmentos de coral a baldosas pequeñas mediante resina epóxica. **B.** Fragmento del coral *M. mirabilis* fijado a la baldosa. Nótese que los pólipos están totalmente extendidos, evidencia que la manipulación no lo afectó negativamente y se encuentra saludable. **C.** Fragmento de coral dentro del recipiente de vidrio en el cual fue expuesto al extracto a ensayar. **D.** Disposición de los recipientes de vidrio dentro del tanque de donde se mantuvieron los corales.





Los extractos a evaluar (extractos 32 y 38) fueron seleccionados por la gran abundancia de los tapetes de cianobacterias a partir de los cuales se obtuvieron y su alta toxicidad frente a *Artemia salina*. Los extractos fueron resuspendidos en volúmenes muy pequeños de etanol y posteriormente diluidos en agua de mar a concentraciones conocidas que permitieron alcanzar dos concentraciones finales deseadas.

Cada extracto se probó a una concentración “baja” (2 mg/L = 0,002 ppm) y una “alta” (11 mg/L = 0,011 ppm), ambas por debajo de las concentraciones naturales. Estas concentraciones fueron elegidas a partir de pruebas previas con los extractos de cianobacterias ejecutadas días antes de la realización de los experimentos y a lo reportado por Richelle Maurer *et al.* (2003). En estas pruebas preliminares se expusieron algunos fragmentos de coral a concentraciones superiores e inferiores a la elegidas, para encontrar el rango al cual la reacción de los pólipos no fuera tan rápida que pudiera causar incluso la muerte del coral, ni tampoco tan lenta o nula que no permitiera observar reacción alguna.

Se usaron dos controles, de una parte, se empleó el mismo volumen de etanol usado para resuspender los extractos como control de solvente y de otra parte, una solución de azúcar de mesa en la misma proporción en peso del extracto utilizado en la concentración más alta (11 mg/L). La solución de azúcar se utilizó para verificar que la adición de un compuesto orgánico no generaba efectos adversos en los corales. Para todos los casos se usaron de 3 a 5 réplicas.

Una vez añadidos los extractos, los corales se monitorearon a los 10, 25, 40, 60, 90, 150, 210 y 270 minutos. Posteriormente (a los 270 min) los corales se pasaron cuidadosamente a recipientes con agua de mar limpia, fresca y circulante para monitorear su recuperación (a los 340, 470 y 1200 minutos después de iniciado el ensayo). El número de pólipos retraídos se contó en 5 subáreas diferentes de 1 cm<sup>2</sup> del fragmento de coral, posteriormente se calculó el porcentaje de pólipos retraídos para cada réplica. Con los resultados de todas las réplicas se calculó el promedio de pólipos retraídos correspondiente a cada tratamiento o control.

## 5.4 Resultados

### 5.4.1 Ensayos de toxicidad contra embriones del coral *Montastrea annularis* (Ellis y Solander, 1786).

Todos los extractos evaluados resultaron ser tóxicos a concentraciones de 500 y 1000 ppm, causando el 100% de mortalidad de los embriones en las primeras 6 horas. Los controles con agua de mar y con etanol no presentaron mortalidad alguna a los embriones durante el periodo de evaluación de 6 y 18 horas en ninguna de las réplicas. A las 24 horas, los controles comenzaron a mostrar mortalidades superiores al 50% por lo cual las observaciones después de las 18 horas no se tuvieron en cuenta. Los resultados de los experimentos de toxicidad contra los embriones de *Montastrea annularis*, se presentan en la Tabla 5.2.

El extracto que mostró mayor toxicidad fue el número 36 (ensamble de *Lyngbya* spp.) provocando mortalidad hasta de un 90% de los embriones a la concentración más baja evaluada (10 ppm) después de sólo 6 horas de exposición.

El extracto que menor toxicidad presentó fue el 32 (ensamble de *Symploca hydroides* y *Phormidium submembranaceum*), ya que transcurridas 6 horas, provocó únicamente el 3% de mortalidad a 100 ppm, a diferencia de los demás extractos que provocaron un 100 % de mortalidad a los embriones. Este extracto además, no causó mortalidad alguna a la menor concentración ensayada (10 ppm) incluso a las 18 horas de exposición, mientras que los demás extractos generaron al menos un 50% de mortalidad a dicha concentración. Sin embargo, a concentraciones de 500 y 1000 ppm el extracto fue letal, causando mortalidades de un 100% a los embriones.

**Tabla 5.2.** Letalidad de extractos de cianobacterias sobre embriones de *Montastrea annularis* (10 embriones por pozo, 3 réplicas por tratamiento). Los valores presentados corresponden al porcentaje promedio de embriones muertos  $\pm$  error estándar. Los controles de agua de mar filtrada y de solvente (etanol) no presentaron mortalidad alguna ni a las 6 o 18 horas del experimento.

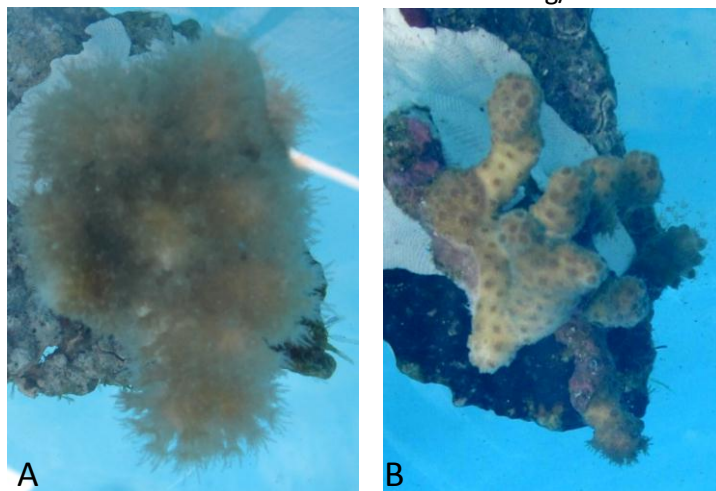
Tiempo de Exposición	Extracto 32		Extracto 36		Extracto 38		Extracto 42	
	6 hrs	18 hrs	6 hrs	18 hrs	6 hrs	18 hrs	6 hrs	18 hrs
<b>Concentración</b>								
Control agua mar	0	0	0	0	0	0	0	0
Control solvente	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ppm	0	0	93 $\pm$ 1	100	3 $\pm$ 2	50 $\pm$ 3	0	97 $\pm$ 2
100 ppm	3 $\pm$ 2	100	100	100	100	100	100	100
500 ppm	100	100	100	100	100	100	100	100
1000 ppm	100	100	100	100	100	100	100	100

#### 5.4.2 Evaluación del potencial alelopático de extractos orgánicos de cianobacterias sobre pólipos del coral *Madracis mirabilis* (=auretenra) (Locke, Weil y Coates, 2007).

En la Figura 5.6, se observa el comportamiento de los pólipos coralinos (extensión o retracción) tras ser expuestos a los extractos evaluados.

Todos los extractos ensayados generaron la retracción de los pólipos coralinos con velocidad e intensidad variables. De otra parte, los controles de solvente y de sacarosa presentaron una mínima retracción de los pólipos y una rápida recuperación. Los resultados del ensayo de retracción de pólipos aparecen en la Tabla 5.3. El extracto 38 (ensamble de *Lyngbya* spp. y *Oscillatoria* spp.), causó la retracción de los pólipos más rápida y severa comenzando a los pocos minutos de iniciado el ensayo y alcanzando una retracción total a los 150 minutos a una concentración de 11 mg/ml. Adicionalmente, los fragmentos de coral expuestos a este tratamiento fueron los que más tardaron en recuperarse ya que incluso a los 470 minutos (200 minutos después de comenzar la fase de recuperación) el 85% de los pólipos continuaban retraídos, sólo 16 horas después de comenzar la fase de recuperación se extendieron el 100% de los pólipos.

**Figura 5.6.** Experimento de retracción de los pólipos en fragmentos del coral *Madracis mirabilis*. **A.** Fragmento de coral con los pólipos totalmente extendidos antes de ser expuesto a los extractos de cianobacterias. **B.** Fragmento de coral con los pólipos retraídos a los 210 minutos de haber sido expuesto al extracto 38 a una concentración de 11 mg/ml.



Los fragmentos expuestos a los extractos de cianobacterias tuvieron un porcentaje máximo de retracción de sus pólipos que superó el 80% y llegó hasta un 99 %, mientras que los controles no superaron el 25% de retracción. Ningún extracto resultó ser letal a las concentraciones evaluadas. Pasadas 20 horas (1200 min) en todos los casos, los corales volvieron a extender y abrir sus pólipos mostrando una recuperación total.

**Tabla 5.3.** Porcentaje de retracción (promedio ± error estándar) de pólipos retraídos del coral *Madracis mirabilis* después de su exposición a dos concentraciones (2 mg/L y 11 mg/L) de extractos orgánicos de cianobacterias marinas y a controles de solución de sacarosa y etanol. Pasados 270 minutos de iniciado el ensayo, los corales se pasaron a recipientes con agua de mar limpia, para monitorear su recuperación (340, 470 y 1200 minutos).

Tiempo de exposición (min)	Tratamientos				Controles	
	Extracto 32 2 mg/L N=3	Extracto 32 11 mg/L N=4	Extracto 38 2 mg/L N=3	Extracto 38 11 mg/L N=5	Sacarosa 11 mg/L N=3	Etanol N=3
<b>Porcentaje de retracción de los pólipos</b>						
10	0	0	0	20 ± 1,3	0	0
25	0	0	0	30 ± 1,5	0	0
40	7 ± 0,3	0	0	36 ± 3	0	0
60	35 ± 0,5	25 ± 1	0	48 ± 0,9	0	0
90	63 ± 0,8	52 ± 1	0	75 ± 1	3 ± 1,6	0
150	87 ± 2	68 ± 1,6	30 ± 1	99,6 ± 1,7	23 ± 0,5	5 ± 1,1
210	88 ± 1	75 ± 0,8	65 ± 3	97 ± 1	17 ± 0,7	10 ± 2
270	87 ± 1,7	86 ± 1,4	80 ± 2	99 ± 0	15 ± 0,4	5 ± 1,3
<b>Fase de recuperación</b>						
340	83 ± 1	86 ± 3	0	97 ± 0	17 ± 0,4	0
470	47 ± 2	43 ± 2	0	85 ± 0	0	0
1200 (20 h)	0	0	0	0	0	0

Valores de "0" indican que todos los pólipos se encontraban extendidos indicando que el coral no se vio afectado por los extractos durante el tiempo de exposición ó que se recuperaron plenamente una vez éste fue culminado (después de los 270 min.)

Los controles con solución de sacarosa presentaron una máxima retracción del 23% de los pólipos a los 150 minutos. Sin embargo, este valor fue muy bajo y la mayoría del tiempo los pólipos estuvieron totalmente extendidos, sugiriendo que no se presentó ningún efecto negativo al añadir esta sustancia al agua donde estaban los corales. Los controles de solvente (etanol) tampoco tuvieron efectos significativos en la retracción de los pólipos del coral, sólo en una de las mediciones se observó un 10% de retracción, sin embargo este valor resultó ser bastante bajo. Los resultados obtenidos con los diferentes extractos sugiere los efectos negativos (retracción de los pólipos) sobre los corales pueden deberse a un efecto alelopático por parte de los extractos de cianobacterias.

## 5.5 Discusión

### 5.5.1 Ensayos de toxicidad contra embriones del coral *Montastrea annularis* (Ellis y Solander, 1786)

Fearon y Cameron (1997) evaluaron la capacidad de los corales hermatípicos de competir entre sí mediante mecanismos alelopáticos. Para ello expusieron embriones de cinco especies diferentes de corales a concentraciones de extractos de ocho especies de corales en un rango de de 62,5 a 250 ppm. Los extractos de los corales no causaron mortalidad significativa durante los dos primeros días de observación a concentraciones de hasta 125 ppm. Sólo uno de los extractos ensayados, obtenido de *Pavona decussata* produjo una mortalidad significativa a la menor concentración ensayada (62,5 ppm) sobre embriones de *Pocillopora damicorni*. Esta concentración es seis veces mayor que la menor concentración ensayada en el presente trabajo (10 ppm), a la cual los extractos 36 y 42 causaron mortalidades de cerca del 100% en los embriones de *Montastrea annularis*. Tales resultados aunque no son directamente comparables con los obtenidos en el presente trabajo, debido a que las especies de los embriones de coral utilizadas fueron diferentes, entre otros factores, sugieren que los extractos de las cianobacterias pueden resultar tóxicos a las embriones de coral y podrían inhibir el reclutamiento coralino.

Numerosos organismos sésiles poseen defensas químicas que los protegen de la epibiosis y el *fouling*. Dichas defensas, pueden tener funciones larvotóxicas contra otros organismos marinos, siendo letales o evitando el asentamiento de dichas embriones sobre su superficie (Fearon y Cameron, 1997; Lau y Quian, 1997; Rittschof, 2000). Maida *et al.* (1995) encontraron efectos alelopáticos por parte del octocoral *Sinularia flexibilis* sobre embriones de corales escleractíneos. En experimentos en campo, los autores reportaron que los octocorales lograron inhibir el reclutamiento de corales escleractíneos en un radio de 0,55 m alrededor de las colonias de *S. flexibilis*. El efecto alelopático fue corroborado realizando experimentos con placas impregnadas con extractos del octocoral, confirmando un efecto inhibitorio del reclutamiento por parte de los extractos de *S. flexibilis*.

Existen otros factores a parte de los mecanismos alelopáticos que pueden afectar negativamente la supervivencia de embriones de coral y su reclutamiento sobre los tapetes de cianobacterias bentónicas. Kuffner *et al.* (2004) realizaron experimentos para comparar la supervivencia y reclutamiento de embriones de los corales escleractíneos *Pocillopora damicornis* y *Acropora surculosa*, en presencia y ausencia de tapetes de la cianobacteria *Lyngbya majuscula*. Los autores encontraron que numerosas embriones de corales se atascaban y morían en medio de los

enredados filamentos de *Lyngbya majuscula*. Por otro lado, los tapetes algales y de cianobacterias promueven la deposición y acumulación de sedimentos dentro del tapete y en sus alrededores, lo cual tiene también efectos negativos sobre el reclutamiento de los corales (Birrell *et al.*, 2005). De igual manera, algunas porciones inferiores de los tapetes de cianobacterias pueden presentar condiciones anóxicas, las cuales son benéficas para la fijación de nitrógeno, pero pueden ser potencialmente nocivas para las embriones de los corales (Kuffner *et al.*, 2004).

Kuffner y Paul (2004) y Kuffner *et al.* (2006), demostraron que las cianobacterias *Lyngbya majuscula* y *Lyngbya confervoides* generan efectos negativos sobre la supervivencia y el reclutamiento de embriones de corales. Sin embargo, ellos sugieren la realización de nuevos experimentos con extractos orgánicos para definir el mecanismo alelopático que puede causar dichos efectos deletéreos. Estos dos trabajos constituyen las únicas investigaciones realizadas sobre los efectos deletéreos de cianobacterias marinas sobre embriones de coral.

La toxicidad de los extractos de cianobacterias sobre las embriones de coral encontrada en el presente trabajo, sugiere que las cianobacterias presentan mecanismos alelopáticos que les permite competir contra los corales, al afectar la supervivencia de los embriones y por ende su reclutamiento. Lo anterior se sugiere asumiendo que ocurre una liberación de compuestos alelopáticos por parte de las cianobacterias, la cual podría ser mediante diversos mecanismos, incluso por la ruptura de las células cuando mueren o por fricción mecánica contra el sustrato u otros organismos.

En el presente trabajo, se evaluaron extractos crudos de cianobacterias confirmando la toxicidad de los mismos sobre las embriones de coral y se sugieren mecanismos por los cuales las cianobacterias podrían afectar el reclutamiento y supervivencia larval de los corales. El grado en que estos mecanismos funcionen en el medio, sigue siendo desconocido, sin embargo, estos resultados proporcionan información sobre el potencial efecto inhibitorio de las cianobacterias sobre el reclutamiento coralino, efecto que puede tener consecuencias sobre la resiliencia de los corales en zonas arrecifales en el mediano y largo plazo.

### **5.5.2 Evaluación del potencial alelopático de extractos orgánicos de cianobacterias sobre pólipos del coral *Madracis mirabilis* (=auretenra) (Locke, Weil y Coates, 2007).**

El extracto 38 (ensamble de *Lyngbya* spp. y *Oscillatoria* spp.) generó un efecto notorio en los corales ya que causó una rápida, intensa y perdurable retracción de los pólipos. En este caso la reacción de los pólipos se incrementó considerablemente a la concentración mayor ensayada (11 mg/L), notándose una rápida retracción de los pólipos a partir de los primeros 10 minutos de exposición. De otra parte, la concentración de 2 mg/L sólo mostró efectos sobre los corales a partir de los 150 min de exposición. Ambas concentraciones ensayadas causaron al menos un 80% de retracción de los pólipos, sugiriendo un efecto alelopático sobre los pólipos del coral.

El extracto 32 (ensamble de *Symploca hydroides* y *Phormidium submembranaceum*), causó al igual que el extracto 38, la retracción de al menos un 86% de los pólipos a ambas concentraciones ensayadas. La retracción de los pólipos fue evidente a partir de los 60 minutos de exposición. A

diferencia de lo observado para el extracto 38, el extracto 32 causó efectos similares en términos de la intensidad y tiempo en el cual se retrajeron los pólipos, tanto a la concentración de 2 mg/L como a la de 11 mg/L.

Este trabajo constituye el primer experimento de retracción de pólipos del coral *M. mirabilis* realizado con extractos de cianobacterias marinas para evaluar su potencial efecto alelopático. Petrichcheva *et al.* (2002) y Richelle-Maurer *et al.* (2003) realizaron el mismo experimento utilizando extractos y compuestos aislados de las esponjas *Axinyssa ambrosia* y *Agelas conifera* respectivamente, encontrando distintos niveles de retracción de los pólipos que sugirieron efectos alelopáticos de tales esponjas sobre los corales.

Richelle-Maurer *et al.* (2003), encontraron que la concentración mínima de extracto de la esponja *Agelas conifera* a la cual se observó una reacción de los pólipos en un periodo de 270 minutos, fue de 6 mg/L. En el experimento realizado en el presente trabajo, se encontró que a una concentración incluso 3 veces menor, los extractos de cianobacterias incidieron notoriamente en la retracción de los pólipos del coral.

Las concentraciones de extractos ensayadas por Richelle-Maurer *et al.* (2003), se encuentran muy por debajo de la concentración natural de extracto en la esponja al igual que sucede con los extractos de las cianobacterias. Esto muestra que los extractos resultan ser activos a concentraciones muy bajas a las cuales ciertos compuestos activos podrían ser liberados. Claro está, para que los compuestos presentes en los extractos tengan un efecto alelopático deben ser liberados al medio para poder actuar. Si bien es muy difícil comprobar que esta liberación efectivamente se da, en el caso de las cianobacterias no sería improbable dado que al estar en contacto directo con los corales, el movimiento del agua podría favorecer la abrasión de la pared celular de las mismas y la consecuente ruptura celular y liberación de compuestos alelopáticos. En numerosos estudios, se ha comprobado que la liberación de toxinas al medio se da en mayor medida debido a la lisis celular debida a la abrasión, al estrés y a la muerte celular de las cianobacterias (Belov, 1998; Ross *et al.*, 2006; Preubel *et al.*, 2009). Adicionalmente, la liberación de toxinas en cianobacterias puede darse a través de procesos de excreción activa al medio, procesos mediados en gran parte por factores ambientales como la temperatura (Belov, 1998; Preubel *et al.*, 2009).

Por su parte, Petrichcheva *et al.* (2002) aislaron el compuesto hidrocloreuro de axynissamina que parece tener un importante papel ecológico como defensa y alelopático en la esponja *Axinyssa ambrosia*. Tal compuesto causó retracción en los pólipos del coral *M. mirabilis* sin generar mortalidad a una concentración de 0,007 mg/mL y tuvo una  $CL_{50}$  = 0,009 mg/mL. En el presente trabajo se observaron fuertes reacciones de retracción de los pólipos a una concentración menor (0,002 mg/mL = 2mg/L). No se observó mortalidad en los corales a 0,011 mg/mL (=11mg/L), ya que todos los corales extendieron de nuevo sus pólipos. El efecto sobre la retracción de los pólipos de los extractos de cianobacterias parece ser muy fuerte comparado con los resultados de Petrichcheva *et al.* (2002) ya que en este caso, además de encontrar retracción de los pólipos a concentraciones menores, se ensayaron extractos orgánicos y no compuestos puros, los cuales generalmente tienen efectos superiores a concentraciones mucho menores en diferentes tipos de bioensayos (Nagle y Paul, 1998; Dobretsov *et al.*, 2010).

Titlyanov *et al.* (2007), realizaron experimentos para evaluar las interacciones entre cianobacterias y corales mediante ensayos de contacto directo. Los autores encontraron que la cianobacteria marina *Lyngbya bouillonii* recolectada en arrecifes de la Isla Sesoko en Japón, causó efectos deletéreos en la fisiología, salud y crecimiento del coral *Porites lutea*. Se determinó que si bien la abrasión tiene efectos negativos sobre el coral, la sombra causada por los tapetes de cianobacterias no tiene un efecto nocivo sobre los mismos. Además, el efecto negativo por la abrasión no fue tan severo comparado contra un posible efecto alelopático. En los tratamientos de contacto con *L. bouillonii*, se encontró una disminución del crecimiento y efectos negativos sobre los corales que duplicaron los valores observados en los controles de abrasión (en contacto directo de una red plástica con los corales). Las consecuencias nocivas sobre el coral, fueron atribuidas a mecanismos alelopáticos particulares de la cianobacteria *L. bouillonii*, ya que al ubicar los corales en contacto con el alga parda *Dictyota dicotoma* no encontraron signos deletéreos sobre los corales, mientras que al ponerlos en contacto con la cianobacteria *L. bouillonii* sí se observaron. Los autores confirmaron y reportaron por primera vez que los tapetes de la cianobacteria *L. bouillonii* son capaces de causar la muerte al tejido coralino y sugieren mecanismos alelopáticos como causas principales de estos efectos deletéreos sobre los corales.

La competencia mediante mecanismos alelopáticos por parte de las cianobacterias marinas bentónicas causa efectos nocivos sobre los corales. Esto se ha sugerido de diferentes observaciones en campo y experimentos en laboratorio, como las realizadas en diferentes arrecifes de coral en el Caribe como en las Bahamas, Belice, Florida y Panamá, entre otros (Ritson-Williams *et al.*, 2005), o en arrecifes de Hawái (Smith *et al.*, 2008), en experimentos sobre embriones de coral (Kuffner *et al.*, 2004; Kuffner *et al.*, 2006) y ensayos con corales adultos (Titlyanov *et al.*, 2007).

Los resultados aquí obtenidos sugieren que algunos ensamblajes de cianobacterias marinas del Caribe colombiano tienen efectos negativos sobre los corales y que en varios casos los mecanismos alelopáticos podrían cumplir un importante papel en la competencia entre las cianobacterias y los corales. Estos mecanismos junto a aquellos que confieren protección contra la herbivoría, se constituirían como adaptaciones eficaces para que las cianobacterias colonicen efectivamente el sustrato, formen grandes afloramientos, dominen y perduren en los arrecifes.

En conclusión, las consecuencias negativas de los mecanismos alelopáticos de competencia sobre las embriones y corales adultos, los efectos negativos de la abrasión por el contacto físico directo, la disminución drástica en los niveles de oxígeno cerca y bajo los tapetes de cianobacterias, la reducción del espacio disponible en el sustrato arrecifal para el reclutamiento coralino y la mortalidad de embriones que se enredan en los tapetes de cianobacterias, son evidencias que permiten sugerir que los afloramientos de cianobacterias bentónicas pueden constituir un riesgo para los arrecifes de coral causando efectos deletéreos sobre embriones y adultos de corales y octocorales (Kuffner *et al.*, 2004; Paul *et al.*, 2005; Kuffner *et al.*, 2006; Ritson-Williams *et al.*, 2005; Tytlianov *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2008; Paul *et al.*, 2011).

## 5.6 Bibliografía

- Alvarado, E. 2008. Efecto de las lesiones naturales sobre la fecundidad: Implicaciones en la estructura de talla de una población del coral *Montastraea annularis* en un arrecife degradado del Caribe Colombiano. Trabajo de grado para optar a título de doctor. Universidad del Valle. 127 p.
- Antonelli P, Sammarco P, Coll J. 1993. A model of allelochemical interactions between soft and scleractinian corals on the Great Barrier Reef. *Journal of Biological Systems*, 1: 1-17.
- Belov AP. 1998. A model of phycotoxin release by cyanobacterial cells. *Ecological Modelling*, 110: 105-117.
- Berry JP, Gantar M, Perez MH, Berry G, Noriega FG. 2008. Cyanobacterial Toxins as allelochemicals with potential applications as algacides, herbicides and insecticides. *Marine Drugs*, 6: 117-146.
- Birrell CL, McCook LJ, Willis BL. 2005. Effects of algal turfs and sediment on coral settlement. *Marine Pollution Bulletin*, 51: 408-414.
- Birrell CL, McCook LJ, Willis BL, Díaz-Pulido GA. 2008. Effects of Benthic algae on the replenishment of corals and the implications for the resilience of coral reefs. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, 46: 25-63.
- Birkeland, C., 1997. *Life and Death of Coral reefs*. Chapman and Hall, New York, 536 pp.
- Chadwick NE, Morrow KM. 2011. Competition among sessile organisms on coral reefs. 347-371p. En: Dubinsky Z, Stambler N. *Coral reefs: An ecosystem in transition*. Springer. Heidelberg, London, New York, 561 pp.
- Chaves-Fonnegra A, López-Victoria M, Parra F, Zea S. 2005. Ecología química de las esponjas excavadoras *Cliona aprica*, *C. caribbaea*, *C. delitrix* y *C. tenuis*. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras*, 34(1): 43-67.
- Chaves-Fonnegra A, Castellanos L, Zea S, Duque C, Rodríguez J, Jiménez C. 2008. Clionapirrolidine A, a metabolite from the encrusting and excavating sponge *Cliona tenuis* that kills coral tissue upon contact. *Journal of Chemical Ecology*, 34: 1565-1574.
- Chaves-Fonnegra A., Zea S. 2010. Coral colonization by the encrusting excavating Caribbean sponge *Cliona delitrix*. *Marine Ecology*, (2010), 1-12.
- De Nys R, Coll J, Price I. 1991. Chemically mediated interactions between the red alga *Plocamium hamatum* (Rhodophyta) and the octocoral *Sinularia cruciata* (Alcyonacea). *Marine Biology*, 108: 315-320.



- Díaz-Pulido G, Harii, S, McCook LJ, Hoegh-Guldberg O. 2010. The impact of benthic algae on the settlement of a reef-building coral. *Coral Reefs*, 29: 203-208.
- Dobrestsov S, Teplitski M, Alagely Ali, Gunasekera SP, Paul VJ. 2010. Malyngolide from the cyanobacterium *Lyngbya majuscula* interferes with quorum sensing circuitry. *Environmental Microbiology Reports*, 2 (6): 739-744.
- Engel S, Pawlik JR. 2000. Allelopathic activities of sponge extracts. *Marine Ecology Progress Series*, 207: 273-281.
- Engene N, Choi H, Esquenazi E, Rottacker E, Ellisman MH, Dorrestein PC, Gerwick WH. 2011. Underestimated biodiversity as a major explanation for the perceived rich secondary metabolite capacity of the cyanobacterial genus *Lyngbya*. *Environmental Microbiology*, 13(6): 1601–1610.
- Fearon RJ, Cameron AM. 1997. Preliminary evidence supporting the ability of hermatypic corals to affect adversely larvae and early settlement stages of hard coral competitors. *Journal of Chemical Ecology*, 23(7): 1769-1780.
- Hughes TP. 1994. Catastrophes, phase shifts, and large-scale degradation of a Caribbean coral reef. *Science*, 265(5178): 1547-1551.
- Hughes TP, Baird AH, Bellwood DR, Card M, Connolly SR, Folke C, Grosberg R, Hoegh-Guldberg O, Jackson JBC, Kleypas J, Lough JM, Marshall P, Nyström M, Palumbi SR, Pandolfi JM, Rosen B, Roughgarden J. 2003. Climate change, human impacts, and the resilience of coral reefs. *Science*, 301: 929-933.
- Hughes TP, Rodrigues MJ, Bellwood DR, Ceccarelli D, Hoegh-Guldberg O, McCook L, Moltschanivskyj N, Pratchett MS, Steneck RS, Willis B. 2007. Phase shifts, herbivory, and the resilience of coral reefs to climate change. *Current Biology*, 17: 360-365.
- INVEMAR, 2011. Informe del Estado de los Ambientes y Recursos Marinos y Costeros en Colombia: Año 2010. Serie de Publicaciones Periódicas No. 8. Santa Marta, 322 pp.
- Jennings, S., Polunin, N.V.C., 1996. Impacts of fishing on tropical reef ecosystems. *Ambio* 25 (1): 44–49.
- Jüttner F, Todorova AK, Walch N, von Philipsborn W. 2001. Nostocyclamide M: A cyanobacterial cyclic peptide with allelopathic activity from *Nostoc* 31. *Phytochemistry*, 57: 613-619.
- Kuffner IB, Paul V. 2004. Effects of the benthic cyanobacterium *Lyngbya majuscula* on larval recruitment of the reef corals *Acropora surculosa* and *Pocillopora damicornis*. *Coral Reefs*, 23: 455–458.
- Kuffner IB, Walters LJ, Becerro MA, Paul VJ, Ritson-Williams R, Beach KS. 2006. Inhibition of coral recruitment by macroalgae and cyanobacteria. *Marine Ecology Progress Series*, 323: 107-117.

- Lau S, Qian P. 1997. Phlorotannins and related compounds as larval settlement inhibitors of the tube-building polychaete *Hydroides elegans*. *Marine Ecology Progress Series*, 159: 219-227.
- Leao PN, Engene N, Antunes A, Gerwick WH, Vasconcelos V. 2012. The chemical ecology of cyanobacteria. *Natural Products Reports*, 29: 372-391.
- Littler DS, Littler MM. 1997. Epizoic red alga allelopathic (?) to a Caribbean coral. *Coral Reefs*, 16: 168.
- Logan A. 1984. Interspecific aggression in hermatypic corals from Bermuda. *Coral Reefs*, 3: 131-138.
- López-Victoria M, Zea S, Weil E. 2006. Competition for space between encrusting excavating Caribbean sponges and other coral reef organisms. *Marine Ecology Progress Series*, 312: 113-121.
- Maida, M. 1995. Directional allelopathic effects of the soft coral *Sinularia flexibilis* on scleractinian coral recruitment. *Bulletin of Marine Science*, 56: 303-311.
- McCook LJ, Jompa J, Díaz-Pulido G. 2001. Competition between corals and algae on coral reefs: A review of evidence and mechanisms. *Coral Reefs*, 19: 400-417.
- Moberg F, Folke C. 1999. Analysis: Ecological goods and services of coral reef ecosystems. *Ecological Economics*, 29: 215-233.
- Morrow KM, Paul VJ, Liles MR, Chadwick NE. 2011. Allelochemicals produced by Caribbean macroalgae and cyanobacteria have species-specific effects on reef coral microorganisms. *Coral Reefs*, 30: 309-320.
- Mumby, PJ, Steneck R. 2008. Coral reef management and conservation in the light of rapidly evolving ecological paradigms. *Trends in Ecology and Evolution*, 23: 555-563.
- Nagle D, Paul VJ. 1998. Chemical defense of a marine cyanobacterial bloom. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 225: 29-38.
- Pandolfi JM, Bradbury RH, Sala E, Hughes TP, Bjorndal KA, Cooke RG, McArdle D, McClenachan L, Newman MJH, Paredes G, Warner RR, Jackson JBC. 2003. Global trajectories of the long-term decline of coral reef ecosystems. *Science*, 301: 955-958.
- Paul VJ, Thacker R, Banks K, Golubic S. 2005. Benthic cyanobacterial blooms impacts the reef of south Florida (Broward County, USA). *Coral Reefs*, 24: 693-697.
- Paul VJ, Ritson-Williams R, Sharp K. 2011. Marine chemical ecology in benthic environments. *Natural Products Report*, 28: 345-387.

- Petrichtcheva NV, Duque C, Dueñas A, Zea S, Hara N, Fujimoto Y. 2002. New Nitrogenous eudesmane-type compounds isolated from the Caribbean Sponge *Axinyssa ambrosia*. *Journal of Natural Products*, 65: 851-855.
- Preubel K, Wessel G, Fastner J, Chorus I. 2009. Response of cylindrospermopsin production and release in *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) to varying light and temperature conditions. *Harmful Algae*, 8: 645-650.
- Reyes J, Santodomingo N, Flórez P. 2010. Corales escleractinios de Colombia. INVEMAR Serie de Publicaciones Especiales No. 14., Santa Marta. 246 pp.
- Richelle-Maurer E, De Kluijver M, Feio S, Gaudencio S, Gaspar H, Gomez R, Tavares R, Van de Vyver G, Van Soest RWM. 2003. Localization and ecological significance of oroidin and sceptrin in the Caribbean sponge *Agelas conifera*. *Biochem. Syst. Ecol.*, 31: 1073–1091.
- Ritson-Williams R, Arnold SN, Fogarty ND, Steneck RS, Vermeij MJA, Paul VJ. 2009. New perspectives on ecological mechanisms affecting coral recruitment on reefs. 437-457 p. En: Lang MA, MacIntyre IG, Rützler K. (Eds). *Proceedings of the Smithsonian Marine Science Symposium*. Smithsonian Institution Scholarly Pres., Wasington DC. 529 pp.
- Ritson-Williams R., Paul VJ, Bonito V. 2005. Marine benthic cyanobacteria overgrow coral reef organisms. *Coral Reefs*, 24: 629.
- Rittschof D. 2000. Natural products antifoulants: one perspective on the challenges related to coatings development. *Biofouling*, 15(1-3): 119-127.
- Ross C, Santiago-Vazquez L, Paul V. 2006. Toxin release in response to oxidative stress and programmed cell death in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic Toxicology*, 78: 66-73.
- Sam T. W. 1993. Toxicity testing using the brine shrimp: *Artemia salina*. En: Colegate, S. y Molineux, R. B. (Eds). *Bioactive Natural Products: Detection, isolation and structural determination*. CRC Press Inc. Boca Raton, Fl. 528 pp.
- Smith JE, Kuwabara J, Flanagan K, duPlessis S, Coney J, Beets J, Takabayashi M, Barnes S, Turner J, Brown D, Griesemer BK, Stanton F. 2008. An unusual cyanobacterial bloom in Hawai'i. *Coral Reefs*, 27:851.
- Steinberg P, De Nys R, Kjelleberg S. 1998. Chemical inhibition of epibiota by Australian seaweeds. *Biofouling*, 12: 227-244.
- Suzuki Y, Takabayashi T, Kawaguchi T, Matsunaga K. 1998. Isolation of an allelopathic substance from the crustose coralline algae, *Lithophyllum* spp., and its effect on the brown alga, *Laminaria religiosa* Miyabe (Phaeophyta). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 225: 69-77.

Tan LT, Goh BPL. 2009. Chemical ecology of marine cyanobacterial secondary metabolites: a mini review. *Journal of Coastal Development*, 13(1): 1-9.

Thacker RW, Becerro MA, Lumbang WA, Paul VJ. 1998. Allelopathic Interactions between Sponges on A Tropical Reef. *Ecology*, 79(5):1740–1750.

Titlyanov E, Yakovleva I, Titlyanova T. 2007. Interaction between benthic algae (*Lyngbya bouillonii*, *Dictyota dichotoma*) and scleractinian coral *Porites lutea* in direct contact. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 342: 282-291.

Whittaker RH, Feeny PP. 1971. Allelochemicals: Chemical interactions between species. *Science*, 117(3973): 757-770.

Zak A, Musiewicz K, Kosakowska A. 2012. Allelopathic activity of the Baltic cyanobacteria against microalgae. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 112: 4-10.

## 6. Interacciones de extractos de cianobacterias con otros microorganismos: Inhibición del *quorum sensing* y actividad antifúngica

### 6.1. Introducción

En promedio, cada mililitro de agua de mar contiene en promedio  $10^7$  virus,  $10^6$  bacterias,  $10^3$  hongos y  $10^3$  microalgas. Entre microorganismos hay algunos agentes causales de enfermedades infecciosas marinas (resumido en Engel *et al.*, 2002). Las plantas, algas y las cianobacterias marinas no poseen un sistema inmune como tal, por lo cual resulta bastante razonable pensar que la producción de compuestos químicos podrían constituir mecanismos fundamentales de defensa antimicrobiana contra posibles patógenos marinos (Engel *et al.*, 2002; Kubanek *et al.*, 2003). Por ejemplo, se ha encontrado que extractos orgánicos obtenidos del tejido de octocorales pueden inhibir el crecimiento de bacterias marinas bentónicas (Harder *et al.*, 2003), además se ha podido evidenciar que diversas bacterias marinas bentónicas tienen la capacidad de producir compuestos antimicrobianos que les permitiría competir con otros microorganismos, resultando más interesantes aún, los hallazgos que muestran que la producción de dichos compuestos antimicrobianos puede ser inducida por la presencia de otras bacterias o de los sobrenadantes de sus cultivos (Burgess *et al.*, 1999).

Aunque la información ecológicamente relevante acerca del papel que compuestos orgánicos pueden llegar a tener como defensas contra potenciales patógenos de organismos marinos, puede ser un poco limitada (resumido en Engel *et al.*, 2006), existen algunos ejemplos muy interesantes donde se evalúa la actividad antimicrobiana de compuestos y extractos obtenidos de plantas e invertebrados marinos contra hongos que coexisten con los mismos y que son patógenos potenciales como *Dendryphiella salina* y *Lindra thalassiae* (Engel *et al.*, 2006; Kubanek *et al.*, 2003; Puglisi *et al.*, 2004; Puglisi *et al.*, 2007; Ross *et al.*, 2008; Meickle *et al.*, 2009). Por ejemplo, Jensen *et al.* (1998) encontraron que extractos obtenidos del pasto marino *Thalassia testudinum* tuvieron la capacidad de inhibir el crecimiento del hongo marino *Schizochytrium aggregatum*, y mediante aislamiento biodirigido lograron obtener un compuesto puro llamado luteolina que fue el responsable de la actividad antifúngica. Lo anterior resalta la necesidad de realizar más estudios acerca del papel ecológico de compuestos y extractos de organismos como plantas, algas y, en este caso particular, cianobacterias marinas, como posibles defensas contra hongos marinos.

Como una contribución al estudio de las interacciones entre los extractos y compuestos producidos por cianobacterias del mar Caribe Colombiano con otros microorganismos marinos,

en este capítulo, se muestran los resultados de inhibición de la comunicación bacteriana (*quorum sensing*), y de actividad antifúngica contra el hongo marino *Dendryphiella salina*, de extractos y compuestos obtenidos a partir de las cianobacterias bentónicas estudiadas.

### 6.1.1. Inhibición del *quorum sensing* por extractos de cianobacterias

El *quorum sensing* (*qs*) es un proceso de comunicación bacteriana que regula la expresión genética en respuesta al aumento de la densidad de una población o comunidad bacteriana mediante la producción y percepción de una concentración umbral de moléculas de señalización (Dobretsov *et al.*, 2010; Kwan *et al.*, 2011). Mediante este tipo de comunicación, algunas bacterias pueden coordinar procesos como la formación de biopelículas, la resistencia al estrés, la propagación superficial, la producción de toxinas o metabolitos secundarios y la expresión de factores de virulencia entre otros (Dobretsov *et al.*, 2009; Dobretsov *et al.*, 2010).

Este proceso es importante en las interacciones ecológicas de las bacterias con otros organismos ya que regula entre otras cosas, la expresión genética de factores de virulencia en cepas que han mostrado patogenicidad, donde las bacterias pueden mantener niveles bajos de virulencia durante las primeras fases de la infección evitando así la activación de las defensas del huésped hasta que estén presentes en un número suficiente de células para sobrepasar dichas defensas y lograr un ataque efectivo (Dobretsov *et al.*, 2009).

Las moléculas que funcionan como señalizadoras del *quorum sensing* son en general compuestos químicos orgánicos pequeños (menores a 1000 Da) o péptidos de 5 a 20 aminoácidos (resumido en Williams, 2007). Las moléculas señales del *qs* más conocidas son las *N*-acil homoserin lactonas (AHLs), características de bacterias Gram-negativas, aunque también existen otras moléculas señalizadoras como las dicetopiperacinas, quinolonas, ácidos grasos de cadena larga y sus ésteres metílicos, además de péptidos lineales o cíclicos, entre otros (Williams, 2007; Osorno *et al.*, 2012).

El uso masivo de antibióticos es actualmente la solución más común para combatir las enfermedades bacterianas su uso indiscriminado ha resultado en la generación y aumento de la resistencia bacteriana dando origen a peligrosos patógenos multiresistentes (Reacher, *et al.*, 2000; Natrah *et al.*, 2011). Frente a este problema, lograr inhibir el *qs* de microorganismos que han mostrado patogenicidad constituye una alternativa para el control de las infecciones mediante generando una menor presión selectiva sobre los patógenos y evitando así la generación de cepas resistentes (Skindersoe *et al.*, 2008). En este sentido, los compuestos químicos de origen natural que funcionen como inhibidores del *qs* (conocidos también en inglés como *quorum sensing inhibitors* o *quorum quenchers*) pueden constituir alternativas para mitigar este problema (Stauff y Bassler, 2011).

Desde el punto de vista ecológico, la producción de inhibidores del *qs* (*lqs*) por diferentes organismos marinos, ha demostrado ser una buena alternativa de defensa química para controlar la colonización bacteriana de sus superficies, mitigando así la epibiosis y posibles infecciones por patógenos (Skindersoe *et al.*, 2008; Dobretsov *et al.*, 2009). Un claro ejemplo de ello son las furanonas halogenadas, compuestos químicos producidos por el alga roja *Delisea pulchra* que tienen la capacidad imitar las AHLs uniéndose a los receptores de estas moléculas, inhibiendo así la expresión de los genes regulados por *qs* que controlan la virulencia, la producción de

antibióticos, la motilidad bacteriana y la formación de biopelículas (Dobretsov *et al.*, 2009). En este sentido, también se ha explorado la capacidad que tienen diferentes organismos como algas, esponjas, octocorales, corales hermatípicos y ascidias, de producir *lqs* encontrando que estos organismos representan una fuente interesante de compuestos con posibles aplicaciones biomédicas e industriales (Skindersoe *et al.*, 2008).

Otros estudios han mostrado que las cianobacterias bentónicas marinas pueden producir *lqs*, lo cual posiblemente les confiere protección contra el ataque y la epibiosis por parte de otras bacterias. Por ejemplo, Dobretsov *et al.* (2009) encontraron que algunos extractos orgánicos obtenidos de tapetes de cianobacterias marinas como *Lyngbya majuscula* y *Symploca hydroides* recolectadas en el sur de la Florida (EEUU), Belice y Omán, inhibieron el *qs* utilizando como reportero la bacteria gram-negativa *Chromobacterium violaceum* cepa CV17.

Teniendo en cuenta la importancia ecológica aquí resaltada y su potencial de aplicación en la industria farmacéutica o en aplicaciones biotecnológicas, se realizó un *screening* para evaluar la actividad inhibitoria del *qs* por parte de extractos orgánicos obtenidos cianobacterias marinas en afloramientos en las islas del Caribe colombiano (Providencia, San Andrés e Islas del Rosario).

### 6.1.2. Evaluación de extractos de cianobacterias con actividad antifúngica

El ambiente marino es altamente demandante y competitivo. La supervivencia de organismos como las cianobacterias, requiere de diversas estrategias de defensa como la producción de compuestos que les van a permitir competir eficientemente por espacio o por recursos como otras bacterias, algas y hongos.

Los hongos conocidos saprófitos que cobran especial importancia en el medio marino ya que además de ser agentes descomponedores de la materia orgánica, algunos de ellos son importantes agentes patógenos en algas, corales y pastos marinos. Por ejemplo, el ascomicota *Lindra thalassiae* puede algas pardas del género *Sargassum* o bien los pastos marinos del género *Thalassia*. El hongo *Labrynthula zosterae* afecta el pasto marino *Zostera marina* y causó mortalidades masivas de estos pastos a comienzos del Siglo XX. Más recientemente se identificó la aspergilosis, causada por el hongo de origen terrestre *Aspergillus sydowi* que ataca a los abanicos de mar, octocorales del género *Gorgonia* (resumido en Engel *et al.*, 2006). El hongo saprófito *Dendryphiella salina*, es un descomponedor agresivo de plantas y algas marinas, y presenta alta patogenicidad, baja selectividad en sus hospederos y una amplia distribución en los mares tropicales (Engel *et al.*, 2006; Puglisi *et al.*, 2007; Ross *et al.*, 2008). Estos hongos, representan los pocos modelos con relevancia ecológica estudiados, puesto que la mayoría de estudios de interacciones entre hongos y organismos marinos han involucrado especies que afectan la salud humana o tienen un impacto en la acuicultura (Mayer *et al.*, 2009; Gulve y Deshmukh, 2012).

De otro lado, dado que las plantas, algas y cianobacterias marinas no poseen un sistema inmune como tal, resulta bastante razonable considerar que la producción de metabolitos pueda constituir un mecanismo fundamental de defensa antimicrobiana contra posibles patógenos marinos (Engel *et al.*, 2002; Kubanek *et al.*, 2003). Por ejemplo, las capisteronas A y B aisladas del alga verde *Penicillus capitatus* presentaron una potente actividad antifúngica contra el hongo *Lindra thalassiae* (Puglisi *et al.*, 2004); el lobophórico aislado del alga parda *Lobophora variegata* mostró tener una potente actividad contra *L. thalassiae* y *D. salina* (Kubanek *et al.*, 2003).

Adicionalmente, Meickle *et al.*, (2009) encontraron que el compuesto deacetil microcolina B aislado de la cianobacteria marina *Lyngbya cf. polychroa* inhibió el crecimiento de *D. salina*, lo cual sugiere que las cianobacterias podrían producir compuestos que podrían proporcionarles ventajas ecológicas inhibiendo el crecimiento de hongos marinos o terrestres. En esta parte del trabajo, se realizaron ensayos de inhibición del crecimiento del hongo filamentoso marino *Dendryphiella salina*, a partir de extractos de cianobacterias bentónicas marinas del Caribe colombiano con el fin de evaluar el potencial inhibitorio de los mismos contra un potencial patógeno ecológicamente relevante. Adicionalmente, se realizó el aislamiento biodirigido de los compuestos responsables de dicha actividad.

## 6.2. Metodología

### 6.2.1. Inhibición del *quorum sensing* por extractos de cianobacterias

Para la determinación de actividad inhibitoria del *quorum sensing* se evaluaron 10 extractos obtenidos de los tapetes de cianobacterias marinas recolectados en afloramientos en el Caribe colombiano (Tabla 6.1), los cuales fueron identificados en el capítulo 2. La selección de los extractos se realizó con base en la abundancia local de las cianobacterias a partir de las cuales se elaboraron los extractos, su toxicidad contra *Artemia salina* (capítulo 3) y la cantidad de extracto disponible al momento de hacer los estudios. El ensayo se realizó en agosto de 2011 dentro de las instalaciones de la estación marina del instituto Smithsonian (SMS) en Fort Pierce Florida con la colaboración del Profesor Sergey Dobretsov (Universidad Sultán Qaboos, Omán). Como biosensor para detectar dicha actividad se utilizó la cepa reportera *Chromobacterium violaceum* CV17 (Dobretsov 2009). Esta cepa se caracteriza por la producción de violaceína que se puede visualizar como la producción de una coloración violeta en el medio de cultivo, en respuesta a la detección de una concentración umbral de AHLs de cadena lateral corta (C6 HSL) (Dobretsov *et al.*, 2011).

**Tabla 6.1.** Descripción de las muestras de cianobacterias bentónicas arrecifales recolectadas en el Caribe colombiano utilizadas en los ensayos para evaluar actividad inhibitoria del *quorum sensing* y antifúngica.

Número de muestra	Especies identificadas en la muestra *	Extracto disponible (g)	CL <sub>50</sub> (ppm) 24 h contra <i>Artemia salina</i>
8	<i>Lyngbya majuscula</i> y <i>L. sordida</i>	4,5	400
9	<i>Oscillatoria nigroviridis</i>	4,6	5
11	<i>Lyngbya</i> spp. y <i>Oscillatoria margaritifera</i>	5,8	274
30 y 32	<i>Symploca hydroides</i> y <i>Phormidium submembranaceum</i>	5,1	130
36	<i>Lyngbya</i> spp.: <i>Lyngbya</i> sp., <i>L. cf confervoides</i> y <i>L. cf majuscula</i>	3,8	>1000
38	<i>Lyngbya</i> spp. y <i>Oscillatoria</i> spp.: <i>L. cf semiplena</i> , <i>L. cf majuscula</i> , <i>O. nigroviridis</i> , <i>O. margaritifera</i>	1,8	60
42	<i>Oscillatoria acuminata</i> y <i>Spirulina</i> sp.	2,1	>1000
43	<i>Lyngbya majuscula</i> y <i>L. sordida</i>	1,1	127

(\*) Determinación taxonómica morfométrica tradicional siguiendo la clave de Komarek y Anagnostidis (2005), previamente presentada en el Capítulo 2.



Previo al ensayo, un inóculo del reportero *Chromobacterium violaceum* CV-17 que se tenía criopreservado en medio LB/glicerol (1:1) a -80°C, fue reactivado durante 48 horas a 30°C en caldo LB (Difco, EEUU). Los medios de cultivo fueron preparados de acuerdo a las indicaciones de los fabricantes.

Los ensayos se realizaron en placas de 96 pozos siguiendo la metodología propuesta por Dobretsov *et al.*, (2011). Los extractos de cianobacterias fueron resuspendidos en metanol y se realizaron cinco diluciones secuenciales obteniendo cinco concentraciones finales entre 6 y 0,2 mg/mL de los extractos en el medio de cultivo. Cada concentración fue ensayada por triplicado para determinar la concentración mínima inhibitoria del *qs* (CMI<sub>qs</sub>). Las soluciones correspondientes a las diferentes concentraciones de extractos evaluadas fueron añadidas cuidadosamente en el centro de cada pozo utilizando el menor volumen posible de solvente para cada dilución (menos de 20 µl), intentando así disminuir la cantidad del extracto que quedaba adherida a las paredes del pozo. Posteriormente el solvente fue evaporado en una cámara de extracción. Una vez secos, los extractos fueron resuspendidos en DMSO (1 µL/100 µL de medio de cultivo) ya que concentraciones mayores a un 1% de DMSO puede resultar en la inhibición de *quorum sensing*. Posteriormente los extractos se homogenizaron mediante un vórtex para mejorar la resuspensión de los extractos en el DMSO. Para los controles, a los pozos se añadió se añadió únicamente metanol, el cual fue evaporado. Adicionalmente, se usaron controles con y sin DMSO a concentraciones de 1 % y 2 %. Para realizar los experimentos, *C. violaceum* CV-17 incubado previamente por 48 horas en caldo LB, fue utilizado como inóculo agregando 1 mL del cultivo en caldo a 10 mL de agar LB (Difco, EEUU) homogenizando cuidadosamente en cajas de Petri estériles, antes de que se solidificara el agar, inmediatamente, a cada pozo con los extractos resuspendidos en DMSO se agregaron 100 µL del medio con *C. violaceum* CV-17 rápidamente evitando solidificara el agar, usando una micropipeta multicanal. Las placas multipozo fueron tapadas y selladas con Parafilm® para su incubación por 24 horas a 30°C.

El CV-17 produce una coloración violeta en el medio que indica que se está dando el *qs*. De esta manera, la disminución de la coloración violeta con respecto a los controles indicó la inhibición del *quorum sensing*. Las concentraciones mínimas inhibitorias del *qs* se determinaron mediante observación directa de la ausencia del color violeta en relación con los controles. Se calculó la concentración mínima inhibitoria del *qs* (CMI<sub>qs</sub>) como el promedio de las concentraciones mínimas de inhibición correspondientes a cada una de las tres réplicas realizadas. Con el fin de evaluar si los extractos ensayados en realidad inhibían el *qs* y no inhibían el crecimiento bacteriano, se realizaron ensayos de difusión en agar con sensidiscos (Dobretsov *et al.*, 2010). Brevemente, se aplicaron los extractos resuspendidos en metanol a los sensidiscos estériles, los cuales se dejaron secar y fueron dispuestos en cajas de petri que contenían el medio de cultivo con el reportero CV-17 incorporado (1 ml de CV-17/10 ml de agar LB). Las cajas se incubaron por 24 h a 30°C. Posteriormente, se buscó la formación de halos de inhibición a causa de la inhibición del crecimiento bacteriano.

### 6.2.2. Evaluación de extractos de cianobacterias con actividad antifúngica

Para la determinación de la actividad antifúngica se evaluaron 9 extractos obtenidos de las cianobacterias marinas recolectadas en afloramientos en el Caribe colombiano (Tabla 6.1),

identificadas morfológicamente en el capítulo 2. La selección de los extractos se realizó empleando como criterio la abundancia local de los tapetes, su toxicidad contra *Artemia salina* y la cantidad de extracto disponible para realizar los experimentos.

Los ensayos se realizaron de acuerdo con la metodología utilizada por Engel *et al.* (2006) con la colaboración de la Dra. Theresa Meickle en la Estación Marina del Instituto Smithsonian en Fort Pierce, Florida, EEUU (SMS), en agosto de 2011. Las cepas de *D. salina* fueron obtenidas del cepario del SMS. *D. salina* fue cultivado en medio YPM P/S preparado con 2 g de extracto de levadura, 2 g de peptona, 4 g de D-manitol, 16 g de agar, 250 mg de penicilina G y sulfato de estreptomycinina en 1 L agua de mar filtrada a 25°C (Engel *et al.*, 2006; Puglisi *et al.*, 2007; Meickle *et al.*, 2009).

Los extractos ensayados fueron resuspendidos en 200 µL de metanol para facilitar su disolución en 2 mL del medio de cultivo. Los extractos fueron incorporados en el medio mientras éste se encontraba aún líquido, de manera que se obtuvo una concentración final de 1 mg de extracto por mL de medio de cultivo. Para el ensayo se utilizaron placas multipozo estériles de 24 pozos. A cada pozo se agregó un volumen de 600 µL del medio con cada extracto incorporado (N=3) (Ross *et al.*, 2008). En cada placa se dispusieron controles con el solvente (200 µL de metanol), control del medio YPM P/S y como control positivo se utilizó el antimicótico amfotericina B (1mg/mL).

Una vez los medios de cultivo con los controles y los extractos se solidificaron, un inóculo en forma de cubo de 1 mm<sup>3</sup> fue cortado usando un bisturí quirúrgico estéril a partir de un cultivo desarrollado del hongo filamentoso marino *Dendryphiella salina*. Cada inóculo se dispuso en el centro de cada pozo utilizando pinzas de acero estériles (Figura 6.2). Las placas fueron incubadas a 25°C hasta que el hongo en los controles del medio y del solvente alcanzó un crecimiento total (es decir, las hifas cubrían la totalidad de la superficie del medio en el pozo). En ese momento se comparó dicho crecimiento con aquel observado en los pozos con los diferentes extractos. La cuantificación del área cubierta por el hongo fue realizada utilizando un anejo plástico. El número de cuadros del anejo cubiertos por el hongo en los controles de solvente y del medio fueron tomados como un crecimiento del 100%. De esta forma, se determinó el porcentaje de crecimiento correspondiente a cada réplica de los tratamientos en relación con el de los controles, teniendo en cuenta para el cálculo las tres réplicas.

### **6.2.3. Aislamiento biodirigido de compuestos activos contra *D. salina* a partir de extractos de cianobacterias bentónicas arrecifales**

Utilizando el bioensayo de inhibición del crecimiento de *D. salina* como criterio de selección de las fracciones y copuestos activos para el aislamiento biodirigido, y con el uso de distintas técnicas cromatográficas (cromatografía en columna y cromatografía líquida de alta eficiencia), se realizó fraccionamiento y posterior purificación de compuestos con actividad antifúngica. Adicionalmente, mediante métodos analíticos como la resonancia magnética nuclear y la espectroscopía de masas, se logró confirmar la pureza e identidad de los compuestos obtenidos.

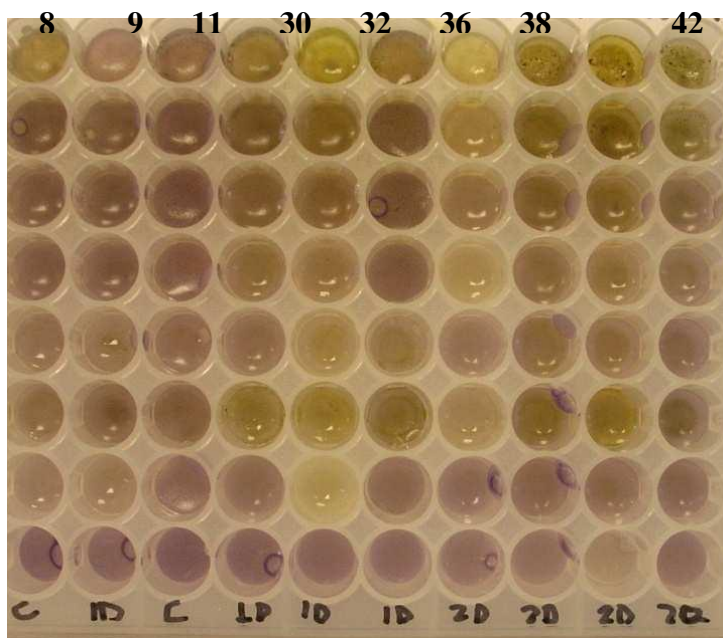
## 6.3. Resultados

### 6.3.1. Inhibición del *quorum sensing* por extractos de cianobacterias

Siete de los diez extractos de cianobacterias marinas ensayados mostraron inhibir el *qs* a concentraciones menores a 6 mg/mL. Los otros tres extractos no produjeron ninguna disminución en la producción de violaceína a la concentración más alta ensayada (6 mg/mL). Una fotografía de una de las placas multipozo donde se realizó el ensayo de inhibición el *quorum sensing* se muestra en la Figura 6.1.

Los extractos 30, 32, 38 mostraron la mayor actividad inhibitoria de la expresión de violaceína a concentraciones entre 0,72 y 1,6 mg/mL, siendo los extractos 30 y 32 los más activos. Los valores de las CMIqs calculadas para los extractos ensayados se presentan en la Tabla 6.2. De otro lado, los ensayos de difusión en agar con sensidiscos mostraron que ninguno de los extractos presentó inhibición del crecimiento del reportero CV-17, sugiriendo que la actividad inhibitoria de la expresión de la violaceína observada, corresponde a actividad inhibitoria del *quorum sensing*.

**Figura 6.1.** Actividad Inhibitoria del *quorum sensing* de extractos de cianobacterias bentónicas arrecifales contra *C. violaceum* CV-17. El color violeta indica que no hubo inhibición del *qs*. Las etiquetas C en la fila inferior corresponden a los controles, las etiquetas 1D o 2D corresponden a los controles con 1% o 2% de DMSO respectivamente. Los números en la fila superior indican el número correspondiente a cada extracto ensayado.



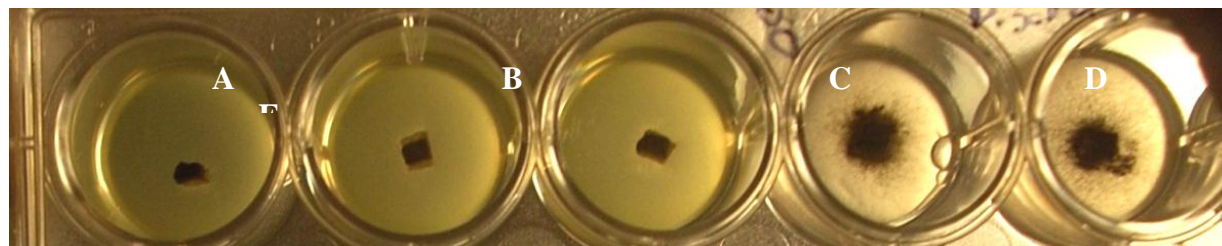
**Tabla 6.2.** Resultados del ensayo de inhibición del *quorum sensing* para CV-17, los valores corresponden al valor promedio  $\pm$  error estándar de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Extracto número	Concentración mínima inhibitoria del <i>qs</i> mg/ml
8	5,0 $\pm$ 0,2
9	> 6 (No inhibición)
11	> 6 (No inhibición)
30	0.7 $\pm$ 0,1
32	0.7 $\pm$ 0,1
36	> 6 (No inhibición)
38	1,5 $\pm$ 0,1
42	3,5 $\pm$ 0,3
43	4,1 $\pm$ 0.6

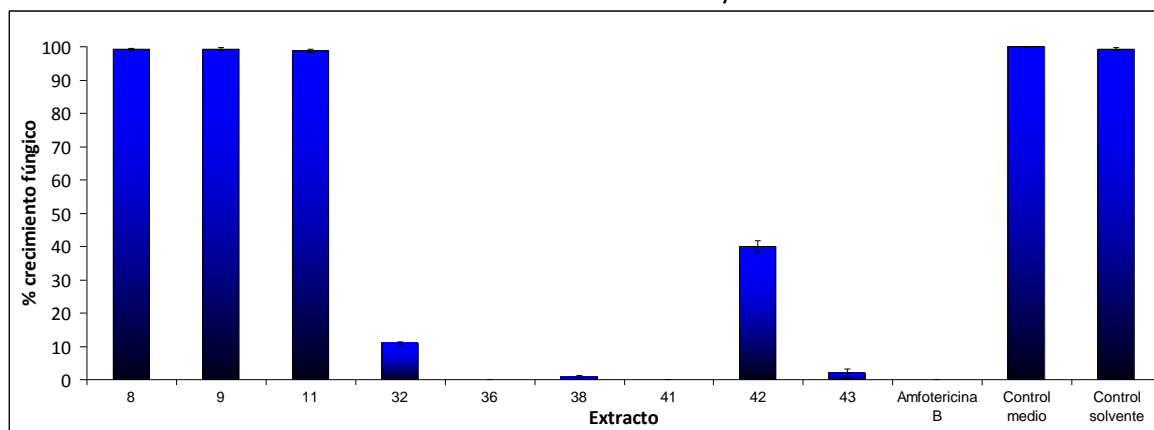
### 6.3.2. Evaluación de extractos de cianobacterias con actividad antifúngica

Para este ensayo se seleccionaron los mismos extractos empleados en la evaluación de la inhibición del *quorum sensing* (sección 6.1). De los 8 extractos de cianobacterias ensayados, 6 de ellos causaron una disminución significativa del crecimiento de *Dendryphiella salina* (Figura 6.2). Los extractos 32, 36, 38, 42 y 43 redujeron el crecimiento de las hifas en más de un 50%, y de éstos, los extractos 36, 38 y 43 mostraron tener actividad inhibitoria de crecimiento del hongo entre un 90 y 100%. Los extractos 8, 9 y 11 no presentaron ningún efecto inhibitorio en el crecimiento del hongo comparado con los controles. Los resultados del ensayo se presentan en la Figura 6.3.

**Figura 6.2.** Ensayo de actividad antifúngica de extractos de cianobacterias contra *Dendryphiella salina*. Los pozos A-C corresponden a tratamientos con el extracto 36 (*Lyngbya* spp.), y los pozos D y E corresponden a dos réplicas del control del medio YPM P/S con el hongo, sin la adición de ningún extracto. Se observa el desarrollo de las hifas en los pozos D y E comparado con la ausencia de crecimiento observado en los pozos A-C



**Figura 6.3.** Inhibición del crecimiento de *Dendryphiella salina* por extractos de cianobacterias marinas. Los extractos 36, 38, y 43 presentaron una fuerte actividad inhibitoria del crecimiento del hongo a una concentración de 1 mg/mL. Las barras muestran el error estándar. También se observa el crecimiento del 100% en los controles del medio y de solvente.



### 6.3.3. Aislamiento biodirigido de compuestos activos contra *D. salina* a partir de extractos de cianobacterias bentónicas arrecifales

Con base en los resultados obtenidos en ensayo con *Dendryphiella salina* y en la cantidad de extracto disponible, se decidió trabajar con los extractos 32, 36 y 42 para hacer el fraccionamiento biodirigido de los mismos y determinar qué fracciones y/o compuesto(s) fueron los responsables de su actividad antifúngica. Este trabajo se realizó en los laboratorios de Smithsonian Marine Station en Fort Pierce, Florida, con la colaboración del Profesor Sarath Gunasekera en julio y agosto de 2011.

Los extractos 32 (*S. hydroides* y *P. submembranaceum*), 36 (*Lyngbya* spp), y 42 (*Oscillatoria acuminata* y *Spirulina subsalsa*) fueron fraccionados de manera independiente, inicialmente por cromatografía líquida en columna usando sílica gel empleando un gradiente discontinuo de polaridad creciente hexano/AcOEt (80:20), hexano/AcOEt (50:50), AcOEt, AcOEt/MeOH (90:10) y MeOH para obtener 5 fracciones de cada extracto, de 200 mL cada una, las cuales fueron concentradas a presión reducida a 40°C. Posteriormente, se evaluó la actividad de cada fracción frente al hongo *D. salina*, siguiendo la metodología descrita anteriormente, donde cada fracción fue ensayada a una concentración final de 0,2 mg/mL (n=3) para determinar en qué fracciones se concentró la actividad antifúngica como se presenta en la Tabla 6.3.

La actividad antifúngica se concentró en la fracción 4 del extracto 32, en la fracción 5 del extracto 36 y en las fracciones 3 y 4 del extracto 42 (Tabla 6.3). Sin embargo, debido a la cantidad disponible de las fracciones del extracto 42, no fue posible continuar con el estudio biodirigido de este extracto, por lo que los esfuerzos se concentraron en estudiar las fracciones activas de los extractos 32 y 36.

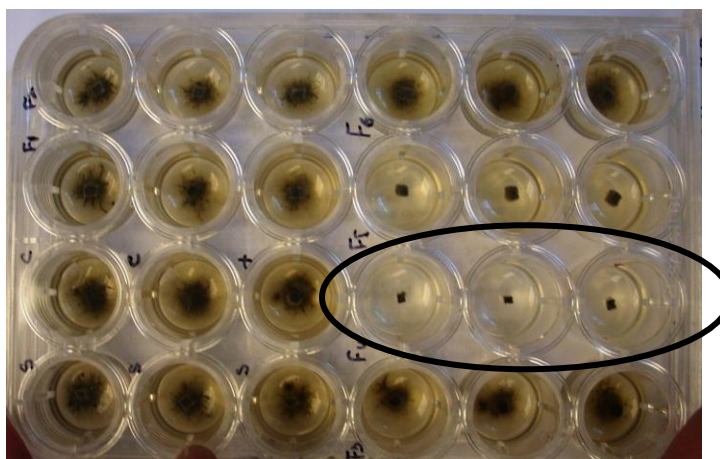
**Tabla 6.3.** Masa obtenida de las fracciones de los extractos 32, 36 y 42 obtenidas en el primer fraccionamiento mediante cromatografía en fase normal y porcentaje de inhibición de cada fracción sobre el crecimiento del hongo saprófito *D. salina*. Las fracciones obtenidas fueron evaluadas a una concentración de 0,2 mg/mL.

Fracción	30		36		42	
	Peso (mg)	% Inhibición	Peso (mg)	% Inhibición	Peso (mg)	% Inhibición
(1) Hex/AcOEt 80:20	90,3	0	14,8	0	14,4	0
(2) Hex/AcOEt 50:50	106,6	0	24,0	15	30,5	30
(3) AcOEt	26,8	0	8,2	0	<b>2,6</b>	<b>100</b>
(4) AcOEt/MeOH 10:90	<b>24,3</b>	<b>100</b>	16,0	30	<b>6,7</b>	<b>100</b>
(5) MeOH	565,0	0	<b>405,0</b>	<b>100</b>	289,0	0
Control de Medio de cultivo	NA	0	NA	0	NA	0

### 6.3.3.1. Fraccionamiento biodirigido del extracto de *Lyngbya* spp.

La fracción F5 (405 mg) del extracto 36 fue fraccionada utilizando cromatografía en columna en fase reversa. La separación se realizó utilizando un sistema de elución con polaridad decreciente: MeOH/H<sub>2</sub>O (10:90), MeOH/H<sub>2</sub>O (25:75), MeOH/H<sub>2</sub>O (50:50), MeOH/H<sub>2</sub>O (75:25), MeOH 100%, AcOEt 100%, para obtener 6 fracciones (F5.1 a F5.6) con volúmenes de 200 ml de cada una. Las fracciones obtenidas fueron concentradas y posteriormente evaluadas frente a *Dendryphiella salina* siguiendo la metodología descrita previamente a una concentración de 0,2 mg/mL (n=3). La actividad antifúngica se concentró en las fracciones F5.4 (60,5 mg) y F5.5 (32,8 mg), con una inhibición del 100% en el crecimiento de *D. salina*. (Figura 6.4).

**Figura 6.4.** Ensayo de inhibición del crecimiento del hongo *Dendryphiella salina*. Las fracciones 4 (encerrada en un óvalo) y 5 obtenidas del extracto 36 mostraron actividad inhibitoria.

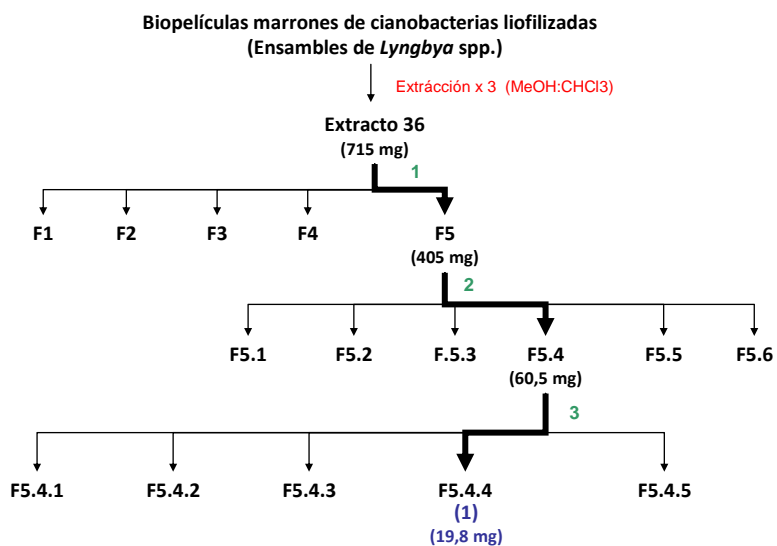


La fracción F5.4 fue posteriormente purificada por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) en fase reversa C-18 usando un equipo Waters con detector 2489Dual Lambda, una columna (Alltech Econosil RP-18 semipreparativa (250 x 10 mm, 5 $\mu$ m), eluyendo con una mezcla isocrática de MeOH/H<sub>2</sub>O (85:15) a un flujo de 3 mL/min, y con detección UV a 244 y 225 nm, obteniendo 5 subfracciones F5.4.1 a F5.4.5 (Figuras 6.5 y 6.6).

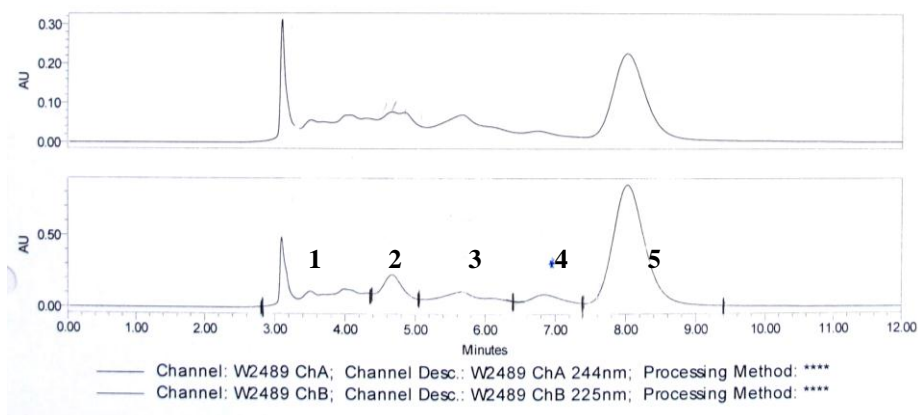
Las fracciones obtenidas mediante CLAE (F5.4.1 a F5.4.5) fueron evaluadas en el ensayo contra *D. salina* a una concentración de 0,2 mg/mL (n=3). Los resultados obtenidos en este ensayo, permitieron determinar que la fracción F5.4.2 tuvo un efecto inhibitorio del crecimiento del hongo en más de un 70%, y que las fracciones F5.4.3, F5.4.4 y F5.4.5 inhibieron totalmente el crecimiento fúngico. El proceso de fraccionamiento del extracto 36 se muestra en la Figura 6.5. Los resultados de las pruebas antifúngicas se muestran en la Figura 6.7.

Las fracciones más activas F5.4.3 a F5.4.5 fueron evaluadas mediante Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN-<sup>1</sup>H usando MeOD, 600 MHz, JEOL). Los espectros obtenidos permitieron determinar que las fracciones F5.4.3 y F5.4.5 no correspondieron a compuestos puros, por lo cual no se continuó con la identificación de los compuestos presentes en tales fracciones.

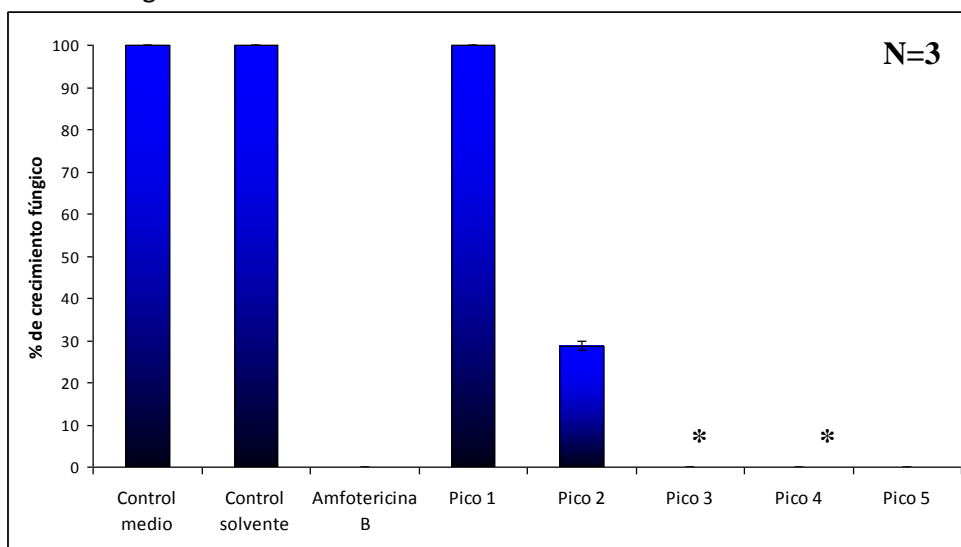
**Figura 6.5.** Diagrama del fraccionamiento bioguiado del extracto 36 (*Lyngbya* spp). Mediante el ensayo de inhibición contra el hongo marino *Dendryphiella salina*, se logró aislar finalmente el compuesto **(1)**. La actividad antifúngica se representa con líneas más gruesas. Números en verde: **1.** CC. Sílica gel hexano/AcOEt (80:20)-(0:100), AcOEt/MeOH (100:0) - (0:100). **2.** CC. Fase reversa MeOH/H<sub>2</sub>O (10:90) - (100/0), MeOH/AcOEt (100/0) - (0-100). **3.** CLAE en fase reversa semipreparativa isocrática MeOH/H<sub>2</sub>O (85:15).



**Figura 6.6.** Cromatograma de la separación de la fracción 5.4 mediante CLAE utilizando una columna Alltech Econosil RP-18 semipreparativa (250 x 10 mm, 5 $\mu$ m), sistema isocrático con MeOH/H<sub>2</sub>O (85:15), flujo 3 mL/min, inyección 50  $\mu$ L). El cromatograma superior corresponde al registro del detector a 244 nm, el cromatograma inferior corresponde al registro a 225 nm. Los números (1-5) indican las fracciones recolectadas (F5.4.1 a F5.4.5).



**Figura 6.7.** Resultados de la evaluación de la actividad antifúngica contra *Dendryphiella salina* de las cinco fracciones obtenidas por CLAE a partir de la fracción F5.4 del extracto 36. Las fracciones F5.4.3 a F5.4.5 marcadas con asteriscos mostraron la mayor actividad con una inhibición total del crecimiento del hongo. Las barras muestran el error estándar.

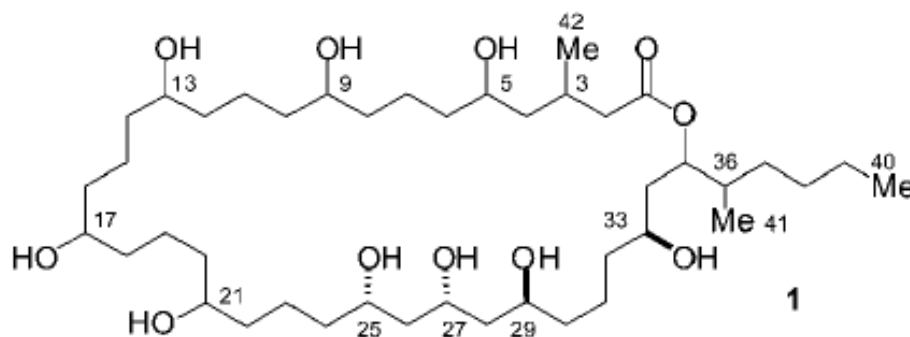


De otro lado, la fracción F5.4.4 presentó un espectro que sugirió que correspondía a un compuesto puro, cuya identificación se inició a partir de análisis del espectro de masas de baja resolución con ionización *electrospray* y analizador de masas de trampa de iones, tomado en un equipo LTQ (Thermo Electron Finnigan). El espectro de la fracción F5.4.4 mostró los iones con masas en  $m/z$  763 y 785 correspondientes a los iones  $[M+H]^+$  y  $[M+Na]^+$ , sugiriendo la presencia de un compuesto mayoritario (compuesto **1**) de masa molecular 762 u. La búsqueda en bases de datos especializadas en compuestos de origen marino (MARINLIT data base) arrojó como resultado que el compuesto **1** podría ser el caylobolido A, un policétido originalmente aislado de



una cianobacteria identificada como *Lyngbya majuscula* recolectada en las Bahamas (MacMillan y Molinski, 2002). Con el fin de corroborar esta identificación preliminar, se tomó el espectro de RMN-<sup>1</sup>H (MeOD, 600 MHz, JEOL), el cual confirmó que la fracción F5.4.4 correspondía a un único compuesto con señales para nueve protones enlazados a heteroátomos en  $\delta_H$  5,13, 3,96, 3,80, 3,72, 3,60, 3,52 ( $\times 4$ ), junto con señales para un CH<sub>2</sub> en  $\delta_H$  2,33 y 2,13 y varios multipletes a campo alto. De otra parte, el espectro de RMN-<sup>13</sup>C (MeOD, 150 MHz, JEOL) permitió observar señales para un carboxilo en  $\delta_C$  173,6, 10 carbonos unidos a oxígeno en  $\delta_C$  74,4, 71,0, 70,9, 70,8, 70,6, 69,3, 68,6, 6,6, 67,6, 67,1, además de señales para 28 carbonos asignados a metinos, metilenos, Junto con tres metilos en  $\delta_C$  18,5, 13,9 y 13,1 para un total de 42 carbonos. La comparación de los datos de RMN-<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C con los datos de literatura reportados en DMSO-*d*<sub>6</sub> permitió confirmar al compuesto **1** como caylobolido A (Figura 6.8) (MacMillan y Molinski, 2002).

**Figura 6.8** Estructura del caylobolido A (MacMillan y Molinski, 2002).

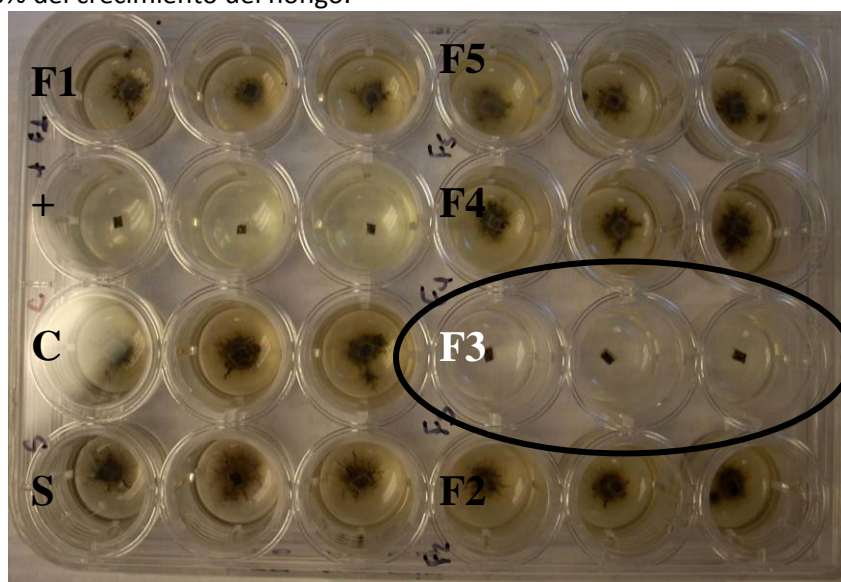


Resulta interesante resaltar que para este compuesto aún no ha sido asignada la estereoquímica absoluta y sólo se conoce la estereoquímica relativa de los carbonos 25, 27, 29 y 33.

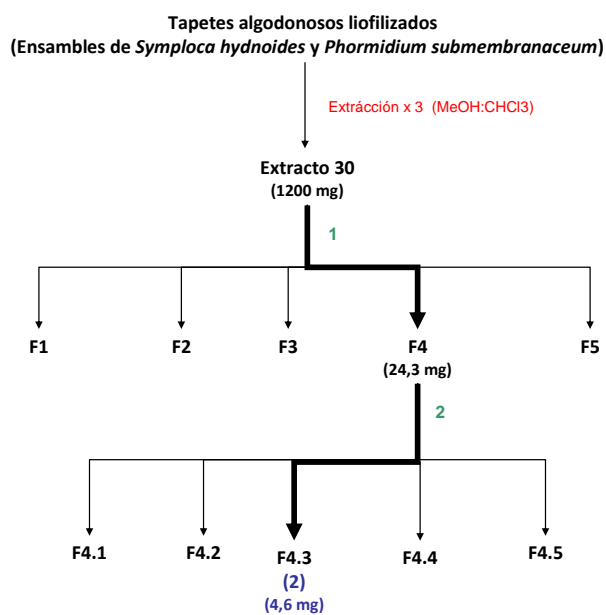
### 6.3.3.2. Resultados del fraccionamiento biodirigido del extracto de *Symploca hydroides* y *Phormidium submembranaceum*

La fracción 4 (24,3 mg) obtenida por cromatografía en columna en fase normal a partir del extracto 32 (Tabla 6.3) fue posteriormente fraccionada utilizando cromatografía en columna abierta en fase reversa. La separación se realizó utilizando un sistema de elución con polaridad decreciente: MeOH/H<sub>2</sub>O (50:50), MeOH/H<sub>2</sub>O (75:25), MeOH/H<sub>2</sub>O (90:10), MeOH 100%, AcOEt 100%, para obtener 5 fracciones (F4.1 a F4.5) con volúmenes de 200 ml de cada una. Las cinco fracciones obtenidas fueron concentradas y posteriormente evaluadas frente *Dendryphiella salina* siguiendo la metodología descrita previamente a una concentración de 0,2 mg/mL (n=3). La actividad se concentró en la fracción F.4.3 (4.6 mg) eluída con MeOH/H<sub>2</sub>O (90:10). Esta fracción inhibió en un 100% el crecimiento del hongo a la concentración ensayada (Figura 6.9). Un diagrama del fraccionamiento se presenta en la Figura 6.10. Esta fracción fue analizada por RMN-<sup>1</sup>H (MeOD, 600 MHz, JEOL), lo cual permitió determinar que se trataba de un compuesto puro (compuesto **2**), cuya elucidación estructural se presenta a continuación.

**Figura 6.9.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *Dendryphiella salina* por las fracciones provenientes de la fracción 4 del extracto 30 en fase reversa.. S: control de solvente. C: Control del medio. +: Control positivo con amfotericina B. F1-F5: Fracciones 1-5 ensayadas a una concentración de 0.2 mg/ml. La fracción 3 (encerrada en un óvalo) fue la más activa dado que inhibió el 100% del crecimiento del hongo.



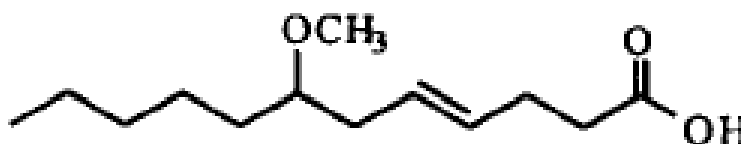
**Figura 6.10.** Diagrama del fraccionamiento bioguiado del extracto 30 utilizando el hongo marino *Dendryphiella salina* Lyngbya spp. para obtener finalmente el compuesto (2). La actividad antifúngica se sigue mediante las líneas más gruesas. Números en verde: 1. CC. Sílica gel, hexano/AcOEt (80:20) – (0:100) AcOEt/MeOH (100:0) - (0:100). 2. CC. Fase reversa MeOH/H<sub>2</sub>O (10:90) – (100/0), MeOH/AcOEt (100/0) – (0-100).



Los espectros de RMN-<sup>1</sup>H mostraron señales para protones sobre carbonos olefínicos en  $\delta_H$  5,48, un protón sobre un carbono unido a un heteroátomo en  $\delta_H$  3,17, junto con señales en  $\delta_H$  2,31, 2,30, 1,30, 1,27 y 0,88 características de cadenas alifáticas. De otro lado, el espectro de RMN-<sup>13</sup>C (MeOD, 150MHz, JEOL) permitió observar señales para un carboxilo en  $\delta_C$  175,7, señales para carbonos olefínicos en 130,8 y 127,1, un carbono unido a oxígeno en  $\delta_C$  80,1, un metoxilo en  $\delta_C$  55,3, además de señales para carbonos asignados a metinos y metilenos en  $\delta_C$  36,1, 33,7 33,0, 31,2, 27,8, 24,6, 22,3 y la señal correspondiente a un metilo en 13,0 para un total de 13 carbonos.

La búsqueda en bases de datos especializadas en compuestos de origen marino (MARINLIT data base) a partir de los desplazamientos en RMN arrojó como resultado que el compuesto **2** correspondió al ácido 7-metoxi-4-dodecenóico (Figura 6.11), compuesto previamente aislado a partir de muestras de *Lyngbya majuscula* recolectadas en la costa mediterránea de Francia (Mesguiche *et al.* 1999).

**Figura 6.11.** Estructura del ácido 7-metoxi-4-dodecenóico (**2**), aislado en el presente trabajo a partir del extracto 32 obtenido a partir de un ensamble de *Symploca hydroides* y *Phormidium submembranaceum* (Mesguiche *et al.* 1999).

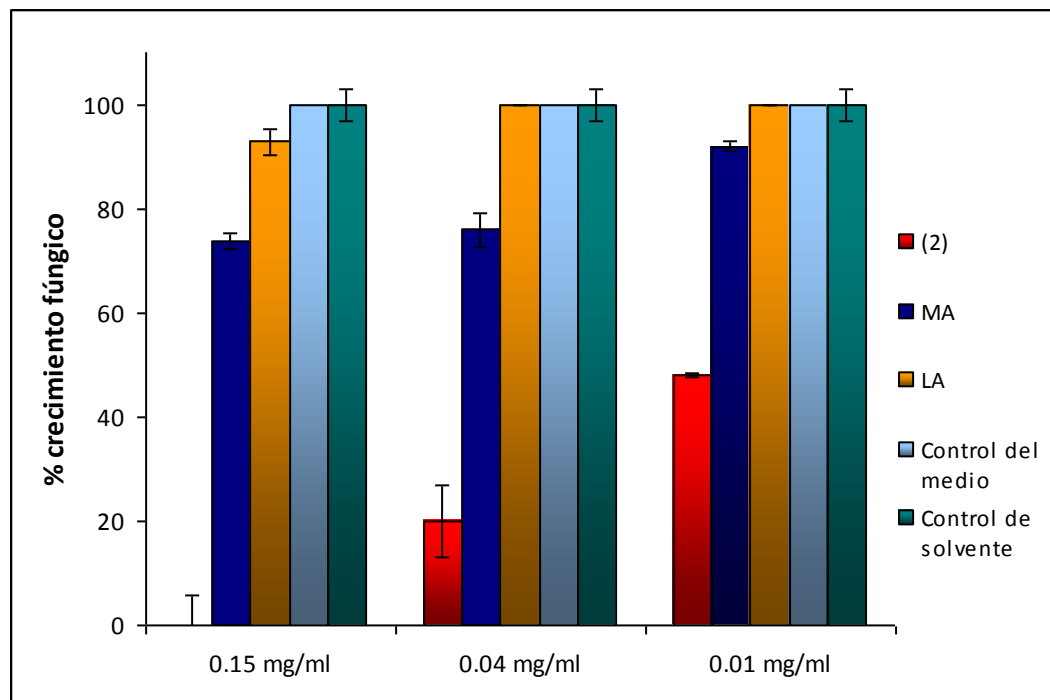


En ensayos posteriores realizados en este trabajo, se comparó la actividad antifúngica del ácido 7-metoxi-4-dodecenóico (**2**) contra el hongo *D. salina*, con la actividad de otros dos compuestos también aislados también de cianobacterias marinas identificadas como *Lyngbya majuscula*, el ácido lyngbico (Cardellina *et al.*, 1978) y la malyngamida B (Kwan *et al.*, 2011), facilitados por la profesora Valerie Paul y el profesor Sarath Gunasekera de la estación marina del Smithsonian en Fort Pierce. En el ensayo se emplearon tres concentraciones diferentes para cada uno de los compuestos (0,15, 0,04 y 0,01 mg/mL) (Figura 6.12).

Los resultados mostraron que el ácido 7-metoxi-4-dodecenóico (**2**), presentó actividad antifúngica contra *D. salina*, mostrando una inhibición de cerca del 50% del crecimiento a una concentración de 0,01 mg/mL, 80% a 0,04 mg/mL y del 100% a una concentración de 0,15 mg/mL, a partir de lo cual se infirió que la  $CI_{50}$  para este compuesto se encuentra entre 0,01 y 0,04 mg/mL.

Adicionalmente, el compuesto **2** presentó menor actividad antifúngica que la anfotericina B utilizado en este ensayo como control positivo el cual causa inhibición del 100% del crecimiento fúngico a concentraciones por encima de 0,0032 mg/mL (Meickle *et al.*, 2009).

**Figura 6.12.** Comparación de la actividad antifúngica (promedio  $\pm$  error estándar) de tres compuestos puros aislados de cianobacterias marinas contra el hongo marino *Dendryphiella salina*: **(2)** ácido 7 metoxi-4- dodecenóico aislado del extracto 32. **(MA)** malyngamida B. **(LA)** ácido lyngbico aislados de *Lyngbya majuscula*.



De acuerdo con estos resultados el ácido 7-metoxi-4-dodecenóico (compuesto **2**) presentó una actividad antifúngica más potente que la malyngamida B y el ácido lyngbico, con la inhibición del 100% de crecimiento a la mayor concentración ensayada e incluso logró disminuir el crecimiento del hongo en un 50% a una concentración de 0,01 mg/mL. De otro lado, la malyngamida B mostró una actividad antifúngica mayor que la del ácido lyngbico, con porcentajes de inhibición entre el 25 y 20% a concentraciones de 0,15 y 0,04 mg/mL, mientras que el ácido lyngbico logró inhibir cerca del 10% del crecimiento de *D. salina* a la mayor concentración ensayada (0,15 mg/mL).

## 6.4. Discusión

### 6.4.1. Inhibición del *quorum sensing* por extractos de cianobacterias

Debido a que los organismos marinos están expuestos constantemente la colonización o ataque por parte de microorganismos, la producción de compuestos químicos como los inhibidores del *qs* que cumplan un papel defensivo contra dichas amenazas podría constituir una importante adaptación para garantizar la supervivencia de los organismos marinos, sobretodo aquellos que no poseen un sistema inmune tales como las algas y cianobacterias marinas (resumido en Hentzer *et al.*, 2003).

En este trabajo se encontró que la mayoría de los extractos evaluados a concentraciones menores a 6 mg/mL, presentaron actividad inhibitoria del *qs*, lo cual sugiere que las cianobacterias marinas podrían constituir una fuente potencial de *lqs* que podrían tener aplicaciones en la industria farmacéutica por ejemplo (Tabla 5.2).

La actividad inhibitoria del *qs* encontrada para los extractos 30 y 32, obtenidos a partir de ensambles de las cianobacterias *S. hydroides* y *P. Submembranaceum*, con CMI<sub>qs</sub> de 0,72 y 0,79 mg/mL, respectivamente, fue similar a la reportada para extractos de cianobacterias recolectadas de aguas termales en el Sultanato de Omán que mostraron una CL<sub>50</sub> en torno a 0,8 mg/mL. Ambos ensayos se realizaron con la misma cepa de *C. violaceum* CV-17 usando el mismo procedimiento (Dobretsov *et al.*, 2011).

En otro trabajo similar, Dobretsov *et al.* (2010) encontraron que 19 de 25 extractos obtenidos de tapetes de cianobacterias marinas recolectadas en el sur de la Florida (EEUU), Omán y Belize, inhibieron el *qs* utilizando el mismo reportero *C. violaceum* CV-17. En ese estudio, los autores encontraron CMI<sub>qs</sub> bajas en extractos obtenidos a partir de *Symploca hydroides* y *Lyngbya* sp. recolectados en Fort Lauderdale y Fort Pierce Florida. Abed *et al.* (2011) ensayaron extractos obtenidos de tapetes de cianobacterias aisladas de lagos hipersalinos en Omán, compuestos por varias especies de cianobacterias incluyendo *Microcoleus chthonoplastes*, *Spirulina subsalsa*, *Johannesbaptistia pellucida*, *Chroococcidiopsis* sp., *Aphanocapsa* sp., *Chroococcus* sp., *Gloeocapsa* sp., *Schizothrix* sp. y *Leptolyngbya* sp. Algunos extractos presentaron inhibición del *qs* usando el reportero *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4) incluso a la menor concentración evaluada (1-10 mg/mL). Sin embargo, ningún extracto causó una inhibición del *qs* al reportero *C. violaceum* CV-17 incluso a concentraciones tan altas como 150 mg/mL. Esto sugiere que las cianobacterias recolectadas en diferentes localidades del Caribe colombiano podrían tener un mayor potencial como productores de compuestos inhibidores del *qs* que las recolectadas por Abed *et al.* (2011).

#### 6.4.2. Evaluación de extractos de cianobacterias con actividad antifúngica

El extracto 36 obtenido de ensambles de *Lyngbya cf confervoides* y *Lyngbya majuscula*, presentó una fuerte actividad antifúngica inhibiendo en un 100% el crecimiento de *D. salina*. A partir de cianobacterias identificadas como *L. majuscula*, se han aislado compuestos con actividad antifúngica como las microcolinas A y B (Meickle *et al.*, 2009). Por su parte, el extracto 32 obtenido de tapetes de cianobacterias compuestos por *Symploca hydroides* y *Phormidium submembranaceum* de la Isla de Providencia. Este extracto presentó una fuerte actividad inhibitoria del crecimiento de *D. salina*. Hasta el momento no se han realizado estudios de actividad antifúngica por parte de ninguna de las especies nombradas anteriormente. En cuanto a los extractos 8 y 9, los cuales fueron previamente estudiados en otros trabajos derivados del proyecto de investigación, demostraron no tener actividad contra *D. salina*, sugiriendo que si bien las almiramidas que fueron los principales compuestos en tales extractos, presentaron actividad contra *Artemia salina* y citotoxicidad contra líneas de células tumorales, podrían no tener actividad antifúngica (Quintana *et al.*, 2013; Ramos *et al.*, 2013).

Pocos trabajos han logrado evidenciar el papel defensivo de extractos y compuestos aislados de algas y pastos marinos contra cepas de hongos identificadas como patógenos marinos. Engel *et al.*, (2006) ensayaron 104 extractos (hidrofílicos y lipofílicos) provenientes de 49 especies de algas

marinas rojas, verdes y pardas y 3 especies de pastos marinos recolectados en las Bahamas, encontrando que sólo 10 extractos del total causaron una inhibición mayor al 50 % del crecimiento de *D. salina* a las concentraciones naturales de los extractos en relación al volumen de la biomasa extraída. Sus resultados sugieren que *D. salina* fue el hongo marino menos susceptible a ser inhibido por los extractos ensayados, ya que las otras dos especies de hongos marinos utilizados para los ensayos antifúngicos, el patógeno ascomiceto *Lindra thalassiae* y el oomiceto *Halophytophthora spinosa* fueron inhibidos por 18 y por 60 extractos respectivamente (Engel *et al.*, 2006).

Puglisi *et al.* (2007) ensayaron 112 extractos lipofílicos e hidrofílicos aislados de 54 especies de algas rojas, verdes y pardas y 2 especies de pastos marinos recolectados en arrecifes del Indo-Pacífico cercanos a la isla de Guam, contra diferentes microorganismos patógenos marinos, entre ellos el hongo *D. salina*, encontrando que el 44 % de los extractos ensayados presentaron actividad antifúngica contra *D. salina*. En otro trabajo Ross *et al.*, (2008) probaron extractos crudos de 5 especies de pastos marinos recolectados en el Indian River Lagoon, Florida y ensayaron su actividad antifúngica contra 9 especies de hongos que coocurren en la zona incluyendo a *D. salina*. Los autores encontraron que ninguno de los extractos de pastos marinos inhibió el crecimiento de *D. salina*. Estos resultados sugieren que el hongo *D. salina* puede considerarse un buen modelo de experimentación por ser una especie cosmopolita y presentar una alta resistencia a extractos o compuestos de organismos con los cuales puede coexistir.

En el presente trabajo se encontró que seis de los nueve extractos de cianobacterias marinas ensayados inhibieron en más del 50% el crecimiento de *D. salina*. Estos resultados sugieren que las cianobacterias, en comparación con las algas y los pastos marinos, pueden ser muy eficientes al momento de defenderse frente a posibles microorganismos patógenos

### **6.4.3. Aislamiento biodirigido de compuestos activos contra *D. salina* a partir de extractos de cianobacterias bentónicas arrecifales**

El conocimiento del papel antifúngico de compuestos y extractos producidos por cianobacterias marinas se ha concentrado en su mayoría a ensayos con un énfasis farmacéutico, donde generalmente se han utilizado diferentes cepas del hongo patógeno *Candida* que infecta comúnmente al hombre (Milligan *et al.*, 2000; McMillan y Molinski, 2002; McMillan y Molinski, 2005). Estos patógenos no constituyen un riesgo natural para las cianobacterias (Engel *et al.*, 2002; Carballeira, 2008; Nagarajan *et al.*, 2012). En este sentido, y con relación a los resultados previamente presentados Meickle *et al.* (2009) ensayaron la actividad antifúngica de las microcolinas A y B aisladas de la *Lyngbya* cf. *polycrha* contra el hongo *Dendryphiella salina* siguiendo la misma metodología utilizada en el presente trabajo. Los autores encontraron que la  $CI_{50}$  de las microcolinas A y B se estuvo por encima de los 0,2 mg/mL. Los resultados aquí presentados muestran que el ácido 7-metoxi-4-dodecenóico (**2**) aislado del extracto 32 (*Symploca hydroides* y *Phormidium submembranaceum*) presentó una actividad antifúngica mas potente que los compuestos ensayados por Meickle *et al.* (2009), ya que logró inhibir el crecimiento el hongo en cerca del 50% a una concentración de 0,01 mg/mL y en un 100% a 0,15 mg/mL. De igual manera, el caylobólido A (**1**) aislado del extracto 36 (*Lyngbya* spp.) resultó tener un mayor

efecto antifúngico que las microcolinas A y B, ya que inhibió el 100% del crecimiento de *D. salina* a una concentración de 0,2 mg/mL.

Estos resultados sugieren que tanto el caylobolido A (**1**) como el ácido 7-metoxi-4-dodecenóico (**2**), podrían constituir ejemplos de compuestos empleados como mecanismos de defensa por parte de las cianobacterias contra el eventual ataque de hongos patógenos marinos. Estas defensas, podrían conferir una ventaja ecológica para los ensamblajes de cianobacterias que las produzcan.

McMillan y Molinsky (2002), quienes inicialmente aislaron el compuesto caylobolido A, evaluaron su actividad antifúngica contra los hongos patógenos humanos *Candida albicans* y *C. glabrata*, encontrando que el compuesto no presentó actividad contra ninguno de los hongos. Sin embargo, en este trabajo se encontró que el caylobolido A tuvo una actividad antifúngica contra el hongo marino *D. salina* inhibiendo en un 100% el crecimiento del hongo a una concentración de 0,2 mg/ml. La actividad antimicrobiana de extractos aislados de organismos marinos parece ser mayor cuando se prueba contra microorganismos ecológicamente relevantes que contra microorganismos biomédicamente relevantes (resumido en Puglisi *et al.*, 2007), sugiriendo que su producción busca como resultado una acción específica para el control de ciertas especies que podrían ser patógenos como resultado de las presiones evolutivas selectivas que actúan sobre los organismos marinos (Puglisi, *et al.*, 2007).

Las cianobacterias marinas producen compuestos bioactivos que pueden cumplir diversas funciones ecológicas como la defensa contra la herbivoría, contra posibles patógenos, o alelopáticas que les permite competir eficientemente con otros organismos por recursos como el sustrato. Los extractos de cianobacterias marinas arrecifales recolectadas en algunos afloramientos del Caribe colombiano, mostraron tener actividad inhibitoria del *qs* frente a *Chromobacterium violaceum* y antifúngica frente a *Dendryphiella salina*. La producción de metabolitos con actividad selectiva podrían conferirles ciertas ventajas ecológicas muy importantes para la formación y permanencia de afloramientos en los ambientes arrecifales.

La obtención de compuestos con actividad antifúngica presentada en este trabajo constituye un aporte importante al conocimiento del papel defensivo contra bacterias y hongos patógenos marinos por parte de las cianobacterias. Además estos resultados son la base para futuros estudios con el objetivo de aislar y caracterizar eventuales compuestos antimicóticos presentes en los extractos de cianobacterias marinas.

## 6.5. Bibliografía

Abed RMM, Dobrestov S, Al-Kharusi S, Schramm A, Jupp B, Golubic S. 2011. Cyanobacterial diversity and bioactivity of inland hypersaline microbiol mats from a desert stream in the Sultanate of Oman. *Fottea*, 11(1): 215–224.

Aráoz R, Molgó J, Tandeau de Marsac N. 2010. Neurotoxic cyanobacterial toxins. *Toxicon*, 56: 813-828.

- Burgess JG, Jordan EM, Bregu M, Mearns-Spragg A, Boyd KG. 1999. Microbial antagonism: a neglected avenue of natural products research. *Journal of Biotechnology*, 70: 27–32.
- Carballeira NM. 2008. New advances in fatty acids as antimalarial, antimycobacterial and antifungal agents. *Progress in Lipid Research*, 47: 50–61.
- Cardellina, J. H., II, D. Dalietos, F.-J. Marner, J. S. Mynderse, and R. E. Moore. 1978. (-)-Trans-7(S)-methoxytetradec-4-enoic acid and related amides from the marine cyanophyte *Lyngbya majuscula*. *Phytochemistry*, 17: 2091–2095.
- Dobretsov S, Teplitski M, Paul VJ. 2009. Mini-review: quorum sensing in the marine environment and its relationship to biofouling. *Biofouling*, 25 (5): 413-427.
- Dobrestov S, Teplitski M, Alagely Ali, Gunasekera SP, Paul VJ. 2010. Malyngolide from the cyanobacterium *Lyngbya majuscula* interferes with quorum sensing circuitry. *Environmental Microbiology Reports*, 2 (6): 739-744.
- Dobrestov S, Abed R, Al Maskari Sultan M, Al Sabahi J, Reginald V. 2011. Cyanobacterial mats from hot springs produce antimicrobial compounds and quorum-sensing inhibitors under natural conditions. *Journal of Applied Phycology*, 23: 983-993.
- Engel S, Jensen PR, Fenical W. 2002. Chemical ecology of marine microbial defense. *Journal of Chemical Ecology*, 28(10): 1971-1985.
- Engel S, Puglisi M, Jensen P, Fenical W. 2006. Antimicrobial activities of extracts from tropical Atlantic marine plants against marine pathogens and saprophytes. *Marine Biology*, 149: 991-1002.
- Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nature Reviews-Microbiology*, 8: 623-633.
- Gulve RM, Deshmukh AM. 2012. Antimicrobial activity of the marine actinomycetes. *International Multidisciplinary Research Journal*, 2(3):16-22.
- Hagmann L, Jüttner F. 1996. Fischerellin A, a novel photosystem-II-inhibiting allelochemical of the cyanobacterium *Fischerella muscicola* with antifungal and herbicidal activity. *Tetrahedron Letters*, 37(36): 6539-6542.
- Harder T, Lau SCK, Dobretsov S, Fang TszK, Qian PY. 2003. A distinctive epibiotic bacterial community on the soft coral *Dendronephthya* sp. and antibacterial activity of coral tissue extracts suggest a chemical mechanism against bacterial epibiosis. *FEMS Microbiology Ecology*, 43: 337-347.
- Hentzer M, Givskov M. 2003. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(9): 1300-1307.
- Hentzer M, Wu H, Andersen JB, Riedel K, Rasmussen TB, Bagge N, Kumar N, Schembri MA, Song Z, Kristoffersen P, Mane M, Costerton JW, Molin S, Eberl L, Steinberg P, Kjelleberg S, Hùiby N,



- Givskov M. 2003. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors The European Molecular Biology Organization Journal, 22(15): 3803-3815.
- Hughes, C., Fenical, W. 2010. Antibacterials from the Sea. Chemical European Journal, 16: 12512-12525.
- Jensen PR, Jenkins KM, Porter D, Fenical W. 1998. Evidence that a new antibiotic flavone glycoside chemically defends the sea grass *Thalassia testudinum* against zoosporic fungi. Applied and Environmental Microbiology, 64(4): 1490-1496.
- Kubaneck J, Jensen PR, Keifer PA, Sullards MC, Collins DO, Fenical W. 2003. Seaweed resistance to microbial attack: A targeted chemical defense against marine fungi. Proceedings of the National Academy of Sciences. 100(12): 6916-6921.
- Kwan JC, Meickle T, Ladwa D, Teplitski M, Paul V, Luesch H. 2011. Lyngbyoic acid, a "tagged" fatty acid from a marine cyanobacterium, disrupts quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. Molecular BioSystems, 7: 1205-1216.
- MacMillan JB, Molinski TF. 2002. Caylobolide A, a unique 36-membered macrolactone from a bahamian *Lyngbya majuscula*. Organic Letters, 4(9): 1535-1538.
- MacMillan JB, Molinski TF. 2005. Majusculoic acid, a brominated cyclopropyl fatty acid from a marine cyanobacterial mat assemblage. Journal of Natural Products, 68: 604-606.
- Mayer AMS, Rodríguez AD, Berlinck RGS, Hamann MT. 2009. Marine pharmacology in 2005-6: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. Biochimica et Biophysica Acta, 1790: 283-308.
- Meickle T, Matthew S, Ross C, Luesch H, Paul, VJ. 2009. Bioassay-guided Isolation and Identification of Desacetyl-Microcolin B from *Lyngbya cf. polychroa*. Planta Médica, 75(13): 1427-1430.
- Mesguiche V, Valls R, Piovetti L, Peiffer G. 1999. A Characterization and synthesis of (-)-7-methoxydodec-4(E)-enoic acid, a novel fatty acid isolated from *Lyngbya majuscula*. Tetrahedron Letters, 40: 7473-7476.
- Milligan KE, Márquez BL, Williamson RT, Gerwick WH. 2000. Lyngbyabellin B, a toxic and antifungal secondary metabolite from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. Journal of Natural Products, 63: 1440-1443.
- Nagarajan M, Maruthanayagam V, Sundararaman M. 2012. A review of pharmacological and toxicological potentials of marine cyanobacterial metabolites. Journal of Applied Toxicology, 32: 153-185.

- Natrah FMI, Defoirdt T, Sorgeloos P, Bossier P. 2011. Disruption of bacterial cell-to-cell communication by marine organisms and its relevance to aquaculture. *Marine Biotechnology*, 13:109–126.
- Osorno O, Ramos FA, Castellanos L, Arévalo-Ferro C. 2012, Gas Chromatography as a Tool in Quorum Sensing Studies. En: Salih B (Ed). *Gas Chromatography - Biochemicals, Narcotics and Essential Oils*. InTech, DOI: 10.5772/32833.
- Puglisi MP, Tan LT, Jensen PR, Fenical W. 2004. Capisterones A and B from the tropical green alga *Penicillus capitatus*: Unexpected anti-fungal defenses targeting the marine pathogen *Lindera thalassiae*. *Tetrahedron*, 60: 7035–7039.
- Puglisi MP, Engel S, Jensen PR, Fenical W. 2007. Antimicrobial activities of extracts from Indo-Pacific marine plants against marine pathogens and saprophytes. *Marine Biology*, 150: 531–540.
- Quintana J., Bayona L.M., Castellanos L., Puyana M., Camargo P., Arisitizabal, F., Edwards C., Tabudravu J.N., Jaspars M., Ramos F.A., 2013. Almiramides D-E, cytotoxic peptides from the marine cyanobacterium *Oscillatoria nigroviridis*. *Phytochemistry*. (submitted).
- Ramos F.A., Quintana J., Bayona, L.M., Osorno O., Castellanos L., Prato. J., Puyana M., Ramírez M., Aristizabal., F., Jaspars M. 2013. Preliminary assessment of the toxicity of marine benthic cyanobacteria from the colombian Caribbean Sea. *Harmful algae*. (submitted).
- Rastogi RP, Sinha RP. 2009. Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 27: 521-539.
- Reacher MH, Shah A, Livermore DM, Wale MCJ, Graham C, Johnson AP, Heine H, Monnickendam MA, Barker KF, James D, George RC. 2000. Bacteraemia and antibiotic resistance of its pathogens reported in England and Wales between 1990 and 1998: Trend analysis. *BMJ*, 320: 213-216.
- Ross C, Puglisi MP, Paul VJ. 2008. Antifungal defenses of seagrasses from the Indian River Lagoon, Florida. *Aquatic Botany*, 88: 134–141.
- Skindersoe ME, Ettinger-Epstein P, Rasmussen TB, Bjarnsholt T, de Nys R, Givskov M. 2008. Quorum sensing antagonism from marine organisms. *Marine Biotechnology*, 10: 56–63.
- Stauff DL, Bassler BL. 2011. Quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*: DNA recognition and gene regulation by the CviR receptor. *Journal of Bacteriology*, 193(15): 3871–3878.
- Williams P. 2007. Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial World. *Microbiology*, 153: 3923–3938.

## 7. Conclusiones y recomendaciones

Durante los muestreos realizados de 2009 a 2011 en las Islas del Rosario, San Andrés y Providencia, se observaron afloramientos de cianobacterias marinas representados principalmente por seis tipos de tapetes que crecían sobre diferentes tipos de sustratos incluyendo otros organismos como algas y corales.

Los tapetes de cianobacterias encontrados, estaban conformados por ensambles de más de una especie de cianobacterias. Los géneros que formaron los tapetes de cianobacterias arrecifales encontrados en este trabajo son *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Symploca*, *Spirulina* y *Blennothrix*.

A través de la identificación morfológica de las cianobacterias que formaron los afloramientos en el Caribe colombiano, se lograron identificar 11 especies de cianobacterias (*Lyngbya majuscula*, *L. sordida*, *L. confervoides*, *Oscillatoria margaritifera*, *O. nigroviridis*, *O. acuminata*, *Symploca hydroides*, *Phormidium submembranaceum*, *P. gracile*, *Spirulina subsalsa* y *Blennothrix glutinosa*), de las cuales cinco especies (*Oscillatoria margaritifera*, *Oscillatoria nigroviridis*, *Phormidium gracile*, *Oscillatoria acuminata* y *Blennothrix glutinosa*) son nuevos reportes para el Caribe colombiano.

Mediante los análisis moleculares a partir de las secuencias del DNAr 16s de las muestras analizadas, se confirmó la presencia de las especies *L. majuscula*, *L. sordida* y *Symploca hydroides* en las muestras, estas identidades estuvieron de acuerdo con los resultados obtenidos mediante la identificación morfológica.

Los tapetes de cianobacterias más abundantes en las Islas del Rosario fueron los tapetes rojizos de filamentos gruesos (*Lyngbya majuscula* y *L. sordida*), mientras que en Providencia, particularmente en la estación Pináculos, los tapetes algodonosos fueron los más abundantes. Las biopelículas marrones y rojas fueron muy abundantes y comunes en las estaciones de San Andrés y Providencia sobretodo sobre sustratos planos, estas biopelículas llegaron a alcanzar hasta un 46% de cobertura en conjunto, superando ampliamente la cobertura de coral y de algas en la zona.

La abundancia de cianobacterias arrecifales está directamente relacionada con aumentos en la temperatura y en los niveles de nutrientes (fosfatos y nitratos) en el agua.

La mayoría de extractos orgánicos de los tapetes de cianobacterias recolectados, resultaron ser tóxicos para *Artemia salina*, estos extractos resultaron en general, ser más tóxicos que los reportados en la literatura.

Algunos tapetes de cianobacterias encontrados en las estaciones de muestreo mostraron estar protegidos químicamente contra la herbivoría, ya que sus extractos mostraron ejercer un efecto disuasor al consumo por parte de los herbívoros ensayados. Así, los extractos 32 (*S. hydroides* y *P. submembranaceum*) y 43 (*L. majuscula* y *L. sordida*) resultaron tener marcado efecto disuasor frente a los herbívoros utilizados en los experimentos. Por el contrario, los extractos 11 (*Lyngbya*

spp. y *Oscillatoria margaritifera*), 36 (*Lyngbya* spp.) y 42 (*Oscillatoria acuminata* y *Spirulina* sp.) no generaron ningún efecto disuasor a la herbivoría.

Los tapetes de cianobacterias pueden generar efectos nocivos sobre los corales. Según los resultados obtenidos se sugiere un efecto alelopático de las cianobacterias sobre los corales. Esto debido a que se observó que los extractos de cianobacterias marinas ensayados resultaron ser tóxicos para las larvas del coral *Montastrea annularis*, siendo el extracto 36 el más tóxico. Además, los extractos de mostraron generar efectos deletéreos sobre fragmentos de corales adultos de *Madracis*. Los efectos alelopáticos de las cianobacterias sobre los corales, además de conferirles ventajas ecológicas para colonizar el sustrato, constituye otro factor que pone en riesgo los arrecifes de coral.

Las cianobacterias presentes en los afloramientos en el Caribe colombiano, producen compuestos químicos que les confiere ventajas ecológicas para sobrevivir, protegerse o competir con otros organismos marinos, esto se pudo inferir, ya que algunos extractos mostraron tener la capacidad de inhibir el *quorum sensing* (ensayo con *Chromobacterium violaceum*) e inhibir el crecimiento del hongo marino *Dendryphiella salina*.

Mediante aislamiento bioguiado, se logró obtener de los extractos 36 (*Lyngbya* spp.) y 30 (*Symploca hydroides* y *Phormidium submembranaceum*), dos compuestos puros, los compuestos **1** (caylobolido A) y **2** (7-metoxi-4-dodecenónico) respectivamente, los cuales presentaron actividad antifúngica contra *D. salina*.

Es importante continuar realizando investigaciones que aporten al conocimiento de los afloramientos de cianobacterias marinas en Colombia, sobretodo realizar monitoreos periódicos y continuos a largo plazo, que permitan aumentar el entendimiento de los afloramientos de cianobacterias en los arrecifes en el tiempo y poder plantear estrategias de manejo y control.

Este trabajo buscó aportar insumos para aumentar el conocimiento de los afloramientos de cianobacterias marinas en el Caribe colombiano, sus ventajas ecológicas, las especies que los forman y sus efectos sobre otros organismos arrecifales. Mediante esto, se buscó aportar al conocimiento de la biodiversidad de los mares de Colombia, para su conservación, entendimiento y aprovechamiento.