

**DESCRIPCIÓN DE LA ETIOLOGÍA DE LAS ENFERMEDADES CORALINAS
PRESENTES EN
Siderastrea siderea
EN EL ARRECIFE DE PUNTA CEBOLLETA EN ISLA FUERTE, CARIBE
COLOMBIANO**

María Alejandra Mantilla Galindo

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERAS DE BIOLOGÍA Y MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
BOGOTÁ D.C.
NOVIEMBRE DEL 2015**

**DESCRIPCIÓN DE LA ETIOLOGÍA DE LAS ENFERMEDADES CORALINAS
PRESENTES EN
Siderastrea siderea
EN EL ARRECIFE DE PUNTA CEBOLLETA EN ISLA FUERTE, CARIBE
COLOMBIANO**

María Alejandra Mantilla Galindo

Concepción Judith Puerta Bula, Ph.D.
Decano Académico

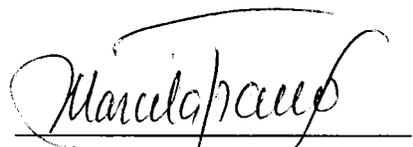
Andrea Forero, B.sc.
Directora del Programa Académico

**DESCRIPCIÓN DE LA ETIOLOGÍA DE LAS ENFERMEDADES CORALINAS
PRESENTES EN
Siderastrea siderea
EN EL ARRECIFE DE PUNTA CEBOLLETA EN ISLA FUERTE, CARIBE
COLOMBIANO**

María Alejandra Mantilla Galindo



Fabio Gómez Delgado Msc.
Director



Marcela Franco Correa Ph.D.
Codirectora



María Ángela Echeverry G. Ph.D
Jurado



Marcela Rey A.
Jurado

NOTA DE ADVERTENCIA

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

AGRADECIMIENTOS

Le doy gracias primeramente a Dios, por haberme permitido cumplir con la totalidad de este trabajo, por darme la fortaleza y sabiduría para enfrentar los momentos de mayor dificultad.

A mis padres, por apoyarme durante este largo recorrido, por tenerme paciencia, brindarme consejos cuando me encontraba perdida y regalarme un abrazo para poder seguir adelante.

A mi hermana, por tener siempre la disposición para escucharme y pasar noches enteras ayudándome.

A Uriel Albeiro, por su comprensión, regalarme un tris de su positivismo y permitirme recargarme en su hombro.

A mis compañeras de UNIDIA y a mis amigas Catalina, Vanessa, Valentina y Tatiana, por no dejarme perder mi fortaleza y brindarme una mano cuando más lo necesitaba. A María Reyes por su disposición y comprensión.

A Fabio Gómez, por orientarme a lo largo de este trabajo, nunca dudar de mis habilidades y enseñarme que siempre existen soluciones.

A la Doctora Marcela Franco, por su exigencia, por brindarme la oportunidad de crecer como profesional bajo su dirección y enseñarme que debo fortalecer mi carácter.

A la Doctora María Ximena, por abrirme las puertas de su laboratorio, por su voto de confianza y por sus orientaciones.

A Marcela Rey, por su disposición de enseñanza y enorme paciencia.

Al personal de monitoria no solo por brindarme su apoyo, sino también por regalarme una bonita amistad.

A las personas de Isla Fuerte que me orientaron durante el desarrollo del muestreo.

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	5
4. REFERENCIAS CONCEPTUALES	8
4.1. ARRECIFES CORALINOS	8
4.2. <i>SIDERASTREA SIDERA</i>	9
4.3. ETIOLOGÍA DE LAS ENFERMEDADES QUE AFECTAN ACTUALMENTE A <i>SIDERASTREA SIDERA</i>	9
4.4. PAPEL DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS ASOCIADAS A CORALES Y SU POTENCIAL ANTAGÓNICO.	17
5. OBJETIVOS.....	18
5.1. OBJETIVO GENERAL.....	18
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
6. METODOLOGÍA	19
6.1. FASE I - DETERMINACIÓN DEL ESTADO DE SALUD DE <i>SIDERASTREA SIDERA</i> EN EL ARRECIFE DE PUNTA CEBOLLETA EN ISLA FUERTE BOLÍVAR Y TOMA DE MUESTRAS DE FRAGMENTOS CORALINOS	20
6.1.1. Área de estudio	20
6.1.2. Descripción del estado de salud de <i>Siderastrea siderea</i> y determinación de la presencia de enfermedades.	21
6.1.3. Toma de las muestras.	22
6.2. FASE II - AISLAMIENTO Y DESCRIPCIÓN FENOTÍPICA DE BACTERIAS AEROBIAS ASOCIADAS A LOS FRAGMENTOS CORALINOS.	23
6.2.1. Aislamiento primario de bacterias aerobias.	23
6.2.2. Aislamiento secundario y Descripción morfológica.	25
6.2.3. Conservación de los aislamientos.	26
6.2.4. Descripción bioquímica de los aislamientos.	27
6.2.5. Evaluación de la actividad antagónica in-vitro.	29
6.3. FASE III - ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	31
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
7.1. DESCRIPCIÓN DEL ESTADO DE SALUD DE <i>SIDERASTREA SIDERA</i> Y DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE ENFERMEDADES.....	33
7.1.1. Descripción del estado de salud de <i>Siderastrea siderea</i>	33
7.1.2. Descripción de las enfermedades más predominantes de <i>S. siderea</i> en el total de puntos registrados como enfermos.....	34
7.1.3. Descripción de las enfermedades más predominantes de <i>S. siderea</i> en el total del arrecife.	35
7.1.4. Índices del estado de la comunidad coralina.....	38
7.2. AISLAMIENTO Y DESCRIPCIÓN FENOTÍPICA DE BACTERIAS AEROBIAS Y/O ANAEROBIAS FACULTATIVAS ASOCIADAS A LOS FRAGMENTOS CORALINOS.....	40
7.2.1. Descripción morfológica de los aislamientos.....	40
7.2.2. Descripción bioquímica de los aislamientos bacterianos.	42
7.2.3. Descripción bioquímica de las actinobacterias.....	49

7.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA IN-VITRO:	50
7.3.1. Análisis estadístico de los halos de inhibición obtenidos:	52
8. CONCLUSIONES.....	56
9. RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS	57
10. BIBLIOGRAFÍA.....	58
11. ANEXOS (VER MEDIO MAGNÉTICO).....	72
11.1. ANEXO 1	
11.2. ANEXO 2	
11.3. ANEXO 3	
11.4. ANEXO 4.....	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Principales enfermedades que afectan a <i>Siderastrea siderea</i>	10
Tabla 2: Denominación de los aislamientos obtenidos a partir de cada uno de los fragmentos coralinos.	24
Tabla 3: Cepas seleccionadas para la aproximación de la descripción bioquímica	28
Tabla 4: Cepas seleccionadas, para determinar la posible presencia de <i>Vibrio</i> sp.....	29
Tabla 5: Rango de interpretación de los índices de desarrollo y mortalidad coralinos, según lo reportado por Ramírez (1985)	32
Tabla 6: Total de aislamientos a partir de coral sano y enfermo de <i>S. siderea</i>	41
Tabla 7: Posibles especies asociadas a las enfermedades con mayor cobertura en <i>Siderastrea siderea</i> , en el arrecife de Punta Cebolleta en Isla Fuerte, Bolívar.....	44
Tabla 8: Aislamientos identificados en este estudio	45
Tabla 9: Medidas de los halos de inhibición de <i>N. kruczakiae</i> y <i>Streptomyces</i> sp. frente a bacterias asociadas a la enfermedad de puntos blancos.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planteamiento del problema y justificación	7
Figura 2. Esquema general de la metodología	19
Figura 3. Ubicación del área de estudio.....	20
Figura 4. a. Esquema de los 19 transectos evaluados. B. Esquema de punto intercepto, ...	22
Figura 5. Esquema general de la toma de muestras de tejido coralino de <i>Siderastrea siderea</i>	23
Figura 6. Esquema general del aislamiento primario, la purificación y conservación de los aislamientos bacterianos.	26
Figura 7. Esquema general de la descripción bioquímica de los aislamientos.....	28
Figura 8. Esquema general de la evaluación de la actividad antagónica <i>in-vitro</i>	31
Figura 9. Estado de salud de <i>Siderastrea siderea</i> en el arrecife de Punta Cebolleta, en Isla Fuerte, Bolívar.	34
Figura 10. Enfermedades presentes en <i>Siderastrea siderea</i> , dentro de las colonias registradas como enfermas.....	35

Figura 11. Enfermedades presentes en <i>Siderastrea siderea</i> en el total del arrecife de Punta Cebolleta, Isla Fuerte, Bolívar.....	36
Figura 12. Halos de inhibición de <i>N. kruczakiae</i> y <i>Streptomyces</i> sp., frente a cuatro de los aislamientos de puntos blancos	52
Figura 13. A. Diagrama de cajas y bigotes, obtenido a partir de la prueba de Kruskal-wallis. B. histograma de las medidas de los halos de inhibición obtenidos para cada uno de los enfrentamientos evaluados.	53

1. RESUMEN

Siderastrea siderea es un coral escleractinio cuyas colonias pueden llegar a alcanzar hasta 2m de diámetro, es una de las principales especies formadoras de arrecifes coralinos en Isla Fuerte y ocupa el 80% de la cobertura del arrecife de Punta Cebolleta. Actualmente esta especie se ve afectada por una serie de enfermedades en esta zona, encontrándose incluso varias de éstas sobre una misma colonia.

Teniendo en cuenta esto, el objetivo de este trabajo fue caracterizar las enfermedades más predominantes de *Siderastrea siderea* en el arrecife de Punta Cebolleta en Isla Fuerte Bolívar y la actividad antagónica *in-vitro* de aislamientos de actinobacterias marinas asociadas al tejido coralino.

Para esto, se evaluó el estado de salud de *S. siderea*, mediante la técnica de punto intercepto, posteriormente, se tomaron fragmentos de tejido coralino con signos de salud y de cada una de las enfermedades, a partir de éstos se realizó un aislamiento de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas asociadas a los mismos, las cuales fueron sometidas a una caracterización macroscópica, microscópica y bioquímica. Por último se evaluó la actividad antagónica *in-vitro* de las actinobacterias aisladas frente a cuatro bacterias asociadas a la enfermedad de mayor cobertura.

Se encontró, que la enfermedad más predominante de *Siderastrea siderea* fue puntos blancos, con una cobertura del 2,474%, siendo muy posiblemente el género *Vibrio* el que se encuentra asociado a ésta y las otras enfermedades evaluadas. Adicionalmente, la actinobacteria asociada a la enfermedad de banda rosa fue la que presentó la mayor actividad antagónica frente a 3 de los aislamientos bacterianos evaluados.

Con este trabajo se concluye que posiblemente los eventos de enfermedad de *Siderastrea siderea* en el arrecife de Punta Cebolleta, se relacionan con factores ambientales cambiantes que conllevan a que el género *Vibrio* actúe como oportunista y ocasione un desequilibrio de la microbiota residente del coral.

2. INTRODUCCIÓN

“Los arrecifes coralinos son estructuras masivas formadas en su mayoría por corales” (Emery 1981), los cuales son organismos pertenecientes al *phylum Cnidaria* que tienen la capacidad de desarrollarse y transformar zonas poco productivas, en zonas de elevada productividad gracias a su capacidad de establecer simbiosis con las zooxantelas y secretar carbonato de calcio (López 2012).

Estos ecosistemas han tomado gran importancia en las últimas décadas, no solo por albergar una gran cantidad de biodiversidad, “comparable únicamente con la selva húmeda tropical” (Cárdenas et al. 2012), sino también por proveer una gran belleza visual y encerrar una gran productividad biológica y económica para varios países del mundo (Garzón et al. 2001; Moberg & Folke 1999; Von Prahll & Erhardt 1985).

En Colombia, los arrecifes son escasos constituyen “áreas de tan solo 2,860 Km de extensión” (Díaz et al. 2000), por lo que son considerados uno de los ecosistemas más valorados en el país, siendo los de mayor importancia los ubicados en el Caribe, puesto que presentan un mayor complejidad y albergan un mayor número de especies, frente a los arrecifes del Pacífico (Díaz et al. 2000; Garzón et al. 2001).

Dentro de los arrecifes que se encuentran en el Caribe colombiano, se destaca el entorno coralino de Isla Fuerte, Bolívar, una isla ubicada en la parte subcentral de la plataforma continental del Caribe colombiano (Díaz et al. 1996; Gallego & Vélez 1994; Ortega 2010), en cuya zona oriental se encuentra el arrecife de Punta Cebolleta, un arrecife dominado principalmente por *Siderastrea siderea* (Gómez, comunicación personal, 25 de Septiembre del 2014).

Siderastrea siderea es un coral escleractinio, hermatípico, que tiene la capacidad de formar colonias de gran tamaño, otorgándole a los arrecifes estructura y la capacidad de albergar diferentes especies (Cárdenas et al. 2012; Flórez & Santodomingo 2010; Von Prahll & Erhardt 1985). Estudios realizados por Bernal (2012) y por Casas (2011), muestran que esta especie se ve afectada por varias enfermedades como: puntos blancos y lunares oscuros. De

igual forma, observaciones personales en este trabajo y de Gómez en el 2014, permitieron identificar la presencia de otras enfermedades como banda amarilla, plaga blanca, banda rosa, banda blanca, banda negra y aspergillosis en *S. siderea*.

Dichas enfermedades coralinas son uno de los factores que ocasiona mayormente el declive de la cobertura de los arrecifes coralinos (Frias-Lopez 2004), llegando a ocasionar daños de “hasta el 30% de los mismos” (Loya 2004, *citado en* Rosenberg & Barash 2005). Sin embargo, se tiene poco conocimiento de cuáles son los microorganismos que se encuentran asociados tanto a los fragmentos de coral sano de *Siderastrea siderea*, como de aquellos que presentan signos de enfermedad.

Por lo anterior, con este trabajo se buscó tener una aproximación mediante una descripción fenotípica, a la posible identidad de algunas bacterias aerobias o anaerobias facultativas que se encuentran asociadas a las enfermedades de *Siderastrea siderea* para con ello, tener un mayor entendimiento de las enfermedades que están afectando a esta especie, así como para prevenir y reducir su ocurrencia en el futuro.

Para ello, se determinó el estado de salud de *Siderastrea siderea* en el arrecife de Punta Cebolleta, mediante la técnica de punto intercepto, donde se evaluó un total de 1900 puntos, de los cuales se registró el número de puntos que se encontraron sobre una lesión o enfermedad o sobre tejido sano o muerto. Adicionalmente se tomaron muestras de tejido coralino de unos 2-3 cm³ con signos de cada una de las enfermedades y de coral sano.

Estos fragmentos fueron procesados en un tiempo menor a 48 h según lo descrito por Joyce & Zorro (2011) y se llevó a cabo un aislamiento primario de las bacterias aerobias asociadas a dichos fragmentos en 6 medios de cultivo diferentes preparados con agua de mar. Posteriormente se llevó a cabo una caracterización morfológica de cada uno de los aislamientos (macroscópica y microscópica) y una caracterización bioquímica de las bacterias más predominantes (según la morfología) de las tres enfermedades con mayor cobertura para *S. siderea*. Finalmente se evaluó la actividad antagónica *in-vitro*, de dos

actinobacterias aisladas (BRA1 y SA1) frente a 4 bacterias asociadas a la enfermedad más dominante en el arrecife.

Como resultado del análisis llevado a cabo en este estudio, se identificó que para Septiembre del 2014 el 14,68 % de *S. siderea* se encontraba muerta, un 7,74% estaba enferma y tan solo un 12,21% se encontraba sana. Adicionalmente, se evidenció que la enfermedad más predominante de *Siderastrea siderea* en el arrecife de Punta Cebolleta seguida de los eventos de blanqueamiento, fue puntos blancos con un porcentaje de cobertura del 2,47%.

Así mismo, con este estudio se logró aislar un total de 92 aislamientos diferentes a partir de las muestras de tejido coralino, de los cuales el 91,3% correspondieron a bacterias Gram negativas. Dentro de este porcentaje se logró evidenciar que de los doce aislamientos que fueron caracterizados bioquímicamente, 7 pertenecen muy posiblemente a *Vibrio rotiferianus*, el cual se encuentra asociado tanto al coral sano, como a las enfermedades más predominantes que presenta *S. siderea* en este arrecife. Adicionalmente se aproximó uno de los aislamientos de la enfermedad de puntos blancos a *Vibrio natriegens* y dos de la enfermedad de banda blanca a *V. carchariae* y *V. alginolyticus* respectivamente.

Por último, cabe destacar que dentro del 8,7% restante de los aislamientos obtenidos, se incluyen dos de actinobacterias: SA1, asociada a coral sano y BRA1 asociada a la enfermedad de banda rosa, las cuales, muy posiblemente pertenecen al género *Streptomyces* (Holt et al. 2000) y *Nocardia* (Holt et al. 2000) respectivamente. Estas dos actinobacterias presentaron actividad antagónica frente a 4 aislamientos de la enfermedad de puntos blancos, siendo *Nocardia kruczakiae* (BRA1), la que mostró la mayor actividad ante tres de los mismos.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Actualmente, los arrecifes coralinos conforman un ecosistema que se encuentra en riesgo (Riegl et al. 2009), debido a que se conoce que las coberturas coralinas han presentado una gran reducción en los últimos años, donde el 27% de los arrecifes coralinos del mundo ya se ha perdido y el 16% está en riesgo (Sutherland et al. 2004). Esta reducción se atribuye principalmente a enfermedades coralinas (Frias-Lopez 2004), las cuales han traído consigo pérdidas de hasta el 80% de los corales escleractinios en el Caribe, puesto que su prevalencia, severidad y hospederos han ido en aumento (Mouchka et al. 2010). Se han reportado 20 enfermedades diferentes (Cárdenas et al. 2012) que afectan las diversas especies coralinas en el mundo.

Si bien es cierto que las enfermedades coralinas juegan un papel fundamental en el deterioro de los arrecifes coralinos (Frias-Lopez 2004), aun no se conoce con exactitud los agentes causales de éstas, ya que hasta el momento solo se sabe que la mayoría son causadas por bacterias (Raymundo et al. 2008; Seré 2015), pero no se conoce con exactitud la identidad de las mismas. Únicamente se tiene identificado, el agente microbiano causal de unas pocas enfermedades que cumplen con los postulados de Koch, dentro de los que se destacan “*Aurantimonas coralicida* para plaga blanca tipo II, *Aspergillus sydowii*, para aspergillosis, *Serratia marcescens* para puntos blancos, *Vibrio shiloi* para el blanqueamiento bacteriano de *Oculina patagonia* y un consorcio microbiano para banda negra” (Barash et al. 2005; Gochfeld et al. 2006; Rosenberg et al. 2007).

Específicamente, los arrecifes del Caribe son uno de los más impactados, ya que aproximadamente el 82 % de las especies de corales, desarrollan al menos una enfermedad (Raymundo et al. 2008). De igual forma, es en el Caribe donde las enfermedades coralinas presentan una distribución geográfica generalizada, se da la aparición de nuevas enfermedades y hay una mayor incidencia sobre los arrecifes, lo que ha llevado a que se denomine a los mismos “puntos calientes de enfermedades” (Weil et al. 2006).

Este problema no es ajeno a Isla Fuerte, ya que especies coralinas como *S. siderea*, la cual representa el 80% de la cobertura coralina en arrecifes como el de Punta Cebolleta (Gómez, comunicación personal, Septiembre 24 del 2014), se ven afectadas por diferentes

enfermedades (Bernal 2012), observándose incluso varias de estas sobre una misma colonia.

Por lo anterior, se hace necesario llevar a cabo estudios del estado actual de salud de *Siderastrea siderea*, evaluando la totalidad de la población como sustrato en el arrecife de Punta Cebolleta, cuantificando la presencia de lesiones y/o tejido sano para identificar cuáles son las enfermedades más frecuentes por las que se ve afectada esta especie (Raymundo et al. 2008). Así mismo se hace necesario tener una aproximación de las posibles bacterias aerobias o anaerobias facultativas, que pueden estar asociadas a dichas enfermedades que afectan a *S. siderea*.

A partir de lo expresado anteriormente, este estudio permitirá tener un acercamiento a cuáles son las bacterias aerobias o anaerobias facultativas asociadas tanto al coral sano como a las enfermedades de *Siderastrea siderea*. De tal forma, que se podrían identificar los posibles cambios en las comunidades bacterianas, lo que puede relacionarse con la adquisición de enfermedades por parte del coral (Mouchka et al. 2010) al ocurrir una desestabilización de su microbiota normal (Cárdenas & Arévalo-Ferro 2013). Adicionalmente, identificar las actinobacterias y las bacterias aerobias o anaerobias facultativas asociadas a los fragmentos de coral sano de *Siderastrea siderea*, permitiría tener un mayor entendimiento del papel que desempeñan las comunidades bacterianas en el coral, ya que estos microorganismos llevan a cabo un control de patógenos (Mouchka et al. 2010) y complementan la nutrición del coral al brindar fuentes de carbono, nitrógeno y azufre, que no son provistas por la relación simbiótica coral- zooxantela (Garren & Azam 2012; Kimes et al. 2013).

De forma similar ocurre al evaluar el posible papel antagónico de las actinobacterias frente a bacterias aerobias o anaerobias facultativas asociadas a la enfermedad más predominante, debido a que este tipo de pruebas permite entender las relaciones que existen entre los diferentes microorganismos asociados al tejido coralino. Puesto que probablemente la producción de metabolitos secundarios, entre ellos antibióticos, se puede dar por una competencia de recursos (Ritchie et al 2006).

Por último, cabe destacar que conocer las bacterias aerobias asociadas a las enfermedades coralinas, entre ellas las que afectan a *Siderastrea siderea*, posibilita revelar su origen y posible fuente, para con ello lograr un control de éstas antes de ser introducidas en el océano y con ello poder establecer estrategias de conservación de estos ecosistemas (Raymundo et al. 2008) (Figura 1).

Pregunta de investigación

¿Cuáles son las bacterias aerobias asociadas a las enfermedades presentes en *Siderastrea siderea*, en el arrecife de Punta Cebolleta en Isla Fuerte Bolívar y cuáles de las actinobacterias aisladas de tejido coralino muestran una actividad antagonista *in-vitro*?

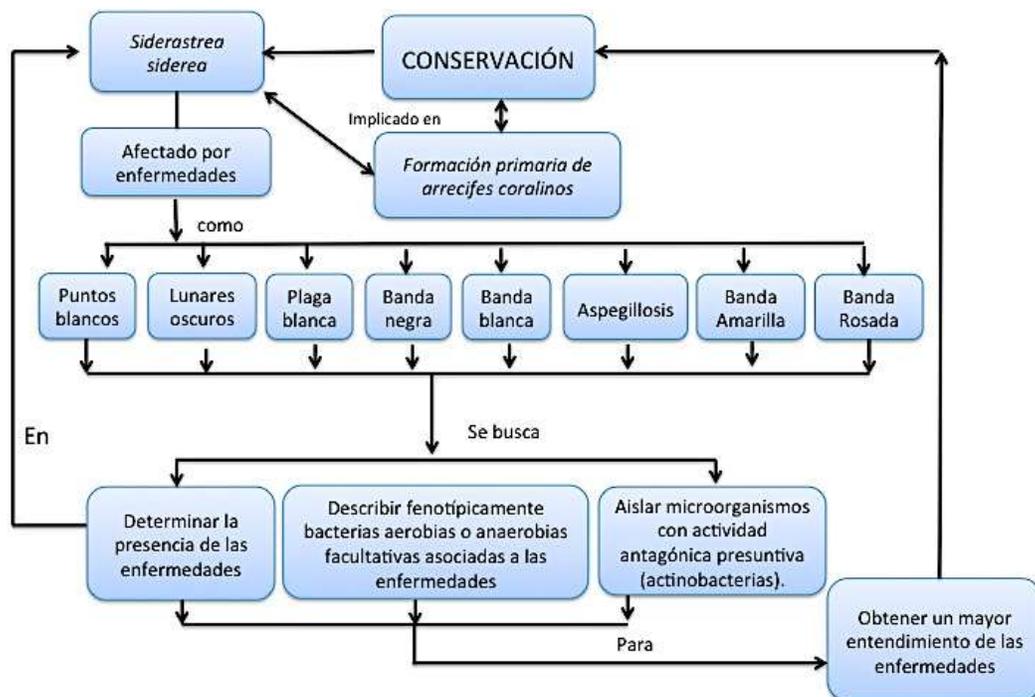


Figura 1. Planteamiento del problema y justificación. Figura modificada de Rey-Arévalo (2013).

4. REFERENCIAS CONCEPTUALES

4.1. ARRECIFES CORALINOS

“Los arrecifes coralinos son estructuras masivas formadas en su mayoría por corales” (Emery 1981). Los corales son organismos pertenecientes al phylum Cnidaria, que generalmente presentan su mayor desarrollo entre los 0 y 50m de profundidad (Flórez & Santodomingo 2010) y que bajo condiciones adecuadas logran establecerse en el suelo oceánico generando colonias que pueden llegar a ocupar inmensas coberturas, que proporcionarán un hábitat adecuado para diversa fauna marina (López 2012). Lo anterior es posible gracias a la capacidad que tienen estos organismos de secretar carbonato de calcio para generar su propio esqueleto y establecer relaciones simbióticas con zooxantelas (López 2012), dinoflagelados que le permiten al coral desarrollarse en aguas con baja cantidad de nutrientes, pues le transfieren del 60-80% del dióxido de carbono fijado al coral, para complementar su alimentación (Krediet et al. 2013; Birkeland 1997).

Los arrecifes coralinos son ecosistemas de una gran importancia, ya que albergan aproximadamente un tercio de las especies marinas (Veron et al. 2009) y llevan a cabo un gran número de funciones en las que se destacan: proveer energía, alimento y un sustrato de protección a un inmenso número de organismos, proteger las costas marinas al funcionar como barreras ante los huracanes y tsunamis, y ayudar en la formación de arena para las playas (Von Prahll & Erhardt 1985; Kuffner et al. 2013). Por otro lado, los arrecifes son ecosistemas altamente productivos (Von Prahll & Erhardt 1985; Raymundo et al. 2008; Dubinsky 1990, Birkeland 1997, Malakoff 1997 *citados* en Gil-Agudelo et al. 2009), alcanzando productividades que van desde 4 a 10 gC/m²/día (un valor elevado al compararlo con la productividad de un cultivo que generalmente es de 4 gC/m²/día) (Odum 1971 *citado* en Von Prahll & Erhardt 1985) y juegan un papel fundamental en la economía del muchos países, ya que proveen una gran cantidad de bienes y servicios dentro de los que se destacan la pesca, (Moberg & Folke 1999), el turismo (Davin & Brannet 2010) y la recreación (Moberg & Folke 1999), a partir de los cuales se obtienen ingresos de alrededor de 375 billones de dólares al año en el Caribe (Davin & Brannet 2010).

4.2. *Siderastrea siderea*

Dentro de los corales que se pueden encontrar en los arrecifes coralinos se destaca *Siderastrea siderea*, un coral escleractinio, hermatípico perteneciente al orden Scleractinia y la familia Siderastreidae, cuyas colonias suelen ser masivas de forma hemisférica e incrustante, alcanzando hasta 2m de diámetro (Flórez & Santodomingo 2010; Von Prahll & Erhardt 1985). Posee cálices de 3 a 5mm, con un promedio de 44 a 50 septos por corallite, dirigidos en una pendiente de 45° hacia la columnella (Flórez & Santodomingo 2010; Von Prahll & Erhardt 1985) y se caracteriza por ser un coral de crecimiento lento (1-8mm por año) y elevada longevidad (>100 años) (Carricart-Ganivet et al. 2013; Flórez & Santodomingo 2010).

Siderastrea siderea generalmente habita en áreas arrecifales someras, en aguas claras, encontrándose entre los 0,5 m y 2m de profundidad, formando arrecifes de parche y hacia el borde interno del arrecife (Flórez & Santodomingo 2010; Von Prahll & Erhardt 1985).

Esta especie se encuentra distribuida a lo largo del Caribe, en el Golfo de México, la Florida, las Bahamas, y las Bermudas (Aronson et al. 2008). En nuestro país se encuentra a lo largo de la costa del Caribe, donde presenta una gran importancia, gracias a su capacidad de mantener la complejidad estructural de los arrecifes tropicales a través del crecimiento y la sustitución de sus colonias (Flórez & Santodomingo 2010; Elahi & Edmunds 2007; Díaz 1996).

4.3. ETIOLOGÍA DE LAS ENFERMEDADES QUE AFECTAN ACTUALMENTE A *Siderastrea siderea*

Como lo menciona Raymundo et al. (2008), una enfermedad coralina es cualquier afección en la salud del coral, que puede llegar a ocasionar una reducción en la funcionalidad fisiológica. Sutherland et al. (2004), afirma que una enfermedad coralina puede ser cualquier deterioro, interrupción, cese o proliferación de las funciones normales del organismo y generalmente requiere de la interacción del organismo (coral), el ambiente y el agente biótico o abiótico causal de la enfermedad (Sheridan et al. 2013).

Las enfermedades coralinas pueden ser de dos tipos: abióticas y bióticas, siendo las primeras las que son causadas por el cambio en un agente abiótico, como la temperatura, el pH, agentes tóxicos, cambios en la radiación U.V., entre otros (Raymundo et al. 2008; Sutherland et al. 2004). Por su parte las enfermedades bióticas (las cuales con el centro de este trabajo), son aquellas que son causadas por un agente microbiano, como bacterias, hongos y virus. Estas a su vez pueden ser infecciosas, al transmitirse de un organismo a otro o no infecciosas (Raymundo et al. 2008).

Las enfermedades coralinas han tomado una gran importancia en las últimas décadas, debido a que han sido identificadas como una de las amenazas para la supervivencia de los arrecifes (Seré 2015), ya que se conocen más de 20 enfermedades (Cárdenas et al. 2012) que han ocasionado el declive de dichos ecosistemas (Sutherland et al. 2004), donde los corales esclerantinos han tenido una pérdida de aproximadamente del 80 % de su cobertura en el Caribe (Castillo et al. 2011). Dentro de estos *Siderastrea siderea* es una de las especies afectadas por un gran número de enfermedades, de las que se encuentran reportadas la enfermedad de banda negra (Sekar et al. 2008), puntos blancos, lunares oscuros (Gochfeld et al. 2006; Bernal 2012; Kellogg et al. 2014) y plaga blanca (Cárdenas 2012; Gil-Agudelo et al. 2009).

Por otro lado, observaciones personales en este estudio y de Gómez (2014), han permitido identificar la presencia de otras enfermedades descritas a nivel mundial para otras especies en *Siderastrea siderea*, como lo son: banda amarilla, banda rosa, banda blanca y lo que parece ser aspergillosis. La etiología de dichas enfermedades se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1: Principales enfermedades que afectan a *Siderastrea siderea*. Tabla modificada de Rey-Arévalo et al. (2015-2). En la tabla se muestran las principales enfermedades presentes en *Siderastrea siderea*, junto con sus posibles agentes etiológicos y los síntomas que las caracterizan.

Enfermedad Presuntiva	Lesiones fenotípicas	Agente etiológico
Banda amarilla (YB)	Se caracteriza porque comienza como una pequeña mancha redonda pálida que se expande a lo largo del tejido coralino	Consortio de especies de <i>Vibrio</i> (Cervino et al. 2008). Según Gil-Agudelo et al. (2009) el agente etiológico



Foto tomada por Fabio Gómez (2014)

También se puede observar como círculos irregulares de tejido despigmentado y muerto generalmente en la parte superior del coral, rodeado por bandas de color amarillo (Sutherland et al. 2004).

Mancha blanca rodeada de una banda de color amarillo pálido a blanco (Cervino et al. 2008). El color blanco se atribuye a una pérdida de zooxantelas (Cervino et al. 2004).

Banda negra (BBD)



Foto tomada por Fabio Gómez (2014)

Se evidencia una banda oscura, que aumenta su tamaño a lo largo del coral de forma horizontal, dominado por cianobacterias y un tapete de bacterias sulfatoreductoras (Sekar et al. 2008; Sekar et al. 2006)

Autores como Gil-Agudelo et al. (2009) & Sutherland et al. (2004) afirman que se caracteriza por presentar una porción del esqueleto del coral desnudo, blanco rodeado por una banda oscura de 5 a 30 mm de ancho que delimita el tejido sano.

Descrita como una enfermedad polimicrobial.

En un principio estudios moleculares realizados por Frias et al. (2004), sugieren que bacterias pertenecientes a los grupos Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides (como *Cytophaga fermentans*,) γ -proteobacteria y δ -proteobacteria, son causantes de esta enfermedad.

Estudios posteriores de Sekar et al. (2008), y de Sheridan et al. (2013) postulan a los siguientes patógenos:

Bacterias sulfatoreductoras, especialmente *Desulfovibrio* sp. (Sekar et al. 2008).

Bacterias sulfato-oxidadoras (Sekar et al. 2008) como: *Beggiatoa* spp. (Sutherland et al. 2004).

Cianobacterias:

Phormidium corallyticum es a la que se le atribuye en su mayoría la enfermedad Sutherland et al. (2004).

Trichodesmium sp.,
Geitlerinema sp.,
Leptolyngbya sp.,
Oscillatoria sp. (Sheridan et al. 2013).

Sekar et al. (2006) & Sekar et al. (2008) realizan estudios filogenéticos y moleculares de las poblaciones microbianas asociadas a la enfermedad banda negra en *Siderastrea siderea* y encuentran una alta dominancia de Alphaproteobacteria en sus lesiones.

Puntos blancos (WPD)



Foto tomada por Fabio Gómez (2014)

Esta enfermedad esta reportada para *Acropora palmata* (Rosenberg et al. 2007), quien ha sido postulada como único hospedero (Patterson et al. 2002, Sutherland et al. 2004), por lo que es denominada serratosis de acroporidos Gil-Agudelo et al. 2009).

Serratia marcescens (Sutherland et al. 2004; Barash et al. 2005; Sutherland et al. 2011).

En *Acropora palmata* se evidencia como pequeños puntos irregulares de color blanco, formados por tejido coralino recién expuesto (tejido necrótico), rodeado por

tejido sano (Patterson et al. 2002, Sutherland et al. 2004). Las lesiones pueden variar en tamaño desde unos pequeños centímetros hasta ocupar todo el coral (Sutherland et al. 2004).

A pesar de lo mencionado anteriormente, observaciones propias de este estudio, permitieron evidenciar que *Siderastrea siderea* presenta esta enfermedad, la cual se evidencia como puntos blancos simétricos de un diámetro de 2 a 3cm, lo que podría sugerir que para esta especie los patógenos asociados a la enfermedad son diferentes a *Serratia marcescens*.

Lunares oscuros (DSS/ ELO)



Foto tomada por Fabio Gómez (2014)

Se observa como pequeños círculos pigmentados de color morado o marrón, los cuales se deprimen por debajo del tejido coralino sano y pueden aumentar en tamaño (Cervino et al 2001; Gil-Agudelo & Garzón-Ferreira 2001).

En *Siderastrea siderea* uno de los corales más afectados por esta enfermedad se puede observar de diferentes colores: morada, marrón y café (Goreau et al. 1998).

Según lo reportado por Borger (2005) “Esta enfermedad está clasificada en cuatro tipos

Gochfeld et al. (2006) & Porter et al. (2011), afirma que no se ha definido el agente etiológico para esta enfermedad.

Gil-Agudelo et al. (2009) proponen a *V. Carchariae* y/o *Vibrio harveyi* como el agente etiológico. Por otra parte Sheridan et al. (2013) proponen como agentes etiológicos Hongos y bacterias como: *Vibrio* sp.

dependiendo de las manifestaciones visuales que presenta” en:

- Tipo I: Puntos pequeños, redondos, menores a 1cm de diámetro.
- Tipo II: Manchas purpura oscuro mayores a 1 cm de diámetro.
- Tipo III: Manchas purpura en forma de herradura.
- Tipo IV: Manchas de color purpura, colonizadas por algas en la parte central.

Banda blanca (WBD)



Foto tomada por Fabio Gómez (2014)

La enfermedad se evidencia como una lesión progresiva que inicia en la base del coral y progresa hasta la punta (Rosenberg et al. 2007).

Vibrio carchariae y diferentes consorcios de *Vibrio* (Rosenberg et al. 2007).

La enfermedad se clasifica en 2 tipos diferentes:

Banda blanca tipo I: se caracteriza por la presencia de una banda de tejido coralino necrótico, seguido por una banda de tejido pigmentado. Se desarrolla en la base de una colonia del coral y progresa hacia arriba, en forma de un anillo concéntrico (Richardson 2002; Sutherland et al. 2004).

Afecta a *Acropora palmata* y a *A. cervicornis* (Sutherland et

al. 2004).

Banda blanca tipo II: afecta únicamente a *A. cervicornis*. Este tipo de banda blanca se diferencia del tipo I, porque puede formar bandas de 2 a 20 cm de grosor y porque la velocidad del progreso del tejido necrótico es mucho mayor (Sutherland et al. 2004). Adicionalmente la expansión de las bandas se puede dar desde la punta del coral hacia la base del mismo (Ritchie & Smith 1998).

Plaga blanca (WPD)



Foto tomada por Fabio Gómez (2014).

Se caracteriza por el desprendimiento del tejido coralino que deja el esqueleto coralino expuesto, y se evidencia una marcada línea blanca entre coral sano y enfermo (Gil-Agudelo et al. 2009).

Esta enfermedad está clasificada en diferentes tipos dependiendo del tipo de progresión de la enfermedad, el tiempo en que progresa:

Plaga blanca tipo I: se caracteriza porque presenta necrosis del tejido y deterioro. Se evidencia una línea distintiva entre el esqueleto de coral expuesto y el tejido sano (Ritchie & Smith 1998 en Richardson & Aronson 2002).

Plaga Blanca Tipo II y III:

Aurantimonas coralicida

Sphingomonas sp.

Vibrio carcharia
(Richardson & Aronson 2002; Sheridan et al. 2013)

Thalassomonas loyana, en el mar Rojo (Roder et al. 2014)

Plaga blanca tipo II:

exhibe una zona de transición entre la necrosis tisular y el esqueleto expuesto que consta de tejido del coral blanqueado pero intacto. Avanza 2 cm/día (Gil-Agudelo et al. 2009).

Plaga blanca tipo III:

la velocidad con la que progresa la pérdida de tejido coralino es mucho mayor que la que se presenta en plaga blanca tipo I y II (Gil-Agudelo et al. 2009).

Líneas Rosa- Banda rosa



Foto tomada por Fabio Gómez (2014)

Se caracteriza por una línea o banda de tejido de color rosa que separa el tejido sano del esqueleto donde el tejido ha muerto (Ravindran & Raghukumar 2006; Gil-Agudelo et al. 2009).

Cianobacterias:

Phormidium valderianum

Hongos como:

Curvularia lunata

(Ravindran & Raghukumar 2002)

El tejido muerto es rodeado por una banda rosada que es producto de pólipos de color rosa (Ravindran & Raghukumar 2002).

Aspergillosis (ASP)

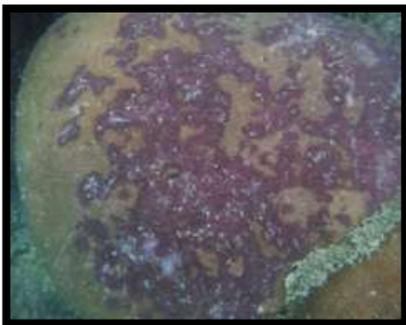


Foto tomada por Fabio Gómez (2014)

Anillos púrpuras Focales o multifocales que van progresando hacia fuera (Sheridan et al. 2013).

Aspergillus sydowii
(Sheridan et al. 2013)

Las lesiones causadas por la aspergillosis se caracterizan por una recesión del tejido coralino superior y una exposición del tejido axial (interno) del coral, dichas

heridas están rodeadas por anillos purpura que muestran que las hifas del hongo penetran hacia el tejido vivo (Sutherland et al. 2004; Rosenberg & Barash 2005).

En algunas ocasiones se pueden evidenciar tumores, como reflejo de la defensa del coral frente a esta enfermedad (Sutherland et al. 2004).

4.4. Papel de las comunidades microbianas asociadas a corales y su potencial antagónico.

Si bien es cierto que los microorganismos juegan un rol fundamental en el deterioro de la salud de los corales al causarles un sin número de enfermedades (Richardson & Aronson 2002; Sutherland et al. 2004; Gil-Agudelo et al. 2009; Muller & Woesik 2012), otros residen en el esqueleto, el tejido, y en la superficie del mucopolisacárido del coral (Mouchka et al. 2010), para desempeñar papeles de protección frente a patógenos por competencia o por producción de compuestos antibacteriales que inhiben a los microorganismos no residentes (Mydlarz et al. 2010). Así mismo, le proveen al coral nutrientes como el fósforo o el nitrógeno (aproximadamente el 50% requerido por el coral), que no son obtenidos por la relación simbiótica con las zooxantelas (Shnit-Orland & Kushmaro 2009), por lo que se afirma que los microorganismos también establecen una relación simbiótica especie-específica con estos invertebrados, donde las bacterias se benefician de los nutrientes disponibles en la superficie del coral y los microorganismos le proveen protección y metabolitos al hospedero (Ritchie 2006).

Por lo expuesto anteriormente, se dice que el coral es un holobionte, un complejo sistema que contiene microorganismos de los tres dominios Archea, Eucaria y Bacteria (Rosenberg et al. 2007), donde un desequilibrio de las condiciones ambientales, ocasiona un cambio en dichas asociaciones del holobionte, siendo las comunidades microbianas una de las afectadas, lo que lleva al desarrollo de las enfermedades (Mydlarz et al. 2010). Por ello se

sugiere que los metabolitos antimicrobianos producidos por los microorganismos asociados a los corales, especialmente a la capa de mucopolisacárido, son indispensables como primera línea de defensa de los mismos (Shnit-Orland & Kushmaro 2009), lo cual se sustenta con estudios realizados por Nissimov et al. (2009), quienes encontraron actividad antagónica de bacterias aisladas del mucus de *Oculina patagónica*, como *Pseudoalteromonas* sp. frente a patógenos de esta misma especie de coral, tales como: *Vibrio shiloi* y *V. coralliilyticus*. Así mismo, autores como Lampert et al. (2008), muestran que los corales presentan un gran número de actinobacterias asociadas que pueden inhibir la formación de biofilms de patógenos como *Streptococcus pyogenes* (Nithyanand et al. 2010).

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar las enfermedades más predominantes de *Siderastrea siderea* en el arrecife de Punta Cebolleta, en Isla Fuerte Bolívar y la actividad antagónica *in-vitro* de aislamientos de actinobacterias marinas asociadas al tejido coralino.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer el estado de salud de *Siderastrea siderea* en el arrecife de Punta Cebolleta en Isla Fuerte Bolívar.
- Describir fenotípicamente algunas bacterias aerobias o anaerobias facultativas cultivables asociadas a las enfermedades más predominantes de *Siderastrea siderea* en el arrecife de Punta Cebolleta, en Isla Fuerte Bolívar.
- Determinar la actividad antagónica *in-vitro* de aislamientos de actinobacterias marinas, frente a algunas bacterias aerobias asociadas a la enfermedad más predominante de *Siderastrea siderea* en el arrecife de Punta Cebolleta, en Isla Fuerte Bolívar.

6. METODOLOGÍA

Como se muestra en la Figura 2., el proyecto se llevó a cabo en tres fases, la primera de ellas correspondió a la fase de campo, en la que se recolectaron los datos del estado de salud de *Siderastrea siderea* (sano, enfermo, muerto) y se registró cada una de las enfermedades presentes en esta especie en el arrecife de Punta Cebolleta, Isla Fuerte-Bolívar. En esta fase también se recolectó el material biológico, correspondiente a los fragmentos de coral sano y enfermo.

La segunda fase correspondió al aislamiento, la descripción fenotípica (tanto morfológica como bioquímica) de los microorganismos asociados a las enfermedades y la evaluación del potencial antagonístico de bacterias con actividad antimicrobiana presuntiva (actinobacterias) frente a algunas bacterias aerobias asociadas a la enfermedad con mayor cobertura de *Siderastrea siderea*. Finalmente en la tercera fase se llevó a cabo el análisis de los resultados obtenidos.

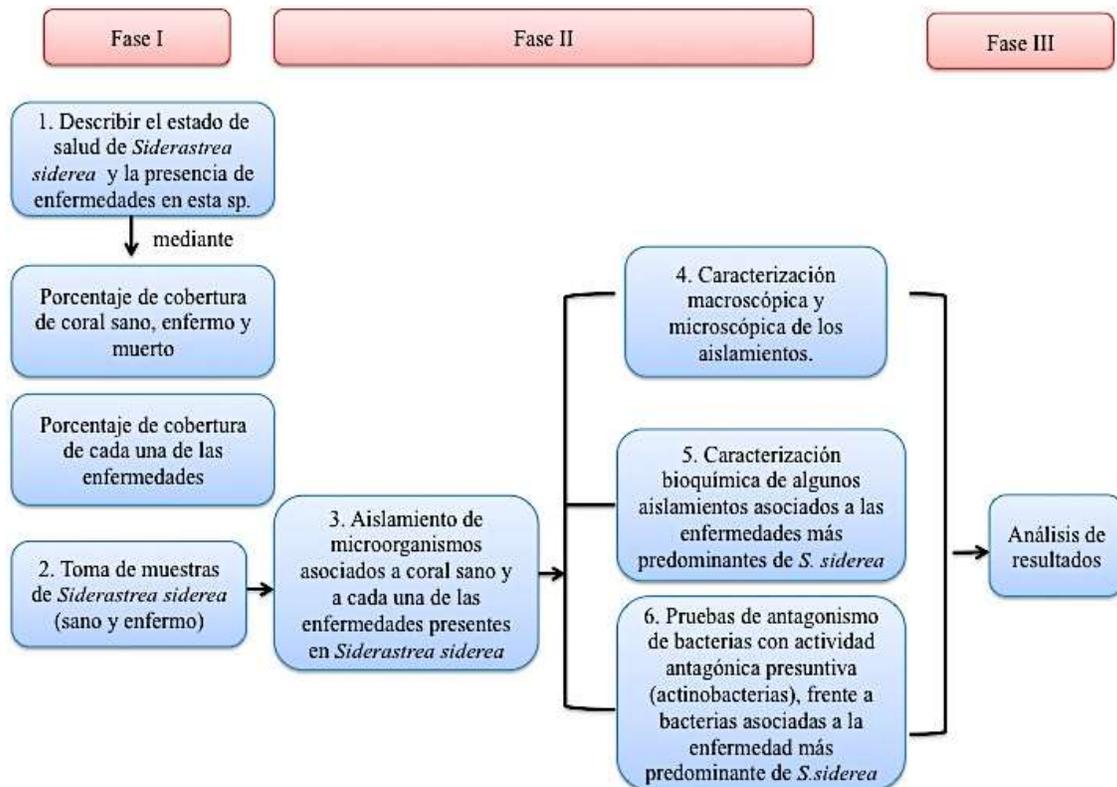


Figura 2. Esquema general de la metodología. Figura modificada de Rey-Arévalo (2013).

6.1. FASE I - DETERMINACIÓN DEL ESTADO DE SALUD DE *Siderastrea siderea* EN EL ARRECIFE DE PUNTA CEBOLLETA EN ISLA FUERTE BOLÍVAR Y TOMA DE MUESTRAS DE FRAGMENTOS CORALINOS

6.1.1. Área de estudio

El estudio se llevó a cabo en Isla Fuerte- Bolívar, una isla con un área emergida de 3,25 km² y una elevación máxima de 12m (Díaz et al. 1996), ubicada en la parte subcentral de la plataforma continental del Caribe colombiano, situada a 9° 23' latitud N y 76°23' longitud W, a 11 Km del continente (Gallego & Vélez 1994; Díaz et al. 1996; Ortega 2010). Específicamente en el arrecife coralino de Punta Cebolleta, el cual se encuentra ubicado en la zona oriental de la isla, donde *Siderastrea siderea* representa el 80% de la cobertura coralina del arrecife litoral (Figura 3).

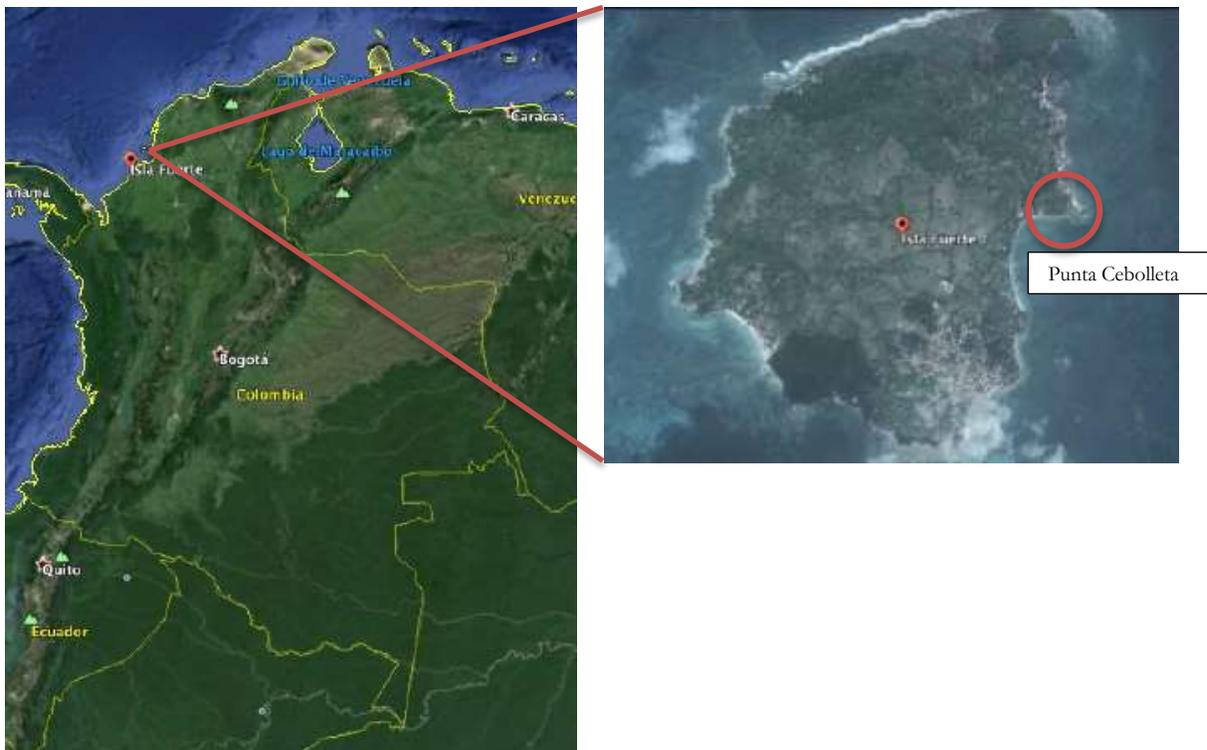


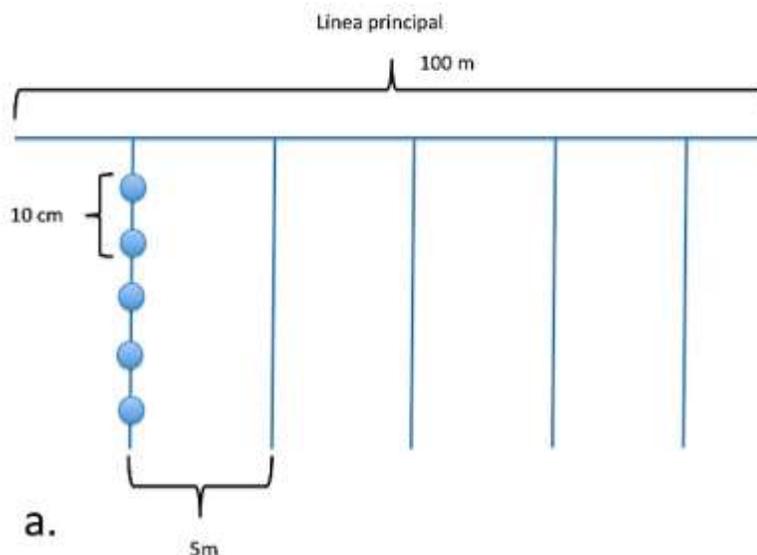
Figura 3. Ubicación del área de estudio. En la figura se señala con el círculo rojo la ubicación del arrecife coralino de Punta Cebolleta. Tomado de Google Earth.

6.1.2. Descripción del estado de salud de *Siderastrea siderea* y determinación de la presencia de enfermedades.

El estado de salud *Siderastrea siderea* en el arrecife coralino de Punta Cebolleta, se evaluó mediante buceo libre (snorkelling), debido a la baja profundidad a la que se encuentra este arrecife (entre los 5 y 7 m de profundidad) (Díaz et al. 1996), aplicando la técnica de punto-intercepto según lo reportado por Hill & Wilkinson (2004), donde se evaluaron 19 transectos, cada uno de 10 metros con divisiones cada 10 cm, para un total de 1900 puntos. Los transectos se trazaron paralelos entre sí y perpendicularmente a una línea principal de 100 metros de largo que recorrió la línea de costa (Figura 4).

El registro de los datos se realizó en una tabla en la que se anotó el número de puntos que se encontraron sobre una lesión o enfermedad o sobre tejido sano o muerto. Dentro de los enfermos se discriminó la enfermedad que se observaba bajo cada punto evaluado (puntos blancos, puntos oscuros, banda negra, banda blanca, banda rosa, plaga blanca y aspergillosis).

Es importante aclarar, que la enfermedad de banda amarilla no quedó bajo ninguno de los puntos del muestreo realizado y no se tuvo en cuenta otras coberturas diferentes a *Siderastrea siderea* (como fondos arenosos y algas), ni la presencia de otras especies de coral, por lo que estas fueron tomadas como “otras coberturas” dentro del 100% de los datos registrados.



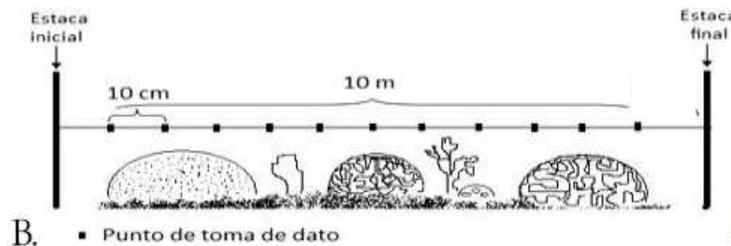


Figura 4. a. Esquema de los 19 transectos evaluados. **B.** Esquema de punto intercepto, Tomado de Casas (2011).

6.1.3. Toma de las muestras.

La toma del tejido coralino se llevó a cabo en septiembre de 2014, época en la cual, la estación de Coveñas (estación más cercana a Isla Fuerte) registró una temperatura del aire de aproximadamente 28,3°C, 0,996 atm de presión atmosférica y una precipitación acumulada de 368,7mm para la región (Dimar 2014), de igual forma la temperatura superficial del agua, según el registro térmico (Imágenes MODIS-Aqua) del Instituto Nacional de pesca (2014), se encontraba entre 29°C-31°C. Se tomaron fragmentos de tejido coralino de *Siderastrea siderea in-situ* de aproximadamente 2-3 cm³ tanto de coral sano (n=1), como de colonias con signos de las diferentes enfermedades (uno por enfermedad) evidenciadas en esta especie en el registro realizado en la Fase I (Miller & Richardson 2012), adicionalmente se tomó una muestra de la enfermedad de banda amarilla, la cual a pesar de no quedar bajo ninguno de los puntos del registro, fue observada en el momento de la colecta de las muestras de tejido.

No se tomaron muestras de coral con signos de blanqueamiento, puesto que a pesar de causar un deterioro de la salud y una disfunción fisiológica (Raymundo et al. 2008) en el coral, generalmente es el resultado de la interrupción de la relación simbiótica coral-zooxantela como respuesta al estrés causado por factores abióticos cambiantes como las altas temperaturas y la radiación U.V.(Guest et al. 2012; Downs et al. 2013; Kemp et al. 2014).

Como se muestra en la Figura 5., la toma del tejido coralino se realizó con ayuda de un cincel y un martillo según lo reportado por Rohwer et al. (2001) y Miller & Richardson

(2012). Los fragmentos de tejido coralino fueron llevados a tubos falcón de 50 mL estériles con agua de mar y empacados en bolsas de papel Kraft y bolsas plásticas de cierre hermético, para posteriormente ser almacenados en neveras de poliestireno expandido con pilas de refrigeración, hasta su procesamiento en la Unidad de Investigaciones agropecuarias-UNIDIA de la Pontificia Universidad Javeriana (Sutherland et al. 2011; Rey-Arévalo et al. 2015-1).



Figura 5. Esquema general de la toma de muestras de tejido coralino de *Siderastrea siderea*.

6.2. FASE II - AISLAMIENTO Y DESCRIPCIÓN FENOTÍPICA DE BACTERIAS AEROBIAS ASOCIADAS A LOS FRAGMENTOS CORALINOS.

6.2.1. Aislamiento primario de bacterias aerobias.

Las muestras colectadas se procesaron en un tiempo menor a 48 h en la Unidad de Investigaciones Agropecuarias-UNIDIA de la Pontificia Universidad Javeriana. Los fragmentos coralinos se lavaron 2 veces con buffer PBS, con la finalidad de eliminar posibles microorganismos de la columna de agua, posteriormente estos fragmentos se maceraron. Dicho macerado se suspendió en un tubo de ensayo de 16x150 mm con 5mL de medio marino (MML) y se procedió a realizar diluciones seriadas en MML hasta 10^{-9} , (Tomando 0,5 mL de la suspensión y llevándolo a 4,5 mL de MML) agitando cada dilución con ayuda de un vórtex (Joyce & Zorro 2011). Seguido de esto, se llevaron a cabo siembras en superficie en 6 medios de cultivo diferentes de cada una de las diluciones: medio marino (MM) (Joyce & Zorro 2011), medio Czapek marino (León et al. 2010), medio avena

marino, y cada uno de los anteriores con nistatina al 0,1 % v/v. Las cajas se dejaron por un periodo de incubación de 7 días a 27°C y si era necesario se prolongaba el tiempo de incubación.

Pasado el periodo de incubación se procedió con la purificación de los aislamientos, seleccionando aquellas colonias que presentaban una morfología distintiva, en cuanto a color y textura. Dichas purificaciones se realizaron por agotamiento en medio Tripticasa preparado con agua de mar estéril (TSA), en este caso las cajas se incubaron a 27°C por un periodo de 24 h.

Cada aislamiento se marcó dependiendo del fragmento de tejido coralino del cual fue aislado: coral sano o enfermo, el microorganismo presuntivo y el orden de aislamiento. En el caso de tratarse de un aislamiento de coral enfermo, este fue marcado con una sigla propia de la enfermedad, como se muestra a continuación en la Tabla 2:

Tabla 2: Denominación de los aislamientos obtenidos a partir de cada uno de los fragmentos coralinos.

Estado del coral	Nombre del aislamiento	Significado
Sano	SB η SA1	S: Coral sano B: Bacteria η : número de la bacteria aislada, donde η toma valores entre 1 y 29 (los números no son consecutivos, debido a la pérdida de algunos aislamientos) A1: actinobacteria, número 1
Puntos Blancos (WPD)	PTBB η	PTB: puntos blancos B: Bacteria η : número de la bacteria aislada, donde η toma valores entre 1 y 12 (los números no son consecutivos, debido a la pérdida de algunos aislamientos)
Lunares Oscuros (DSS)	POB η	PO: Lunares oscuros B: Bacteria η : número de la bacteria aislada, donde η toma valores entre 1 y 7 (los números no son consecutivos, debido a la pérdida de algunos aislamientos)
Banda blanca (WBD)	BBB η	BB: banda blanca.

		B: bacteria η: número de la bacteria aislada 2.1-11 (los números no son consecutivos, debido a la perdida de algunos aislamientos)
Plaga blanca (WPD)	PBBη	PB: Plaga blanca B: Bacteria η: número de la bacteria aislada 3-14 (los números no son consecutivos, debido a la perdida de algunos aislamientos)
Aspergillosis (ASP)	ASBη	AS: Aspergillosis B: Bacteria η: número de la bacteria aislada 2-11 (los números no son consecutivos, debido a la perdida de algunos aislamientos)
Banda negra (BBD)	BNBη BNL4	BN: banda negra B: bacteria η: número de la bacteria aislada 1-16 (los números no son consecutivos, debido a la perdida de algunos aislamientos) L4: Levadura número 4
Banda Rosa	BRBη BRA1	BR: Banda rosa B: bacteria η: número de la bacteria aislada 2-9 (los números no son consecutivos, debido a la perdida de algunos aislamientos) A1: actinobacteria 1
Banda amarilla (YB)	BABη	BA: banda amarilla B: bacteria η: número de la bacteria aislada, donde η toma valores entre 2.1 y 13 (los números no son consecutivos, debido a la perdida de algunos aislamientos)

6.2.2. Aislamiento secundario y Descripción morfológica.

A partir de los aislamientos bacterianos obtenidos en medio TSA se realizaron repiques en medio MacConkey sorbitol dejando las cajas en un periodo de incubación de 24 h a 27°C, para con ello diferenciar posibles microorganismos patógenos (Gram negativos- Ver Tabla 1) de flora acompañante (Rey-Arévalo et al. 2015-1). A partir de este medio se caracterizaron macroscópicamente las colonias con ayuda de un estereomicroscopio, teniendo en cuenta su capacidad de asimilación del sorbitol, la superficie, la forma, la elevación y el borde las mismas (Cervino et al. 2004; Cárdenas et al. 2012). Para la

caracterización microscópica se llevaron a cabo tinciones de Gram a partir de las colonias aisladas (Figura 6) (Rey-Arévalo et al. 2015-1).

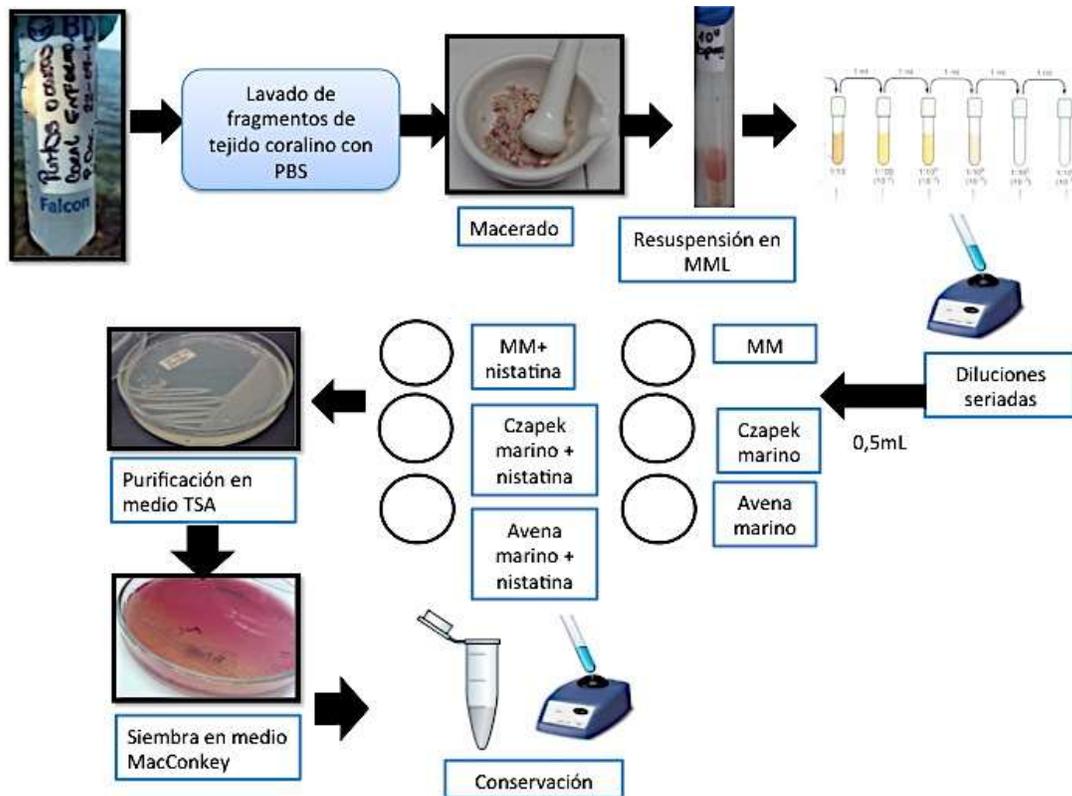


Figura 6. Esquema general del aislamiento primario, la purificación y conservación de los aislamientos bacterianos.

6.2.3. Conservación de los aislamientos.

Para la conservación de los aislamientos bacterianos se tomó una colonia aislada de medio MacConkey sorbitol y se replicó por agotamiento en medio TSA preparado con agua de mar. Las cajas se dejaron incubar por un periodo de 24 h a 27°C, pasado el periodo de incubación se recuperaron las colonias y se llevaron a tubos eppendorf con 1mL de MML con glicerol al 20% v/v, posteriormente los tubos eppendorf se agitaron con ayuda de un vórtex hasta lograr una completa homogenización y llevados a criopreservación a -20°C (Figura 6.) (Cárdenas et al. 2012; Rey-Arévalo et al. 2015-1).

En el caso de las actinobacterias aisladas a partir de coral sano y banda rosa, estas fueron conservados en glicerol al 20 % a una temperatura de -20°C, según lo reportado por Ortiz & Ocampo (2013).

6.2.4. Descripción bioquímica de los aislamientos.

Se llevó a cabo la descripción bioquímica de tres aislamientos tanto de coral sano como de cada una de las tres enfermedades con mayor cobertura (puntos blancos, lunares oscuros, banda blanca) en *Siderastrea siderea* (Tabla 3), dado que no se tenía la disponibilidad de recursos para desarrollar este procedimiento con la totalidad. De tal forma, que dichos aislamientos, fueron seleccionados según la predominancia de la caracterización macroscópica y microscópica, por lo se tomaron aquellos que presentaron una mayor frecuencia de similitud de caracteres como: el patrón de asimilación de sorbitol en medio MacConkey-sorbitol, así como la morfología del microorganismo (bacilo o coco-bacilo) y la tinción de Gram (Gram negativo o Gram positivo). Para ello se recuperaron los aislamientos en medio nutritivo, preparado con agua de mar, a partir de los viales conservados a -20°C, posteriormente se repicaron dichos aislamientos en medio TCBS, con la finalidad de determinar la posible presencia de *Vibrio*, uno de los géneros más predominantes que se han asociado a enfermedades coralinas (Mouchka et al. 2010; Ritchie 2006).

Aquellos aislamientos que presentaron una coloración amarilla o verde azulada, fueron sometidos a pruebas bioquímicas adicionales (baterías) según lo descrito por Cárdenas et al. (2012) como: Arginina dihidrolasa, ornitina descarboxilasa, lisina descarboxilasa, asimilación de azúcares, prueba de la oxidasa, catalasa, actividad ureasa, reducción de nitratos, entre otras, con el fin de determinar la posible especie. Para llevar a cabo dichas pruebas, se llevó a cabo un repique en medio nutritivo marino y se tomaron colonias aisladas (Figura 7).

Tabla 3: Cepas seleccionadas para la aproximación de la descripción bioquímica. Se seleccionaron 3 aislamientos de las 3 enfermedades con mayor cobertura, aquellos que presentaron la morfología macroscópica y microscópica más predominante (una mayor frecuencia de similitud de caracteres).

Estado del fragmento coralino	Aislamientos seleccionados
Sano	SB1 SB6 SB19
Puntos Blancos	PTBB1 PTBB2.2 PTBB6
Lunares oscuros	POB1 POB3 POB7
Banda blanca	BBB2.1 BBB10 BBB11

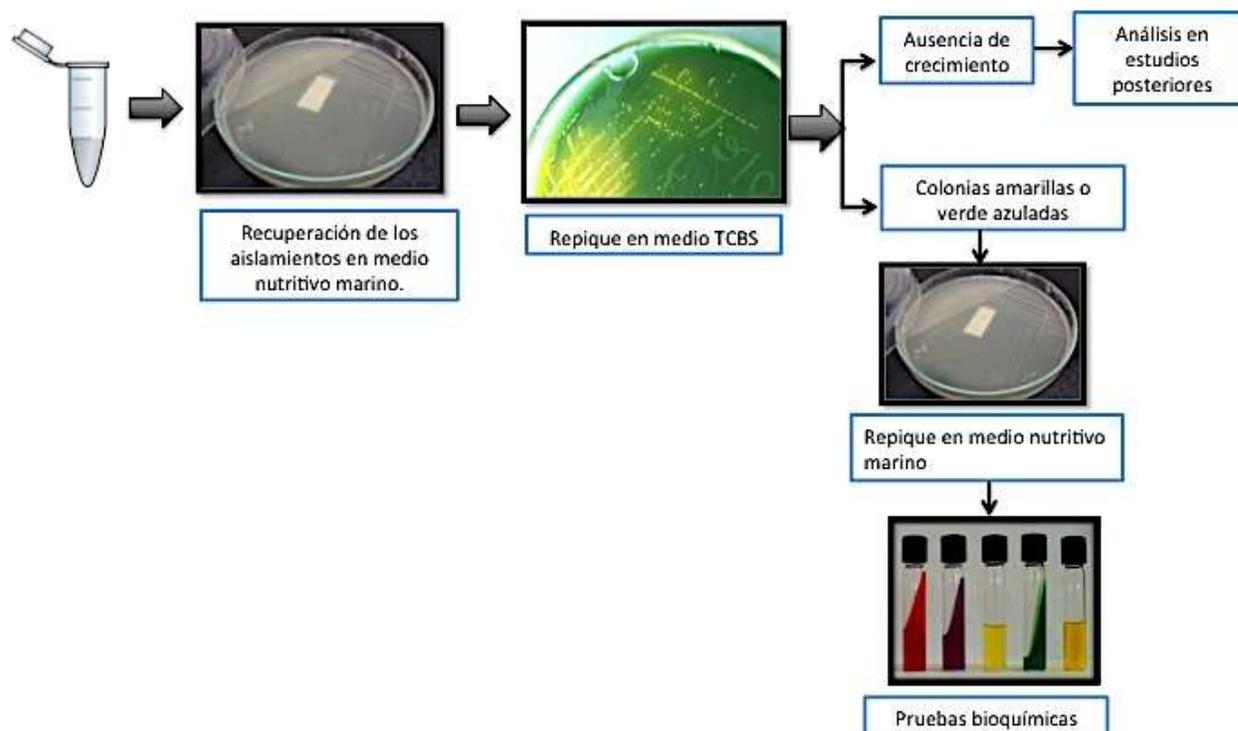


Figura 7. Esquema general de la descripción bioquímica de los aislamientos.

Adicionalmente, se tomaron tres de los aislamientos más predominantes por morfología (macroscópica y microscópica) de cada una de las siguientes enfermedades: WPD, ASP, BBD, YB y banda rosa, siguiendo el mismo criterio de selección de los aislamientos de las tres enfermedades con mayor cobertura. Estos se sembraron en medio TCBS con la finalidad de evidenciar la posible presencia de *Vibrio* sp.; las cepas seleccionadas se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Cepas seleccionadas, para determinar la posible presencia de *Vibrio* sp. Se seleccionaron por enfermedad 3 aislamientos, aquellos que presentaron la morfología macroscópica y microscópica más predominante (una mayor frecuencia de similitud de caracteres).

Estado del fragmento coralino	Aislamientos seleccionados
Plaga blanca	PBB4 PBB10 PBB12
Aspergillosis	ASB5 ASB6 ASB8
Banda negra	BNB13.2 BNB15 BNB16
Banda rosa	BRB2 BRB5 BRB8
Banda Amarilla	BAB2.1 BAB6.1 BAB7

Para el caso de las actinobacterias la caracterización bioquímica se realizó a partir de un cultivo puro de cinco días, con ayuda del sistema de identificación BD BBL Crystal para Gram positivos y se complementó con el sistema de identificación de BD BBL Crystal E/NF (kit de identificación de patógenos entéricos/no fermentadores) (Correa 2008). Para con ello tener un mayor número de bioquímicas para describir estos microorganismos.

6.2.5. Evaluación de la actividad antagónica in-vitro.

Tomando como criterio de selección que las actinobacterias aisladas de ambientes marinos son potenciales productoras de metabolitos secundarios bioactivos como antimicrobianos

(Hodges et al. 2012; Nithyanand et al. 2010; Sun et al. 2012; Vicente et al. 2013), se tomaron las actinobacterias aisladas a partir de la enfermedad de banda rosa (BRA1) y de coral sano (SA1), ya que solo se logró aislar microorganismos de este phylum (Actinobacteria) a partir de estos dos fragmentos coralinos y se enfrentaron contra cuatro de las bacterias asociadas a la enfermedad de puntos blancos (enfermedad con mayor cobertura en el arrecife de Punta Cebolleta), con la finalidad de evaluar la capacidad antimicrobiana de dichas actinobacterias. Tres de los aislamientos asociados a dicha enfermedad fueron seleccionados con respecto a su predominancia en morfología (PTBB1, PTBB2, PTBB6) y un último aislamiento, PTBB9, fue seleccionado por presentar una morfología diferente a los otros aislamientos.

Para evaluar la actividad antagónica de BRA1 y SA1 (actinobacterias), frente a PTBB1, PTBB2.2, PTBB6 y PTTBB9, se llevó a cabo la técnica de doble capa (You et al 2005; León et al. 2011). Para ello se tomaron discos de un cultivo de 8 días de cada una de las actinobacterias y por inversión de disco se colocaron sobre medio PDA preparado con agua de mar y se incubaron por un periodo de 6 días a 27°C. Adicionalmente se preparó una suspensión en solución salina de PTTBB9 y PTBB2.2 igualada al tubo 0,5 de Mac Farland a partir de un cultivo de 24 h en medio nutritivo marino y se llevó a cabo una dilución en base diez para asegurar una concentración de 1×10^7 células/mL (León et al. 2011). La actividad antagónica se determinó mediante la inoculación de 1mL de la dilución en 4 mL de medio nutritivo marino semi-sólido, el cual fue colocado a manera de segunda capa sobre el cultivo de las actinobacterias en medio PDA (Figura 8.) (León et al. 2011).

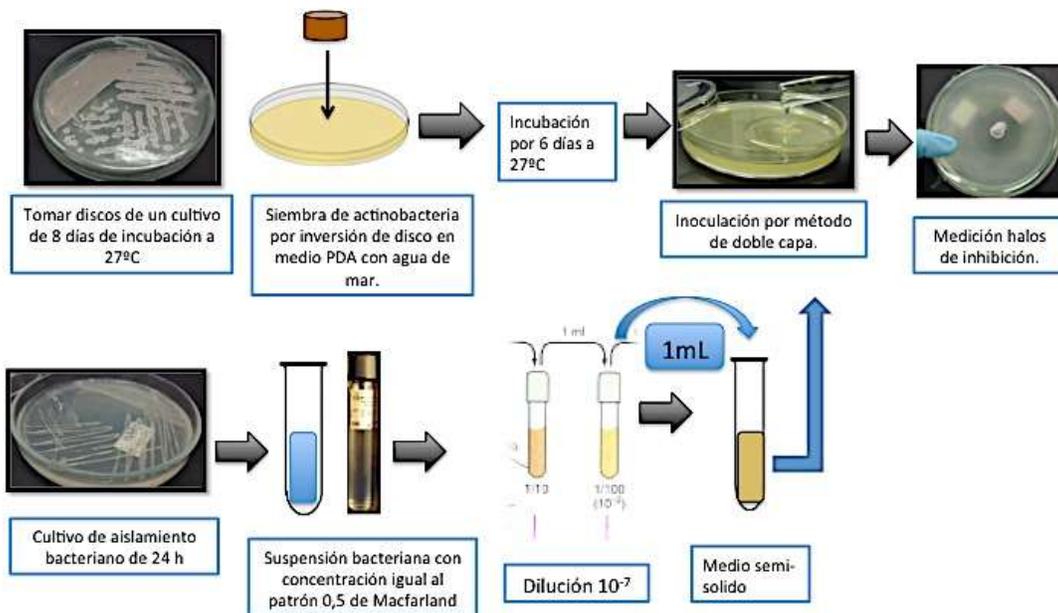


Figura 8. Esquema general de la evaluación de la actividad antagonista *in-vitro*.

La actividad antagonista se estableció midiendo los halos de inhibición después de 24h de incubación a 27°C (You et al 2005). Cada uno de los ensayos se llevó a cabo por triplicado, tomando como control negativo las actinobacterias inoculadas con una doble capa de 4mL medio nutritivo marino semi-sólido y 1mL de solución salina estéril (You et al 2005; León et al. 2011).

6.3. FASE III - ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para el primer objetivo: se analizaron los datos determinando la cobertura total del coral sano, enfermo y muerto, con la finalidad de definir el estado de salud de *Siderastrea siderea* (Rogers & Garrison 2001).

Cobertura total del estado del coral (Sano, muerto o enfermo): Hace referencia al número de puntos donde se presentó el estado *i* (sano, muerto o enfermo) del coral de *Siderastrea siderea* en el total de los 1900 puntos en los 19 transectos evaluados en el arrecife de Punta Cebolleta.

$$\text{Porcentaje de cobertura del estado del coral } i = \left(\frac{\text{Número de puntos del estado } i \text{ del coral}}{\text{Número de punto totales (1900 puntos)}} \right) \times 100$$

Cobertura de cada enfermedad: Se refiere a la cobertura de una enfermedad i dentro del total de los puntos de coral enfermo de *Siderastrea siderea*.

$$\text{Porcentaje enfermedad } i = \left(\frac{\text{Número de puntos de la enfermedad } i}{\text{Número de punto totales de coral enfermo}} \right) \times 100$$

Lo obtenido a partir de lo mostrado anteriormente se evaluó con los índices de estado de la comunidad coralina propuestos por Ramírez (1985), como se muestra a continuación:

1. Índice de mortalidad coralina (MC): Relaciona la cobertura de coral vivo de *S. siderea* (Cv) y el coral muerto de *S. siderea* (Cm), donde los valores cercanos a cero, hacen referencia a un índice de mortalidad coralina bajo (Bernal 2012). Los rangos de interpretación de este índice se muestran en la Tabla 5.

$$MC = \frac{Cv}{Cm}$$

2. Desarrollo coralino (Dc): Relaciona la cobertura de coral vivo de *S. siderea* (Cv), con otras coberturas (Oc), donde los valores cercanos a cero, hacen referencia a un índice de desarrollo coralino bajo (Bernal 2012). Los rangos de interpretación de este índice se muestran en la Tabla 5.

$$Dc = \frac{Cv}{Oc}$$

Tabla 5: Rango de interpretación de los índices de desarrollo y mortalidad coralinos, según lo reportado por Ramírez (1985):

Rango	Interpretación
0-0,499	Bajo
0,5-1	Medio
>1	Alto

Para el Segundo objetivo: El análisis de los resultados se llevó a cabo mediante una comparación de los resultados obtenidos, es decir los microorganismos aislados y descritos de cada una de las enfermedades con los agentes etiológicos reportados en la literatura.

Para el tercer objetivo: El análisis de resultados se realizó en el programa STATGRAPHICS centurión XVII, en el cual se llevó a cabo el análisis de normalidad bajo la prueba de Kolmogorov-Smirnov, posteriormente se determinó si existía homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Bartlett, para con ello realizar un análisis no paramétrico mediante la prueba de kruskal-wallis.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. DESCRIPCIÓN DEL ESTADO DE SALUD DE *Siderastrea siderea* Y DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE ENFERMEDADES.

7.1.1. Descripción del estado de salud de *Siderastrea siderea*

A partir de la técnica de punto intercepto llevada a cabo, se encontró que el área del arrecife de Punta Cebolleta es de aproximadamente de 1000m², de los cuales *Siderastrea siderea* representa una cobertura de 34,63% (incluyendo coral sano, enfermo y muerto). El 65,37% restante corresponde a otras coberturas, dentro de las cuales se incluyen otras especies de coral, fondos arenosos y algas.

Dentro del 100% de la cobertura de *Siderastrea siderea*, se puede evidenciar que para Septiembre del 2014 el 14,68% de la especie se encontraba muerta, un 7,74% se encontraba enferma, y solo un 12,21% se encontraba sana (Figura 9). Esto, coincide con estudios realizados anteriormente en Isla Fuerte por Escobar (2006), quien encontró en el arrecife de Punta Cebolleta una cobertura de coral vivo de tan solo el 33,7% frente a una cobertura de 44,7% de coral muerto, teniendo en cuenta diferentes especies de coral, entre ellas *Siderastrea siderea*, lo que puede indicar que existen factores antropogénicos o ambientales que están afectando a esta especie de coral.

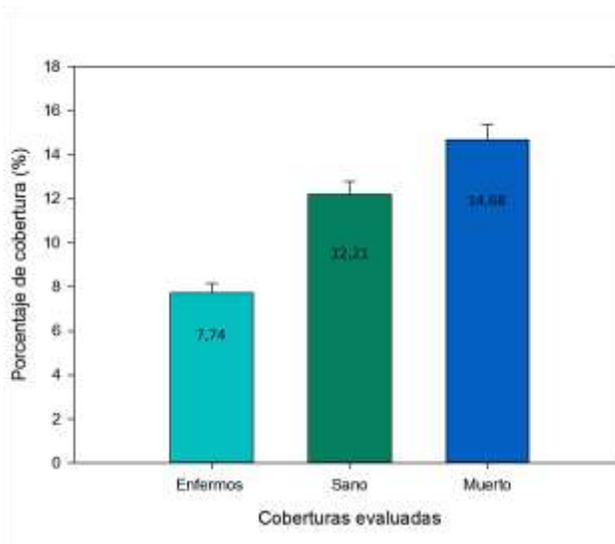


Figura 9. Estado de salud de *Siderastrea siderea* en el arrecife de Punta Cebolleta, en Isla Fuerte, Bolívar. En la gráfica no se muestra el porcentaje de otras coberturas.

7.1.2. Descripción de las enfermedades más predominantes de *S. siderea* en el total de puntos registrados como enfermos.

Dentro de las colonias registradas como enfermas, se obtuvo que el 42,18% presentaba eventos de blanqueamiento. La enfermedad más predominante fue puntos blancos con un porcentaje de cobertura del 31,97%, seguida de lunares oscuros con una cobertura del 8,84%. De igual forma se pudo observar que las enfermedades menos predominantes fueron banda rosa con una cobertura del 0,68% y banda negra con 2,04% (Figura 10).

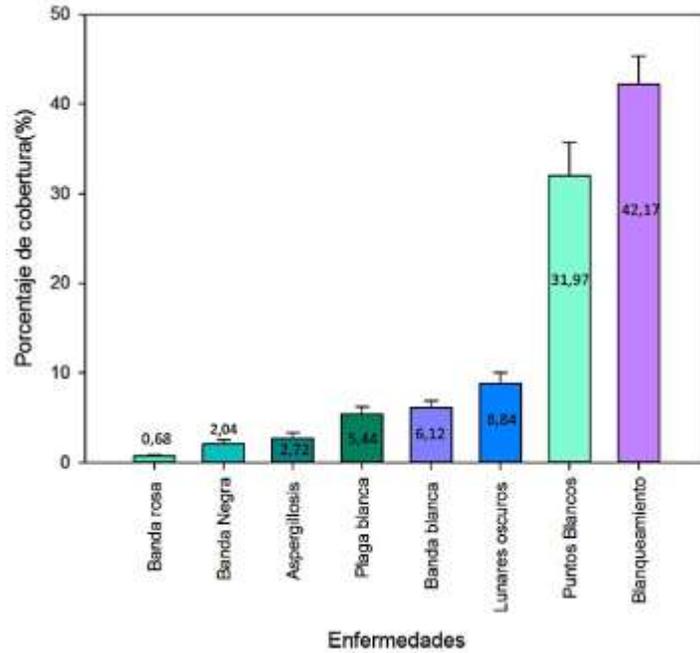


Figura 10. Enfermedades presentes en *Siderastrea siderea*, dentro de las colonias registradas como enfermas. No se muestra la enfermedad de banda amarilla, ya que esta no se registró en el muestreo.

7.1.3. Descripción de las enfermedades más predominantes de *S. siderea* en el total del arrecife.

Dentro del total del arrecife, los eventos de blanqueamiento en *Siderastrea siderea* son los que muestran una mayor cobertura (3,26%), así mismo puntos blancos y lunares oscuros, son las enfermedades más predominantes para esta especie en el arrecife, con coberturas de 2,47% y 0,68% respectivamente (Figura 11).

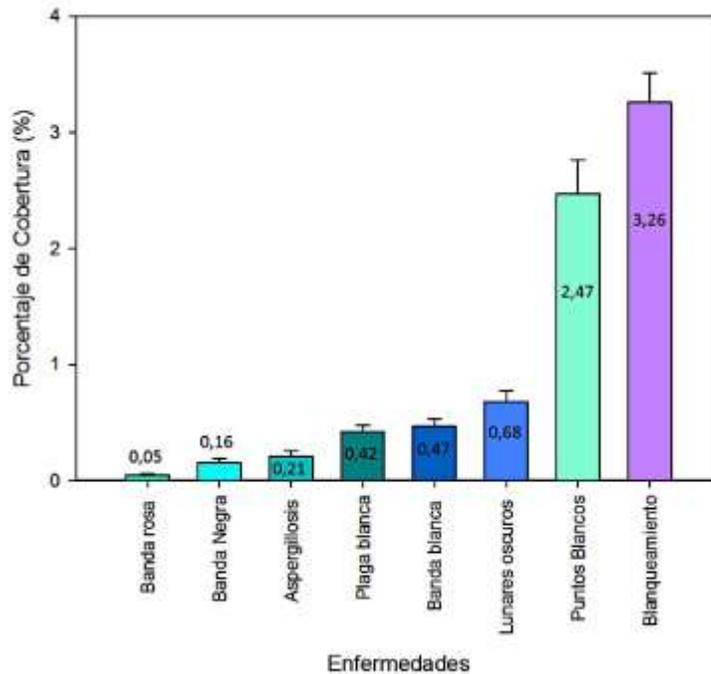


Figura 11. Enfermedades presentes en *Siderastrea siderea* en el total del arrecife de Punta Cebolleta, Isla Fuerte, Bolívar. En el gráfico no se muestra la enfermedad de banda amarilla ya que esta no quedó bajo ninguno de los puntos del muestreo realizado.

A partir de lo mostrado en las figuras 10 y 11, se observa que el gran porcentaje de eventos de blanqueamiento en *Siderastrea siderea*, concuerda con lo reportado por Navas-Camacho et al. (2010), quienes encuentran que esta especie es la que se ve mayormente afectada por esta alteración del tejido coralino, en diferentes zonas del Caribe colombiano como en las islas de San Bernardo y Urabá. Lo anterior puede deberse a una interacción de diferentes factores, siendo la temperatura uno de los que puede llegar a ser la causa del blanqueamiento en esta zona, ya que estudios de Alemu & Clement (2014) muestran que temperaturas de 30,5°C, ocasionaron el desarrollo de esta afección en *S. siderea* en Tobago y en el momento del muestreo se tenían temperaturas similares a estas, según el registro térmico del Instituto Nacional de Pesca (2014), que reporta que la temperatura de la superficie del agua marina de la región de Isla Fuerte, se encontraba en un rango de 29°C a 31°C; de igual forma el INVEMAR (2014) reporta temperaturas de 30,53°C y 30,58°C, en la época lluviosa del 2013 y la seca del 2014 respectivamente (Sánchez et al. 2014).

Del mismo modo, puede ser que en Isla Fuerte se esté dando un aumento en la temperatura superficial del agua, dado que los registros del INVEMAR y del Instituto Nacional de pesca (2014), son mayores a la temperatura promedio, reportada por Díaz et al. (1996) de 28°C. Este aparente aumento con respecto al reporte de Díaz, según Schoepf et al. (2013) y Buerger et al. (2015), puede llevar a los eventos de blanqueamiento, al presentar un aumento mayor a 1°C en la superficie del agua. Puesto que las elevadas temperaturas ocasionan un daño en la composición lipídica de la membrana de los tilacoides del alga simbiote, así como un estrés oxidativo, lo que ocasiona un daño en el fotosistema II de las mismas, conllevando a la ruptura de la relación simbiótica coral-zooxantela (Baker et al 2008; Buerger et al. 2015).

En segundo lugar, la predominancia de Puntos blancos coincide con los estudios de Casas (2011), quien evidencia esta enfermedad en *S. siderea*, al Nor-Oriente de la Isla (estación de Alicia). De igual forma la presencia de la enfermedad de lunares oscuros, se relaciona con los hallazgos de investigadores como Gochfeld et al. (2006) y Gil-Agudelo & Garzón-Ferreira (2001), quienes observan esta afección en *Siderastrea siderea* en el Caribe. Especialmente los últimos autores, encuentran que 25,76 % de 1.875 colonias de esta especie de coral estaban afectadas para 2001, en los arrecifes de Santa Marta. Por su parte el registro de la enfermedad de plaga blanca se asemeja al estudio realizado por Cárdenas et al. (2012), quienes la observaron en colonias de *S. siderea* en los arrecifes del parque Tayrona.

Teniendo en cuenta lo anterior y que en este estudio se evidenció la presencia de enfermedades como banda amarilla, banda rosa y lo que parece ser aspergillosis, las cuales hasta el momento no presentan reportes para esta especie, se puede pensar que los arrecifes de Isla Fuerte pueden estar siendo afectados por diferentes factores ambientales como temperatura, sedimentación, acidificación o por factores antropogénicos que han conllevado al deterioro de esta especie y la generación de nuevas enfermedades (Burge et al. 2014).

7.1.4. Índices del estado de la comunidad coralina

A partir de las coberturas obtenidas, se determinó que el índice de mortalidad coralino de *Siderastrea siderea* para Septiembre del 2014 fue de 0,736, indicando una mortalidad media, según lo reportado por Ramírez (1985) y el índice de desarrollo coralino fue bajo para esta especie, con un valor de 0,305 (Ramírez 1985). Estos valores contrastan a lo encontrado por Bernal (2012), quien reporta que en el arrecife Punta Cebolleta el índice de mortalidad coralino es bajo (0,03) y el índice de desarrollo coralino es alto (1,17), para las diferentes especies que se desarrollaban para el 2012 en este arrecife.

Estos valores indican que *S. siderea* se encuentra en riesgo y a pesar de que no se conocen las causas de ello, puede deberse en parte a una serie de factores ambientales y antropogénicos, lo que podría llevar a estos cambios en los índices en los últimos años en Punta Cebolleta (Harvell 2007). Así mismo, uno de los factores que puede ocasionar que el índice de mortalidad coralina sea mayor que el de desarrollo coralino, es la presencia de enfermedades en esta especie, pues como se ha mencionado anteriormente es uno de los factores que más ocasiona deterioro coralino (Frias-Lopez 2004; Raymundo et al. 2008).

El bajo índice de desarrollo coralino y la elevada cobertura de coral muerto como se observa en la Figura 9, puede darse a causa de que Isla Fuerte se ve influenciada por aportes de sedimentos y aguas de baja salinidad del río Sinú, debido a que desemboca al este de Isla Fuerte en la zona de Tinajones (Díaz et al. 1996). Adicionalmente la isla recibe sedimentos provenientes del río Atrato, como lo reporta Bernal (2012), especialmente durante los meses de Mayo a Noviembre, cuando la corriente del sur aumenta la contracorriente del Darién, y por último obtiene aportes del Canal del Dique que transporta sedimentos desde el río Magdalena hasta el mar Caribe (Acevedo et al. 2014). Los aportes de sedimentos causan un gran número de efectos negativos sobre el coral, siendo uno de ellos, la reducción de la capacidad fotosintética del alga simbiote, lo cual conlleva a una disminución en el desarrollo coralino, en el crecimiento, en la nutrición y en la tasa de calcificación del coral, al disminuir la energía obtenida por el mismo (Erfteimeijer et al. 2012; Rogers 2001). De igual forma, el aumento de concentración de los sedimentos

ocasiona que se dé un bajo desarrollo coralino, al modificar los sustratos de asentamiento para las larvas, convirtiéndolos en inadecuados para este proceso (Bartley et al. 2014).

Otra de las razones por las que el aumento de sedimentos tiende a ser nocivo para el coral, se relaciona con un aumento en la tasa de respiración del mismo (Erftemeijer et al. 2012), dado que los sedimentos presentes en el agua causan que se activen los mecanismos de remoción de sedimentos activos por parte del coral, como lo son la producción de mucopolisacárido y el movimiento ciliar (Erftemeijer et al. 2012; Sheridan et al. 2014). Estos procesos que son energéticamente costosos y que conllevan a procesos elevados de respiración, los cuales a su vez traen consigo una menor tasa de calcificación por parte del coral, una menor inversión de energía en la producción de larvas para la reproducción y una menor disponibilidad de energía para expresar una respuesta inmune como la producción de péptidos antimicrobianos y producción de células como fagocitos (Erftemeijer et al. 2012; Pollock et al. 2014; Sheridan et al. 2014).

El porcentaje de coral enfermo, y la gran cantidad de enfermedades presentes en esta especie coralina (Figura 10 y 11) pueden relacionarse con la elevada exposición de Isla Fuerte a sedimentos, ya que autores como Pollock et al. (2014), afirman que la turbidez en el agua aumenta la prevalencia de las enfermedades coralinas, especialmente porque los sedimentos pueden actuar como conductores de microorganismos patógenos y aumentar la concentración de nutrientes como nitrógeno y fósforo, los cuales han sido asociados con la aceleración de signos de enfermedades como banda negra, banda amarilla y aspergillosis (Raymundo et al. 2008), al aumentar el metabolismo microbiano que puede reducir las concentraciones de oxígeno y aumentar la producción de sulfuro de hidrógeno, el cual es tóxico para el coral (Weber et al. 2006 citado en Bartley et al. 2014).

A su vez, otra de las posibles razones por la que los nutrientes pueden llegar a causar el desarrollo de la enfermedad en este arrecife y eventos de blanqueamiento, se relaciona con lo reportado por Rådecker et al. (2015) & Vega et al. (2014), quienes afirman que elevadas concentraciones de nutrientes pueden conllevar a que se dé un aumento en la densidad poblacional de las zooxantelas del coral, lo que ocasiona que el punto de resistencia a

patógenos y al blanqueamiento se vea reducido, al generar un desequilibrio en el holobionte, por superar la capacidad de carga del coral y/o ocasionar daños en la estructura lipídica de los tilacoides de las zooxantelas, lo que desarrolla enfermedad o blanqueamiento.

7.2. AISLAMIENTO Y DESCRIPCIÓN FENOTÍPICA DE BACTERIAS AEROBIAS Y/O ANAEROBIAS FACULTATIVAS ASOCIADAS A LOS FRAGMENTOS CORALINOS.

7.2.1. Descripción morfológica de los aislamientos.

A partir de los 8 fragmentos de coral con signos de las diferentes enfermedades evaluadas (banda negra, banda blanca, banda amarilla, plaga blanca, lunares oscuros, puntos blancos, banda rosa y aspergillosis) y del fragmento de coral sano, se logró obtener un total de 92 aislamientos, de los cuales aproximadamente el 91,3% correspondieron a bacterias Gram negativas, dentro de estas, el 76% correspondió a bacilos y el 15,3% restante a coco-bacilos Gram negativos. Las colonias de estos aislamientos en su mayoría se caracterizaron por presentar en medio nutritivo marino, colonias de color beige, de elevación convexa, superficie lisa brillante y borde entero, como se puede ver en el Anexo 1. Dicha morfología coincide con lo encontrado por Cárdenas et al. (2012), quienes al evaluar fragmentos de *Siderastrea siderea* de coral sano y de coral con signos de plaga blanca lograron aislar 71 bacterias, de las cuales el 96 % fueron bacilos Gram negativos, con colonias color crema, brillantes, circulares y con textura cremosa, lo que sugiere que los aislamientos obtenidos en este estudio pertenecen muy posiblemente al *phylum Proteobacteria*, uno de los *phylums* que ha sido encontrado tanto en corales enfermos como en sanos de *S. siderea* (Cárdenas et al. 2012; Kellogg et al. 2014; Sekar et al. 2008).

Adicionalmente, se obtuvo un total de 5 aislamientos de bacterias Gram positivas (5,43%), 2 de las cuales se aislaron del coral sano. También se aisló una levadura asociada a la enfermedad de banda negra (1, 086%) y dos actinobacterias (2,17%), una de la enfermedad de banda rosa (BRA1) y otra de coral sano (SA1) (Tabla 6.).

Tabla 6: Total de aislamientos a partir de coral sano y enfermo de *S. siderea*. En la tabla se muestra cada una de las enfermedades, junto con los microorganismos aislados, según la caracterización morfológica.

Enfermedad	Microorganismos aislados	Proporción aislada
Puntos blancos	Bacterias Gram negativas	9/9
Lunares oscuros	Bacterias Gram negativas	5/5
Banda blanca	Bacterias Gram negativas	9/9
Plaga blanca	Bacterias Gram negativas	9/10
	Bacterias Gram positivas	1/10
Aspergillosis	Bacterias Gram negativas	8/8
Banda negra	Bacterias Gram negativas	12/15
	Bacterias Gram positivas	2/15
	Levadura	1/15
Banda rosa	Bacterias Gram negativas	6/7
	Actinobacterias	1/7
Banda Amarilla	Bacterias Gram negativas	14/14
Sano	Bacterias Gram negativas	12/15
	Bacterias Gram positivas	2/15
	Actinobacterias	1/15
Total de aislamientos		92

Como se muestra en el Anexo 1, la actinobacteria BRA1 (aislada de la enfermedad de banda rosa), posiblemente pertenezca al género *Nocardia*, ya que este aislamiento presenta características propias de este género como lo son: la presencia de un micelio vegetativo ramificado, hifas que se pueden fragmentar en formas bacilares y colonias de color grisáceo (Holt et al. 2000). Por su parte SA1 (actinobacteria aislada de coral sano), mostró una morfología característica del género *Streptomyces* al presentar un micelio vegetativo no ramificado y un micelio aéreo que genera cadenas de esporas con forma de espiral (Anexo 1) (Correa 2008 & Holt et al. 2000), esto junto con la caracterización macroscópica de SA1,

la cual muestra colonias pulverulentas de color blanco que con el tiempo se tornan grises, apuntan al género *Streptomyces* (Holt et al. 2000).

Es de considerar, que probablemente las bacterias Gram positivas y la actinobacteria asociada a coral sano, cumplan un papel de biocontrol en el coral, actuando como primera línea de defensa del mismo, gracias a su capacidad de producir compuestos antimicrobianos y que estén relacionados directamente con el establecimiento del equilibrio de las comunidades microbianas del holobionte, manteniendo la homeostasis del mismo (Nithyanand et al. 2010; Zhang et al. 2013). Por su parte las bacterias Gram positivas asociadas a coral enfermo pueden relacionarse con el desarrollo de las enfermedades, sin embargo para poder confirmar esto se hace necesario conocer las identidades de dichas bacterias presentes tanto en coral sano como enfermo.

7.2.2. Descripción bioquímica de los aislamientos bacterianos.

De los 27 aislamientos asociados a las enfermedades presentes en *S. siderea* y a coral sano que fueron sembrados en agar TCBS (Tabla 3 y 4), 26 mostraron colonias amarillas (Anexo 2) y una presentó colonias verdes (BRB2), lo que permitió evidenciar que el género *Vibrio* se encuentra asociado tanto a coral sano como a cada una de las enfermedades de *S. siderea*. Para el caso de BRB2 (bacteria 2, aislada de banda rosa), muy probablemente el aislamiento se trate de *Vibrio parahaemolyticus*, ya que la presencia de colonias verdes en este medio es característico de esta especie (Lotz 1983). Adicionalmente, el aislamiento PTBB9 (bacteria 9, aislada de puntos blancos), el cual fue seleccionado para la prueba de antagonismo, no presentó crecimiento en este medio, por lo que se descarta la posibilidad de que este microorganismo pertenezca al género *Vibrio*.

Frente a las pruebas bioquímicas realizadas para los 12 aislamientos seleccionados tanto de coral sano como de las enfermedades más predominantes (Tabla 3), se logró llegar a una aproximación de las posibles especies (Tabla 7), para ello se comparó el perfil bioquímico de cada uno de los aislamientos evaluados con los perfiles descritos por Buller (2004) y MacFaddin (2003), de los microorganismos que han sido reportados como agentes causales de cada una de las enfermedades. A partir de esto, se observó que muy posiblemente *Vibrio rotiferianus* y *Vibrio alginolyticus* se encuentran asociados al coral sano, al tener unos

porcentajes de coincidencia del 77,778% y 80% respectivamente. Así mismo, posiblemente *V. rotiferianus* se encuentra presente en las diferentes enfermedades, como se muestra en la Tabla 7 y en la Tabla A del Anexo 3. En el caso de la enfermedad de puntos blancos se observó la presencia de lo que probablemente sea *V. natriegens*, una de las bacterias asociadas a la enfermedad de puntos blancos ulcerativos en *Porites* sp. (Arboleda & Reichardt 2010) con un porcentaje de coincidencia del 73,077%.

Frente a la enfermedad de puntos oscuros, se encontró una bacteria con la cual no se pudo llegar a la aproximación a especie, ya que esta presentó una producción de ácido sulfhídrico (H_2S), el cual no es característico del género *Vibrio*, pero posiblemente se trate de *Proteus* sp., un género que como lo reporta Lotz (1983), puede llegar a crecer en este medio como colonias verdes de borde translúcido como se evidencia en el Anexo 2. y generalmente presenta producción de H_2S (Holt et al. 2000). Sin embargo es necesario confirmar la identidad de este microorganismo con pruebas moleculares.

Por último, en la enfermedad de banda blanca el aislamiento BBB2.1 (bacteria 2.1 aislada de banda blanca) mostró una coincidencia de 77,419% con *V. harveyi* /*V. carchariae* (Tabla D, del anexo 3), uno de los posibles patógenos del tipo II de esta enfermedad como lo propone Ritchie & Smith (1998). De igual manera se encontró que BBB11 (bacteria 11 aislada de banda blanca) probablemente corresponda a *V. alginolyticus*, puesto que este aislamiento presentó una prueba de la cuerda positiva, la cual se puede evidenciar en esta especie con una longitud < a 3mm (Keast & Riley 1997), sumado a esto BBB11 presentó un porcentaje de similitud de 74,286% con la especie (Tabla C del Anexo 3 y Tabla 7).

Teniendo en cuenta que el medio TCBS permite el crecimiento de diferentes especies de *Vibrio*, especialmente *V. cholerae*, *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus* (BD 2003), también se comparó el perfil bioquímico de cada uno de los aislamientos seleccionados con los reportados para estas especies, a partir de lo cual se evidenció en algunos casos una coincidencia con *V. alginolyticus*, pero con un porcentaje de similitud menor al encontrado con *V. rotiferianus*, por lo que se tomó la decisión de reportar dichos aislamientos como la última especie mencionada (Tabla 7 y Tabla G del Anexo 3), ya que esta presenta

crecimiento en medio TCBS de color amarillo entre 2-3mm de diámetro según lo descrito por Gomez-Gil et al. (2003).

Tabla 7: Posibles especies asociadas a las enfermedades con mayor cobertura en *Siderastrea siderea*, en el arrecife de Punta Cebolleta en Isla Fuerte, Bolívar. En la tabla se muestra el porcentaje de identidad con el perfil de bioquímicas reportado para cada una de las especies, junto con la referencia de las cuales se obtuvo. *Proteus* sp., no presenta porcentaje de similitud, ya que este no fue comparado con el perfil bioquímico de ningún microorganismo, al no tener certeza del género y se muestra la coincidencia de los diferentes aislamientos con *V. alginolyticus*.

Aislamiento	Posible microorganismo	Porcentaje de similitud (%)	Referencia	Porcentaje de similitud (%) con <i>V. alginolyticus</i>	Referencia
SB1	<i>V. rotiferianus</i>	77,778	Buller (2004)	77,143	MacFaddin (2003)
SB6	<i>V. alginolyticus</i>	80	Buller (2004)	-	MacFaddin (2003)
SB19	<i>V. rotiferianus</i>	77,778	Buller (2004)	71,429	MacFaddin (2003)
PTBB1	<i>V. rotiferianus</i>	77,778	Buller (2004)	77,143	MacFaddin (2003)
PTBB2.2	<i>V. natrigens</i>	73,077	Buller (2004)	-	-
PTBB6	<i>V. rotiferianus</i>	77,778	Buller (2004)	68,571	MacFaddin (2003)
POB1	Posiblemente <i>Proteus</i> sp.	-	-	-	-
POB3	<i>V. rotiferianus</i>	77,778	Buller (2004)	57,143	MacFaddin (2003)
POB7	<i>V. rotiferianus</i>	72,222	Buller (2004)	68,571	MacFaddin (2003)
BBB2.1	<i>V.harveyi</i> / <i>V. carchariae</i>	77,419	MacFaddin (2003)	-	MacFaddin (2003)
BBB10	<i>V. rotiferianus</i>	83,333	Buller (2004)	71,429	MacFaddin (2003)
BBB11	<i>V. alginolyticus</i>	74,286	MacFaddin (2003)	-	

Es importante aclarar, que todas las aproximaciones de especies mostradas en la Tabla 7 y 8, deben ser rectificadas mediante técnicas moleculares, como amplificación y secuenciación del gen 16s rRNA, con el fin de asegurar un porcentaje de identidad mayor al 95 %.

En resumen, a partir de la caracterización morfológica y bioquímica se encontraron asociados a coral sano: 2 bacilos Gram positivos, a *Streptomyces* sp., lo que probablemente

es *V. rotiferianus* y *V. alginolyticus*. Dentro de las enfermedades con mayor cobertura de *S. siderea*, se encontraron 3 especies diferentes de *Vibrio* como se muestra en la Tabla 8 y en las demás enfermedades se encontró la presencia del género *Vibrio*.

Tabla 8: Aislamientos identificados en este estudio. En la tabla se muestran las bacterias aerobias (*Streptomyces* sp. y *Nocardia kruczakiae*) y anaerobias facultativas (diferentes especies de *Vibrio*) identificadas mediante la aproximación bioquímica, junto con aquellos aislamientos particulares por morfología asociados tanto a coral sano como a cada una de las enfermedades (bacterias Gram positivas y levaduras).

Estado del coral	Nombre del aislamiento	Microorganismo presuntivo
Sano	SB1	<i>V. rotiferianus</i>
	SB6	<i>V. alginolyticus</i>
	SB19	<i>V. rotiferianus</i>
	SA1	<i>Streptomyces</i> sp.
	Bacilos Gram positivos (2)	-
Puntos blancos	PTBB1	<i>V. rotiferianus</i>
	PTBB2.2	<i>V. natriegens</i>
	PTBB6	<i>V. rotiferianus</i>
Puntos oscuros	POB1	Posiblemente <i>Proteus</i> sp.
	POB3	<i>V. rotiferianus</i>
	POB7	<i>V. rotiferianus</i>
Banda blanca	BBB2.1	<i>V.harveyi</i> / <i>V. carchariae</i>
	BBB10	<i>V. rotiferianus</i>
	BBB11	<i>V. alginolyticus</i>
Plaga blanca	PBB4	
	PBB10	<i>Vibrio</i> sp.
	PBB12	
Aspergillosis	ASB5	
	ASB6	<i>Vibrio</i> sp.
	ASB8	
Banda negra	BNB13.2	
	BNB15	<i>Vibrio</i> sp.
	BNB16	
	Bacterias Gram positivas (2)	-
	Levaduras (1)	-

	BRB2	<i>V. parahaemolyticus</i>
Banda rosa	BRB5	<i>Vibrio</i> sp.
	BRB8	
	BRA1	
Banda amarilla	BAB2.1	<i>Vibrio</i> sp.
	BAB6.1	
	BAB7	

En primer lugar, es interesante ver que como se muestra en la Tabla 8, la posible presencia de *V. rotiferianus* tanto en coral sano como enfermo, coincide con reportes de otros autores como Cárdenas et al. (2012), quienes también evidencian la presencia de esta especie de *Vibrio* en coral sano de *S. siderea* y con la enfermedad de plaga blanca. Esto puede deberse al hecho de que el holobionte coralino posiblemente puede estar desarrollando una relación comensal con *V. rotiferianus*, quien puede estar vinculado con la perpetuación del equilibrio de las comunidades microbianas, pero una vez se presentan condiciones cambiantes, como en este caso el aumento de la temperatura y la gran cantidad de nutrientes presentes en los sedimentos, se rompe esta relación comensal y posiblemente *V. rotiferianus* pasa a jugar un papel de patogenicidad, al aumentar su población y superar la capacidad de carga del holobionte (Krediet et al. 2013)

Adicionalmente podría pensarse, que *Vibrio rotiferianus* posiblemente posee un rol oportunista en esta especie coralina, a causa de que ha sido asociado con la generación de enfermedades coralinas como es el caso de la enfermedad de banda amarilla en *Fungia* sp., al formar consorcios con otras especies de *Vibrio* como: *Vibrio proteolyticus*, *Vibrio harveyi* y *Vibrio alginolyticus*, los cuales afectan la relación simbiótica del coral-zooxantela y generan patrones de lesiones de bandas amarillas en esta especie de coral (Cervino et al. 2008). Aquí cabe destacar que para poder confirmar esta teoría, es necesario llevar a cabo la identificación de los demás aislamientos asociados tanto a coral sano como a enfermo, así como un recuento de cada uno de los mismos.

Por otro lado, la posible presencia de otras especies de *Vibrio* asociadas a las enfermedades más predominantes de *Siderastrea siderea*, pueden estar actuando como oportunistas bajo los altos patrones de sedimentación y elevada temperatura que se evidenciaron para

septiembre del 2014 en Isla Fuerte, ya que como lo explica Ritchie (2006) y Harvell et al. (2007) pueden darse dos eventos: primero, las propiedades antimicrobianas del mucopolisacárido del coral se pueden ver reducidas, al disminuir las concentraciones de los microorganismos residentes (como bacterias Gram positivas) por lo que *Vibrio* puede aumentar su densidad poblacional y llevar al desarrollo de la enfermedad. O segundo, las comunidades de *Vibrio* pueden llegar a desplazar la microbiota normal del coral y conllevar a los eventos de enfermedad (Ritchie 2006).

Otro de los aspectos que apoya la idea de que *Vibrio* puede actuar como un oportunista en la generación de enfermedades en *S. siderea*, se relaciona con la presencia de *V. alginolyticus* en fragmentos de tejido coralino sano y enfermo, ya que esta junto con *V. harveyi* a pesar de que están ampliamente relacionadas con la generación de enfermedades en diferentes especies de coral (Gil-Agudelo et al. 2009; Rosenberg et al. 2007; Sheridan et al. 2013; Zhenyu et al. 2013), también pueden establecer relaciones mutualistas con el holobionte y llevar a cabo procesos de fijación de nitrógeno al poseer la enzima nitrogenasa, de tal forma que le proveen al coral este nutriente para su desarrollo, (Chimetto et al. 2008; Krediet et al. 2013), por lo que actuarían como patógenos únicamente cuando se rompe el balance entre estos y los microorganismos residentes, por una sobrepoblación.

Así mismo, como lo menciona Tai et al. (2010), podría pensarse que *V. harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. natriegens* hayan podido aumentar su resistencia a antimicrobianos presentes en el mucopolisacárido e incrementar la expresión de genes de virulencia, como los relacionados con el *Quórum-sensing*, para la formación de biopelículas que permiten aumentar la densidad poblacional (Tait et al. 2010), ya que se ha demostrado que bajo condiciones de elevada temperatura los microorganismos patógenos, tienden a mostrar estas características (Lesser et al. 2007), lo que se traduciría en un aumento de estos microorganismos en el tejido coralino y en el mucopolisacárido, lo que finalmente lleva a el desarrollo de enfermedades en el coral.

Ahora bien, es probable que la capacidad que tiene el género *Vibrio* de desarrollarse en ambientes anaerobios (Holt et al. 2000), así como el hecho de que algunas especies tienen

la capacidad de producir enzimas como las catalasa y la super-óxido dismutasa (Munn et al. 2008), que les permiten protegerse frente a las especies reactivas de oxígeno, le posibilita a este microorganismo atacar al coral y desarrollarse cuando en este hay una baja producción de oxígeno y un elevado estrés oxidativo, por el daño en los fotosistemas del alga simbiote en presencia de elevadas temperaturas.

De igual manera, podría pensarse que las relaciones mutualistas o comensales que generalmente desarrollan algunas especies de *Vibrio* (como *V. harveyi*, *V. alginolyticus*) con el holobionte coralino, pueden verse perturbadas en este caso debido a la presencia de altas concentraciones de nutrientes, ya que el río Sinú al parecer descarga en el arrecife Punta Cebolleta fuentes inorgánicas de nitrógeno: como nitratos y nitritos (Sánchez et al. 2014), los cuales al poder ser usados por estos microorganismos, podrían estar favoreciendo el desarrollo del género en la superficie coralina (Leyton & Riquelme 2008). Lo que sumado a la capacidad de estos microorganismos de desarrollarse en concentraciones de salinidad, podría conllevar a que se dé una sobrepoblación del género en el coral y el desarrollo de las diferentes enfermedades.

Por otra parte, la posible presencia de *V. natriegens* en la enfermedad de puntos blancos puede sugerir que este microorganismo puede estar directamente relacionado con la generación de los signos de la enfermedad, ya que esta especie ha sido reportada como posible agente causal del síndrome de puntos blancos ulcerativos de *Porites* sp., llegando a cumplir la totalidad de los postulados de Koch. De forma similar ocurre con la posible presencia de *Vibrio parahaemolyticus*, un patógeno humano (Wu et al. 2014) que se encontró también en la enfermedad de banda rosa, por lo que puede estar relacionado con el desarrollo de esta, aunque aun no se tiene claro el rol de este microorganismo en el coral.

En cuanto a la probable presencia de *Proteus* sp. en la enfermedad de lunares oscuros, puede decirse que este no ha sido reportado, por lo que se hace necesario llevar a cabo estudios que permitan tener un acercamiento a la ecología microbiana de esta enfermedad y determinar si este microorganismo cumple algún papel en el desarrollo de la misma, pues a pesar de que este microorganismo puede estar asociado a flora acompañante al pertenecer a

la familia Enterobacteriaceae, se relaciona ampliamente con enfermedades urinarias, infecciones en heridas e incluso artritis reumatoide en humanos, lo cual sumado al hecho de que es un patógeno oportunista, podría implicar que este microorganismo puede jugar un rol en el desarrollo de la enfermedad de puntos oscuros, aunque es prematuro dar conclusiones al respecto (Rózalski et al. 2012).

Para concluir, a partir de lo encontrado en este estudio, podemos decir que los eventos de enfermedad de *Siderastrea siderea* posiblemente se relacionan con factores ambientales cambiantes que conllevan a que el género *Vibrio* actué como oportunista y ocasione un desequilibrio de la microbiota residente del coral (Ritchie 2006; Tait et al. 2010).

7.2.3. Descripción bioquímica de las actinobacterias

Frente a la caracterización bioquímica de las actinobacterias, es de resaltar que el aislamiento BRA1 (actinobacteria aislada de banda rosa), presentó una coincidencia del 93,3% con *Nocardia kruczakiae*, lo que sugiere que muy posiblemente este aislamiento corresponde a esta especie (**Tabla E**, del Anexo 3). En contraste la actinobacteria aislada de coral sano (SA1), no pudo ser identificada a nivel de especie a causa del gran número de especies que existen para el género *Streptomyces*, sin embargo los resultados de su perfil bioquímico se muestran en la Tabla F del Anexo 3.

Teniendo en cuenta esto, en primer lugar es importante mencionar, que haber obtenido el aislamiento de BRA1 a partir del fragmento de coral con signos de enfermedad de banda rosa y SA1 a partir de coral sano, muestra que las actinobacterias juegan un papel importante en el tejido coralino, como lo reportan autores como Lampert et al. (2008), quienes afirman que las actinobacterias constituyen una abundancia aproximada del 10 al 50% de la microbiota de los corales. En el caso del aislamiento de *Streptomyces* sp. (SA1), es probable que esta actinobacteria se encuentre asociada a la producción de compuestos antimicrobianos bien sea en el mucopolisacárido o en el tejido coralino, lo que le provee al coral una primera línea de defensa frente a patógenos (Nithyanand et al. 2010; Zhang et al. 2013).

En segundo lugar, el aislamiento de *Streptomyces* a partir del tejido coralino sano de *S. siderea*, se asemeja a resultados obtenidos por autores como Sun et al. (2012) quienes logran obtener un total de 32 aislamientos de actinobacterias a partir del coral *Scleronephthya* sp., de los cuales 4 fueron del género *Streptomyces* y presentaron genes asociados a la producción de policétidos (metabolitos secundarios como antibióticos). De igual manera coincide con estudios de Nithyanand et al. (2011), quienes aislaron 15 actinobacterias a partir del mucopolisacárido de *Acropora digitifera* siendo *Streptomyces* el género más predominante, lo cual apoya la idea de que las actinobacterias proveen de cierta manera la capacidad antimicrobiana al coral en especial al mucopolisacárido, lo que relaciona a estos microorganismos con el mantenimiento de la homeostasis de la microbiota coralina.

Para el caso de BRA1 (actinobacteria aislada de banda rosa), la aproximación de la identidad de esta frente al género *Nocardia*, se apoya también en reportes de Zhang et al. (2012) quienes lograron aislar un 4,1% de actinobacterias del género *Nocardia* a partir de 5 especies de corales gorgonios. Por ello, aunque es prematuro hablar sobre el papel de estos microorganismos en las enfermedades coralinas, es probable que BRA1 este jugando algún papel en el desarrollo de la enfermedad de banda rosa, ya que a pesar de que muy pocas actinobacterias han sido aisladas a partir de fragmentos de coral enfermo, aun así se tienen reportes como el de Cárdenas (2012) de *Norcardiopsis alba* aislada a partir de un fragmento de *Diploria strigosa* con signos de plaga blanca.

7.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA IN-VITRO:

La técnica de doble capa permitió evidenciar la actividad antagónica *in-vitro* de *N. kruczakiae* y *Streptomyces* sp., frente a 4 bacterias de la enfermedad de puntos blancos (la enfermedad con mayor cobertura en *Siderastrea siderea*), observando que las dos actinobacterias presentaron un potencial de inhibición en todos los casos como se muestra en la Tabla 9. y en la figura 12. Sin embargo el potencial antagónico de *N. kruczakiae*, fue mayor que el de *Streptomyces* sp., frente a los dos aislamientos de *V. rotiferianus* (PTBB1 y PTBB6) y frente a *V. natriengens* (PTBB2.2).

Tabla 9: Medidas de los halos de inhibición de *N. kruczakiae* y *Streptomyces* sp. frente a bacterias asociadas a la enfermedad de puntos blancos. Nótese que *N. kruczakiae* presenta mayores halos de inhibición frente a los dos aislamientos de *V. rotiferianus* (PTBB1 y PTBB6) y frente a *V. natriengens* (PTBB2.2). Por su parte *Streptomyces* sp., muestra un mayor halo de inhibición frente a PTBB9 (aislamiento no identificado, pero se sabe, que no pertenece a el género *Vibrio*). PTBB1 y PTBB6 son aislamientos diferentes que corresponden a una misma especie.

Cepa	Medida real halo de inhibición(mm)			Promedio medida real halo de inhibición (mm)	Desviación	Coeficiente de variación (%)
	R1	R2	R3			
<i>N. kruczakiae</i> VS. <i>V. rotiferianus</i> (PTBB1)	23,75	23,75	26,75	24,8	1,7	7,00
<i>N. kruczakiae</i> VS. <i>V. natriengens</i>	15,5	15,5	14,75	15,3	0,4	2,84
<i>N. kruczakiae</i> VS. <i>V. rotiferianus</i> (PTBB6)	21,25	22,25	22,25	21,9	0,6	2,63
<i>N. kruczakiae</i> VS. PTBB9	21	22,25	20,5	21,3	0,9	4,24
<i>Streptomyces</i> sp. VS. <i>V. rotiferianus</i> (PTBB1)	7,25	6,75	8,75	7,6	1,0	13,73
<i>Streptomyces</i> sp. VS. <i>V. natriengens</i>	6	6,75	6,5	6,4	0,4	5,95
<i>Streptomyces</i> sp. VS. <i>V. rotiferianus</i> (PTBB6)	8,5	6,5	7	7,3	1,0	14,19
<i>Streptomyces</i> sp. VS. PTBB9	27,25	31,5	31	29,9	2,3	7,76

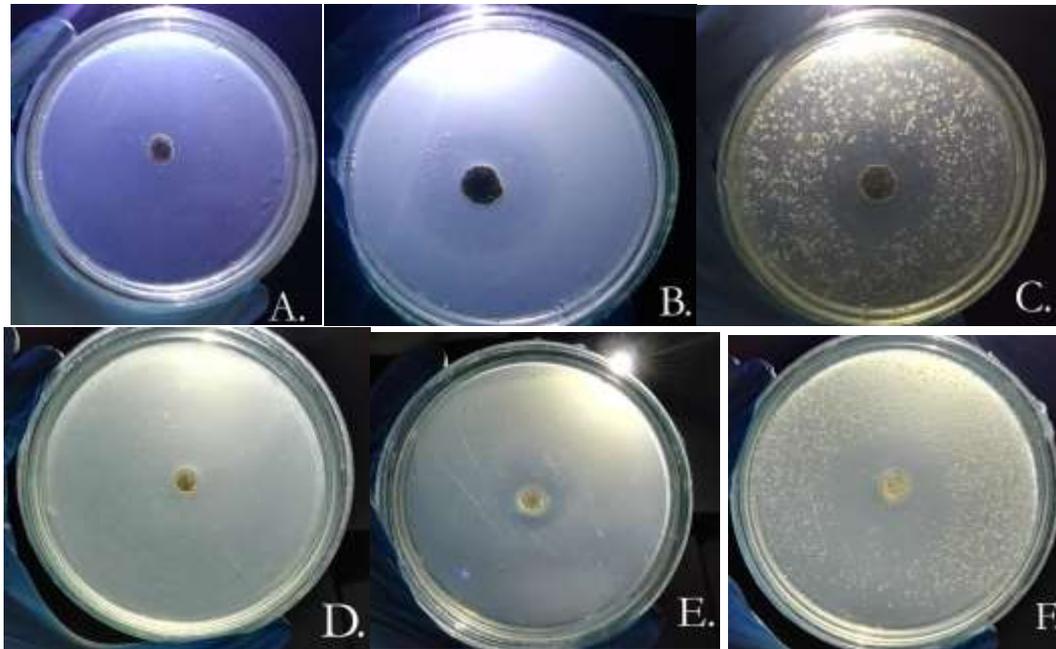


Figura 12. Halos de inhibición de *N. kruczakiae* y *Streptomyces* sp., frente a cuatro de los aislamientos de puntos blancos. **A.** Control de *N. kruczakiae*, **B.** *N. kruczakiae* VS. *V. rotiferianus* (PTBB1), **C.** *N. kruczakiae* VS. PTBB9, **D.** Control de *Streptomyces* sp, **E.** *Streptomyces* sp. VS. *V. rotiferianus* (PTBB1), **F.** *Streptomyces* sp. VS. PTBB9.

7.3.1. Análisis estadístico de los halos de inhibición obtenidos:

El análisis de resultados, permitió evidenciar que las pruebas de antagonismo presentaron una distribución normal con un nivel de confianza del 95%, con los siguientes valores de $P=0,77; 0,98; 0,96; 0,99; 0,96; 0,86$ (Figuras 14 y 15 del Anexo 4). A partir de esto se realizó la prueba de Bartlett, con lo que se rechazó la hipótesis nula de homogeneidad de varianzas con un valor de $P= 0,02 \leq \alpha=0,05$, por lo que se llevó a cabo un análisis de varianza no paramétrico, mediante la prueba de Kruskal-wallis a partir de la cual se evidenció que existen diferencias significativas entre la medianas de los halos de las diferentes cepas evaluadas, al obtener un valor de $P= 0,002$ (Figura 13).

Por otro lado, a partir de la prueba de rangos múltiples (Figura 18, del Anexo 4), se evidenció claramente que los enfrentamientos de *N. kruczakiae* VS. *V. rotiferianus* (PTBB1), *N. kruczakiae* VS *V. rotiferianus* (PTBB6), *N. kruczakiae* VS PTBB9 y *Streptomyces* sp. VS PTBB9, son los que presentaron las diferencias más significativas (Figura 13), esto junto con la medida de los halos de inhibición de cierta forma nos ilustra

que muy posiblemente *N. kruczakiae* tiene una mayor capacidad de inhibición de las bacterias asociadas a la enfermedad de puntos blancos.

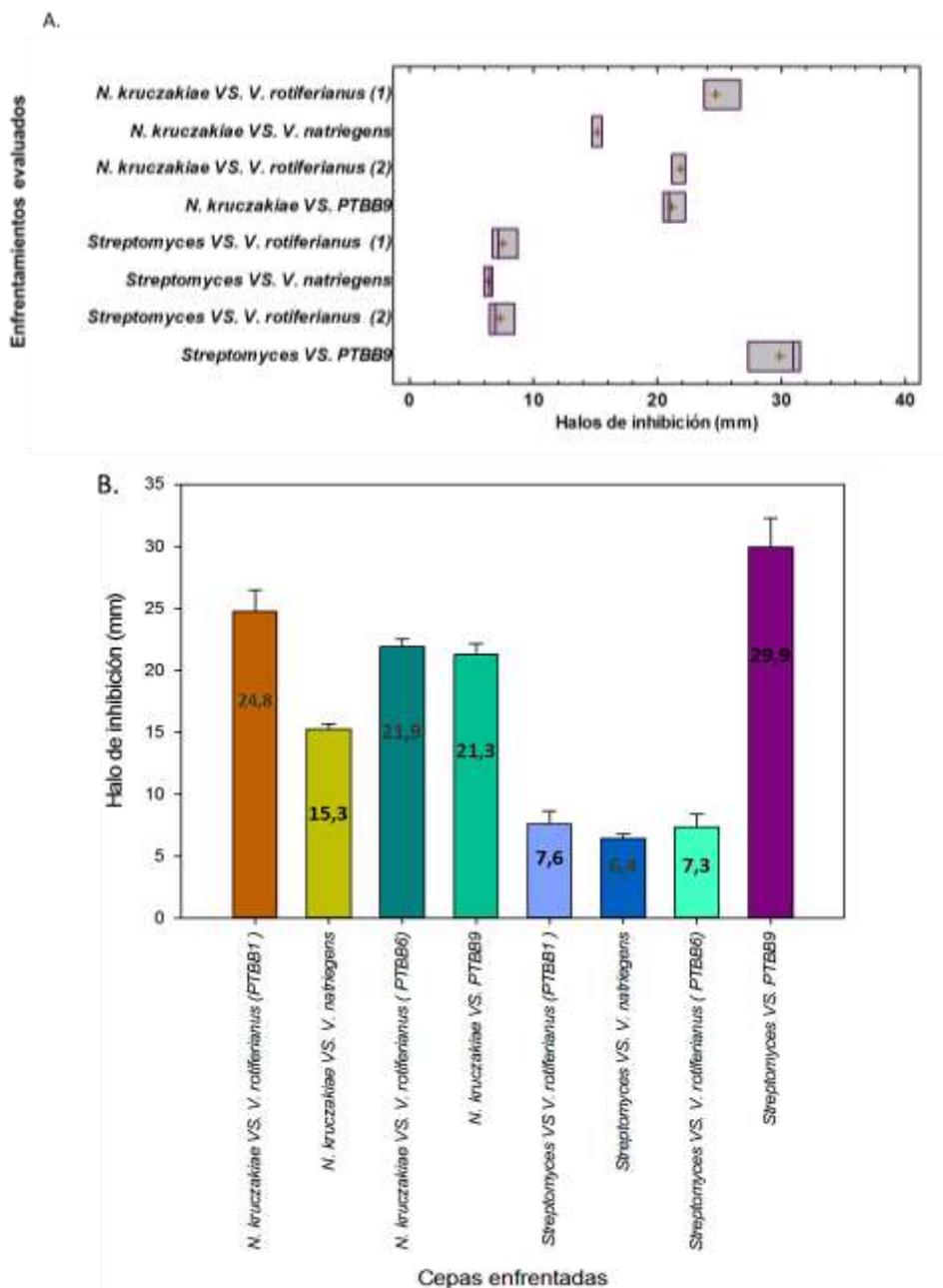


Figura 13. A. Diagrama de cajas y bigotes, obtenido a partir de la prueba de Kruskal-wallis. En la gráfica se muestran las diferencias entre las medianas de los halos de inhibición, donde (1) y (2) representan a PTBB1 y PTBB6 respectivamente. **B.** histograma de las medidas de los halos de inhibición obtenidos para cada uno de los enfrentamientos evaluados.

A partir de lo mostrado en la Tabla 9. y en la Figura 13., en primer lugar, es necesario recalcar, que la actividad antagónica de las actinobacterias aisladas tanto de coral sano (*Streptomyces* sp.), como de la enfermedad de banda rosa (*Nocardia kruczakiae*), frente a los cuatro aislamientos bacterianos de la enfermedad de puntos blancos, concuerda con los reportes de Mancilla (2003), quien evidencia la formación de halos de inhibición de 11 mm a 41mm de diámetro, al enfrentar a las actinobacterias del género *Streptomyces* aisladas de sedimentos y agua de mar, frente a bacterias patógenas de humanos, como *E.coli* y *S. aureus*. De igual forma lo obtenido en este estudio se asemeja a lo encontrado por Kadiri et al. (2014), quienes evidencian que 9 actinobacterias asociadas a 6 esponjas del mar de India presentan actividad antagónica frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, observando halos de inhibición de 8-28 mm, los cuales son similares en magnitud a los obtenidos en este estudio (7,3-29.9mm).

En segundo lugar, se observó que los dos aislamientos de actinobacterias presentaron una inhibición frente a los 3 aislamientos seleccionados de la enfermedad de mayor cobertura de *S. sidera*, pertenecientes al género *Vibrio* (Tabla 7) y frente a PTBB9, lo cual coincide con lo obtenido por Velmurugan et al. (2015), quienes al enfrentar actinobacterias aisladas de sedimentos de pozos de cultivo de camarón con diferentes especies de *Vibrio*: *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi*, (los cuales han sido asociados a arrecifes coralinos y eventos de enfermedad de los mismos como se mencionó anteriormente), obtienen halos de inhibición entre 7-16mm de diámetro, muy similares a los obtenidos en este trabajo. Dicha inhibición mostrada tanto *N. kruczakiae* como *Streptomyces* sp., puede estar dada por la capacidad que tienen de producir compuestos con propiedades antibacteriales, que permiten eliminar y/o reducir la densidad poblacional microorganismos competidores del ambiente como lo es *Vibrio* (Das et al. 2008; Joyce & Zorro 2011).

De igual forma, como puede verse en la Tabla 9. y en la prueba de comparación de rangos múltiples (Figura 18, Anexo 4), *Nocardia kruczakiae* presentó la mayor actividad antagónica frente a los dos aislamientos de *V. rotiferianus* y frente a *V. natriegens*. En

contraste *Streptomyces* sp. presentó una menor actividad frente a estos aislamientos, lo cual muestra de cierta forma las interacciones microbianas que se pueden llegar a dar en las comunidades microbianas asociadas a tejido coralino, ya que como lo menciona Mouchka et al. (2010), los microorganismos patógenos pueden alterar la microbiota residente del coral, ya que si tienen una mayor afinidad a los sustratos disponibles en el hospedero y la capacidad de producir compuestos como antibióticos, logran desplazarla, obteniendo una ventaja competitiva frente a estas especies probióticas potenciales.

La mayor actividad inhibitoria presentada por *Nocardia kruczakiae* frente a 3 de los aislamientos evaluados, se relaciona con el hecho de que *Nocardia* es un género que se encuentra asociado a enfermedades en humanos, especialmente, esta especie ha sido vinculada con enfermedades pulmonares en pacientes inmuno-suprimidos (Conville et al. 2004), por lo que probablemente una vez ha desplazado la microbiota del coral, puede llegar a jugar un papel en el desarrollo de la enfermedad de banda rosa, aunque es prematuro dar conclusiones sobre esto.

En contraste, la actinobacteria asociada a coral sano, puede relacionarse con un rol de protección del coral frente a microorganismos patógenos que se encuentren en la columna de agua, ya que presentó los mayores halos de inhibición frente a PTBB9 y a pesar de presentar una menor actividad antagónica frente a los aislamientos de *Vibrio* (PTBB1, PTBB2.2 y PTBB6), muestra una inhibición de ellos, probablemente por la capacidad de producción de antimicrobianos, lo que de cierta forma puede relacionarse con impedir la formación de biofilms por parte de las comunidades de *Vibrio* sobre el tejido coralino y así permitir la estructuración de las comunidades residentes del coral, promoviendo la proliferación de especies probióticas (Cárdenas & Arévalo-Ferro 2013; Nithyanand et al. 2010; Shnit-Orland & Kushmaro 2009).

8. CONCLUSIONES

- *Siderastrea siderea* se ve afectada por las condiciones ambientales cambiantes de Isla Fuerte, lo que se evidencia en los valores de cobertura de coral muerto, los índices de mortalidad y desarrollo coralino, así como en la presencia de las diferentes enfermedades.
- Los eventos de enfermedad de *Siderastrea siderea* en el arrecife de Punta Cebolleta, se relacionan con factores ambientales cambiantes que conllevan a que el género *Vibrio* actué como oportunista y ocasione un desequilibrio de la microbiota residente del coral.
- La mayor actividad antagónica que presenta *Nocardia kruczakiae* frente a los aislamientos de *Vibrio*, le otorga una posible ventaja competitiva al eliminar y/o reducir la densidad poblacional de los mismos.
- La actividad antagónica de *Streptomyces* sp. puede estar relacionada con la primera línea de defensa de *S. sidera* frente a patógenos

9. RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS

- Se recomienda llevar a cabo la identificación de cada uno de los aislamientos obtenidos en este trabajo, mediante técnicas moleculares como secuenciación del gen 16S rRNA.
- Llevar a cabo estudios de monitoreo en el arrecife de Punta Cebolleta, durante un periodo prolongado de tiempo, con el fin de determinar la incidencia y la prevalencia de las enfermedades de *S. siderea*. Esto acompañado de la toma de parámetros físico-químicos, que permitan determinar la relación directa de estos con el desarrollo de la enfermedad.
- Llevar a cabo estudios de trazabilidad de los sedimentos en Isla Fuerte, Bolívar.
- Realizar estudios que se enfoquen en el aislamiento de hongos filamentosos y levaduriformes, a partir de muestras de tejido coralino sano y de las diferentes enfermedades presentes en *S. siderea*, con el fin de tener un mayor entendimiento de las comunidades microbianas asociadas a este coral.
- Llevar a cabo estudios independientes de cultivo, basados en técnicas moleculares, que permitan identificar la totalidad de la microbiota asociada al coral sano y a las enfermedades coralinas.
- Realizar estudios de bioprospección con *N. kruczakiae* y *Streptomyces* sp., como posibles controladores de enfermedades.
- Se recomienda de igual forma, llevar a cabo las caracterizaciones bioquímicas de los aislamientos bacterianos a partir de un medio no selectivo, ya que en este estudio se cometió el error de desarrollar algunas de ellas a partir de medio TCBS, lo cual puede llevar a falsos positivos. Lo que en este estudio, no permitió identificar un mayor número de aislamientos, al tener que repetir dichas pruebas.
- Se recomienda volver a realizar las pruebas bioquímicas de los aislamientos evaluados en este trabajo, acompañados de controles de ATCC para *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio rotiferianus*, para con ello verificar los resultados obtenidos en este trabajo.

- Evaluar la resistencia a antimicrobianos de los aislamientos obtenidos en este estudio.

10. BIBLIOGRAFÍA

Acevedo LA, Moreno YB, Sierra LAV (2014) Impacto de la sedimentación en los corales de Islas del Rosario y San Bernardo, *Colombia. Cuaderno Activa* (6): 133-141

Alemu JB & Clement Y (2014) Mass coral bleaching in 2010 in the southern Caribbean. *PLoS one* 9 (1): 1-8

Arboleda MD & Reichardt WT (2010) *Vibrio* sp. causing porites ulcerative white spot disease. *Diseases of Aquatic Organisms* 90(2): 93-104

Aronson R, Bruckner A, Moore J, Precht B, E Weil (2008) *Siderastrea siderea*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2008*. Disponible en línea en: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T133389A3720000.en>

Baker AC, Glynn PW, Riegl B (2008) Climate change and coral reef bleaching: An ecological assessment of long-term impacts, recovery trends and future outlook. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*:80(4): 435-471

Barash Y, Sulam R, Loya Y, Rosenberg E (2005) Bacterial strain BA-3 and a filterable factor causes a white plague-like disease in corals from the eilat coral reef. *Aquatic Microbial Ecology* 40(2): 183-189

Bartley R, Bainbridge ZT, Lewis SE, Kroon FJ, Wilkinson SN, Brodie JE, Silburn DM (2014) Relating sediment impacts on coral reefs to watershed sources, processes and management: A review. *Science of the Total Environment* 468: 1138-1153

Bernal N (2012) Cobertura arrecifal de Isla Fuerte, en relación con su uso y normativas de manejo, Cartagena, Bolívar, Caribe colombiano. Trabajo de grado de Pregrado, Dpto. de Biología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia

BD (2003). Instrucciones se uso –medios en placa listos para usar. BD TCBS Agar. Disponible en: <https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/PA/ES-PA-254432.pdf>

Birkeland C (1997) *Life and death of coral reefs*. Springer Science & Business Media.

Borger JL (2005) Dark spot syndrome: A scleractinian coral disease or a general stress response? *Coral Reefs* 24(1): 139-144

Buerger P, Schmidt GM, Wall M, Held C, & Richter C (2015) Temperature tolerance of the coral *Porites lutea* exposed to simulated large amplitude internal waves (LAIW). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 471: 232-239

Buller NB (2004) *Bacteria from fish and other aquatic animals: a practical identification manual*. Cabi.

Burge CA, Mark Eakin C, Friedman CS, Froelich B, Hershberger PK, Hofmann EE, & Harvell CD (2014) Climate change influences on marine infectious diseases: implications for management and society. *Annual review of marine science* 6: 249-277

Cárdenas A, Rodríguez-R LM, Pizarro V, Cadavid LF, Arévalo-Ferro C (2012) Shifts in bacterial communities of two Caribbean reef-building coral species affected by white plague disease. *The ISME Journal*, 6(3): 502-512

Cárdenas A J, & Arévalo-Ferro C (2013) Papel de las comunidades bacterianas en sistemas arrecifales. *Red de Estudios del Mundo Marino, Remar*. 67-83

Carricart-Ganivet J, Vásquez-Bedoya L, Cabanillas-Terán N, Blanchon P (2013) Gender-related differences in the apparent timing of skeletal density bands in the reef-building coral *Siderastrea siderea*. *Coral Reefs* 32(3): 769-777

Casas D (2011) Estado de conservación de la comunidad arrecifal presente en isla fuerte-Bolívar (Colombia). Trabajo de grado de Pregrado, Dpto. de Biología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia

Castillo KD, Ries JB, Weiss, JM (2011) Declining coral skeletal extension for forereef colonies of *Siderastrea siderea* on the mesoamerican barrier reef system, southern Belize. *PloS One* 6(2): 14615. doi:10.1371/journal.pone.0014615 [doi]

Cervino J, Goreau T, Nagelkerken I, Smith G, Hayes R (2001) Yellow band and dark spot syndromes in caribbean corals: Distribution, rate of spread, cytology, and effects on abundance and division rate of zooxanthellae. *The ecology and etiology of newly emerging marine diseases*: 53-63

Cervino J M, Hayes RL, Polson, S W, Polson SC, Goreau TJ, Martinez RJ, Smith GW (2004) Relationship of *Vibrio* species infection and elevated temperatures to yellow blotch/band disease in Caribbean corals. *Applied and Environmental Microbiology* 70(11): 6855-6864

Cervino J, Thompson F, Gomez-Gil B, Lorence E, Goreau T, Hayes R, Winiarski-Cervino KB, Smith GW, Huguen K, Bartels E (2008) The *Vibrio* core group induces yellow band disease in Caribbean and Indo-Pacific reef-building corals. *Journal of Applied Microbiology* 105(5): 1658-1671

Chimetto LA, Brocchi M, Thompson CC, Martins RC, Ramos HR, Thompson FL (2008) Vibrios dominate as culturable nitrogen-fixing bacteria of the brazilian coral *Mussismilia hispida*. *Systematic and Applied Microbiology* 31(4): 312-319

Conville PS, Brown JM, Steigerwalt AG, Lee JW, Anderson VL, Fishbain JT, Holland SM, Witebsky FG (2004) *Nocardia kruczakiae* sp. nov., a pathogen in immunocompromised patients and a member of the "N. nova complex". *Journal of clinical microbiology* 42(11): 5139-5145

Correa MF (2008) *Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas* Editorial de la Universidad de Granada

Das S, Ward LR, Burke C (2008) Prospects of using marine actinobacteria as probiotics in aquaculture. *Applied microbiology and biotechnology* 81(3): 419-429

Davin, TB Brannet, AP (2010) Coral Reefs : Biology, Threats and Restoration. New York, NY, USA: Nova

Díaz JM, Sánchez JA, Díaz-Pulido, G (1996) Geomorphology and recent reef structures of Isla Fuerte and Bajo Bushnell, Colombian Caribbean continental shelf. *Boletín De Investigaciones Marinas y Costeras-INVEMAR* 25(1): 87-105

Díaz JM, Barrios, LM, Cendales, MH, Garzón-Ferreira J, Geister J, López-Victoria M, Ospina G, Parra-Velandia F, Pinzón J, Vargas-Angel, B, Zapata F, Zea S (2000) *Áreas coralinas de Colombia*. Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras “José Benito Vives De Andrés” INVEMAR, Santa Marta, Colombia.

Dimar (2014) Boletín meteomarinero mensual del Caribe Colombiano. Centro de investigaciones oceanográficas e hidrográficas del Caribe CIOH. Cartagena, Colombia

Downs C, McDougall KE, Woodley CM, Fauth JE, Richmond RH, Kushmaro A, Gibb W, Loya Y, Ostrander GK, Kramarsky-Winter E (2013) Heat-stress and light-stress induce different cellular pathologies in the symbiotic dinoflagellate during coral bleaching. *PLoS One* 8(12): 771-773.

Elahi R, Edmunds P (2007) Consequences of fission in the coral *Siderastrea siderea*: Growth rates of small colonies and clonal input to population structure. *Coral Reefs*, 26(2): 271-276

Emery A (1981) The Coral Reef. Canadian Broadcasting Corporation, Canada, pp 12.

Erfteimeijer PL, Riegl B, Hoeksema BW, Todd PA (2012) Environmental impacts of dredging and other sediment disturbances on corals: a review. *Marine Pollution Bulletin* 64(9): 1737-1765

Escobar A (2006) Caracterización del estado de salud, usos y problemática ambiental de 5 parches coralinos de Isla Fuerte, mar Caribe Colombiano. Trabajo De Grado De Pregrado. Facultad De Estudios Ambientales y Rurales. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia

Flórez P, Reyes J, Santodomingo N (2010) *Corales escleractinios de Colombia*. Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras-INVEMAR.

Frias-Lopez J, Klaus JS, Bonheyo GT, Fouke BW (2004) Bacterial community associated with black band disease in corals. *Applied and Environmental Microbiology* 70(10): 5955-5962

Gallego JI & Vélez I D (1994) Presencia en isla fuerte, bolívar de *Lutzomyia evansi* vector de leishmaniosis visceral. *Iatreia*, 7(1): 33-35

Garren M, Azam F (2012) New directions in coral reef microbial ecology. *Environmental Microbiology* 14(4): 833-844

Garzón J, Rodríguez A, Bejarano S, Navas R, & Reyes C. (2001). Caracterización de los ambientes marinos y costeros de Colombia. *Informe Del Estado De Los Ambientes Marinos y Costeros En Colombia*. INVEMAR.

Gil-Agudelo DL, Navas-Camacho R, Rodríguez-Ramírez A, Reyes-Nivia MC, Bejarano S, Garzón-Ferreira J, Smith GW (2009) Enfermedades coralinas y su investigación en los arrecifes colombianos. *Boletín De Investigaciones Marinas y Costeras-INVEMAR*, 38(2): 189-224

Gochfeld DJ, Olson JB, Slattery M (2006) Colony versus population variation in susceptibility and resistance to dark spot syndrome in the Caribbean coral *Siderastrea siderea*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 69(1):53-65

Gomez-Gil B, Thompson FL, Thompson CC, Swings J (2003) *Vibrio rotiferianus* sp. nov., isolated from cultures of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 239–243

Goreau TJ, Cervino J, Goreau M, Hayes R, Hayes M, Richardson L, Smith G, DeMeyer K, Nagelkerken, Garzon-Ferrera J, Gil D, Garrison G, Williams EH, Bunkley- Williams L, Quirolo C, Patterson K, Porter JW, Porter K (1998) Rapid spread of diseases in Caribbean coral reefs. *Revista Biológica Tropical* 46(Suppl 5): 157-171

Guest JR, Baird AH, Maynard JA, Muttaqin E, Edwards AJ, Campbell SJ, Yewdall K, Affendi YA, Chou LM (2012) Contrasting patterns of coral bleaching susceptibility in 2010 suggest an adaptive response to thermal stress. *PloS One* 7(3): 333-53

Harvell D, Jordán-Dahlgren E, Merkel S, Rosenberg E, Raymundo L, Smith G, Weil G, Willis B (2007) Coral disease, environmental drivers, and the balance between coral and microbial associates. *Oceanography* 20: 172-195

Hill J & Wilkinson C (2004) Methods for ecological monitoring of coral reefs. *Australian Institute of Marine Science*, Townsville, 117

Hodges TW, Slattery M, Olson JB (2012) Unique actinomycetes from marine caves and coral reef sediments provide novel PKS and NRPS biosynthetic gene clusters. *Marine Biotechnology (New York, N.Y.)* 14(3): 270-280 doi:10.1007/s10126-011-9410-7

Holt J, Krieg N, Sneath P, Staley J, Williams S (2000) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (novena edición ed.). Philadelphia: Lippincott Williams y Wilkins.

Instituto Nacional de pesca (2014) Temperatura superficial del mar. Septiembre 2014. Boletín mensual hidroclimático de los mares de México. Disponible en <http://www.inapesca.gob.mx/portal/documentos/publicaciones/BOLETINES/hidroclimatico/TEMPERATURA/boletin-hidrometeorologico-sept-2014-temperatura-1.pdf>

Joyce P & Zorro P (2011) Caracterización de las Comunidades Bacterianas de los Octocorales *Eunicea sp.*, y *Pseudopterogorgia*. Tesis de maestría en ciencias bioquímicas. Facultad de Ciencias, Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Kadiri S, Yarla N, Vidavalur S (2014) Screening and isolation of antagonistic actinobacteria associated with marine sponges from Indian coast. *Journal of Microbial & Biochemical Technology* 8: 003

Kellogg CA, Piceno YM, Tom LM, DeSantis TZ, Gray MA, Andersen GL (2014) Comparing bacterial community composition of healthy and dark spot-affected *Siderastrea siderea* in Florida and the Caribbean. *Plos one* 9 (10): 1-9

Keast A & Riley T (1997) Identification of *Vibrio* spp. with the 'string' test. *Letters in Applied Microbiology* 25(2): 106-108

Kemp DW, Hernandez-Pech X, Iglesias-Prieto R, Fitt WK, Schmidt GW (2014) Community dynamics and physiology of *Symbiodinium* spp. before, during, and after a coral bleaching event. *Limnology and Oceanography* 59(3): 788-797

Kimes NE, Johnson WR, Torralba M, Nelson KE, Weil E, Morris PJ (2013) The *Montastraea faveolata* microbiome: Ecological and temporal influences on a caribbean reef-building coral in decline. *Environmental Microbiology* 15(7): 2082-2094

Krediet CJ, Ritchie KB, Paul VJ, Teplitsk M (2013) Coral-associated micro-organisms and their roles in promoting coral health and thwarting diseases. *Proceedings Biological Sciences / the Royal Society* 280 (1755): 2012-2328

Kuffner I, Hickey T, Morrison J (2013) Calcification rates of the massive coral *Siderastrea siderea* and crustose coralline algae along the florida keys (USA) outer-reef tract. *Coral Reefs* 32(4): 987-997

Lampert Y, Kelman D, Nitzan Y, Dubinsky Z, Behar A, Hill RT (2008) Phylogenetic diversity of bacteria associated with the mucus of red sea corals. *FEMS Microbiology Ecology* 64(2): 187-198 doi:10.1111/j.1574-6941.2008.00458.x [doi]

León J, Liza L, Soto I, Torres M, Orosco A (2010) Bacterias marinas productoras de compuestos antibacterianos aisladas a partir de invertebrados intermareales. *Revista Peruana De Medicina Experimental y Salud Publica* 27(2): 215-221

León J, Aponte JJ, Rojas R, Cuadra D, Ayala N, Tomás G, Guerrero M (2011) Estudio de actinomicetos marinos aislados de la costa central del Perú y su actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes y *Enterococcus faecalis* vancomicina resistentes. *Revista Peruana De Medicina Experimental y Salud Publica* 28(2): 237-246

Lesser MP, Bythell JC, Gates RD, Johnstone RW, Hoegh-Guldberg O (2007) Are infectious diseases really killing corals? alternative interpretations of the experimental and ecological data. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 346(1): 36-44

Lewis JB (1997) Abundance, distribution and partial mortality of the massive coral *Siderastrea siderea* on degrading coral reefs at barbados, west indies. *Marine Pollution Bulletin*, 34(8): 622-627

Leyton Y & Riquelme C (2008) Vibrios en los sistemas marinos costeros. *Revista De Biología Marina y Oceanografía* 43(3): 441-456

López AF (2012) Comparación de la estructura íctica del arrecife artificial Blue Diamond y el arrecife natural aledaño, en la isla de San Andrés, Caribe colombiano. Trabajo de grado de Pregrado, Dpto. de Biología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia

Lotz MJ, Tamplin ML, Rodrick GE (1983) Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar and its selectivity for clinical and marine *Vibrio* organisms. *Annals of Clinical and Laboratory Science* 13(1): 45-48

MacFaddin JF (2003) *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica* Ed. Médica Panamericana.

Mancilla C (2003) Aislamiento, caracterización y actividad antimicrobiana de la microbiota bacteriana de agua y sedimentos de la costa de Valdivia. Tesis de grado de licenciatura en ciencias básicas, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

Miller AW & Richardson LL (2012) Fine structure analysis of black band disease (BBD) infected coral and coral exposed to the BBD toxins microcystin and sulfide. *Journal of Invertebrate Pathology* 109(1): 27-33

Moberg F & Folke C (1999) Ecological goods and services of coral reef ecosystems. *Ecological Economics* 29(2): 215-233

Mouchka ME, Hewson I, Harvell CD (2010) Coral-associated bacterial assemblages: Current knowledge and the potential for climate-driven impacts. *Integrative and Comparative Biology* 50(4): 662-674 doi:10.1093/icb/icq061 [doi]

Muller EM & Woesik R (2012) Caribbean coral diseases: Primary transmission or secondary infection? *Global Change Biology* 18(12): 3529-3535

Munn CB, Marchant HK, Moody AJ (2008) Defences against oxidative stress in vibrios associated with corals. *FEMS Microbiology Letters* 281(1): 58-63

Mydlarz LD, McGinty ES, Harvell CD (2010) What are the physiological and immunological responses of coral to climate warming and disease? *The Journal of Experimental Biology* 213(6): 934-945 doi:10.1242/jeb.037580 [doi]

Navas-Camacho R, Gil-Agudelo DL, Rodríguez-Ramírez A, Reyes-Nivia MC, Garzón-Ferreira J (2010) Coral diseases and bleaching on Colombian Caribbean coral reefs. *Revista de biología tropical* 58(1): 95-106

Nissimov J, Rosenberg E, Munn CB (2009) Antimicrobial properties of resident coral mucus bacteria of *Oculina patagonica*. *FEMS Microbiology Letters* 292(2): 210-215

Nithyanand P, Manju S, Karutha Pandian S (2011) Phylogenetic characterization of culturable actinomycetes associated with the mucus of the coral *Acropora digitifera* from gulf of Mannar. *FEMS Microbiology Letters* 314(2): 112-118

Nithyanand P, Thenmozhi R, Rathna J, Pandian SK (2010) Inhibition of *Streptococcus pyogenes* biofilm formation by coral-associated actinomycetes. *Current Microbiology*, 60(6): 454-60 doi:http://dx.doi.org/10.1007/s00284-009-9564-y

Ortega S (2010) Estudio de aprovechamiento de la energía del oleaje en Isla Fuerte (Caribe Colombiano). Trabajo de Grado de Maestría. Facultad de Minas. Universidad Nacional de Colombia. Medellín

Ortiz Martínez T & Ocampo Murillo V (2013) Métodos de conservación para actinobacterias con actividad solubilizadora de fósforo. Trabajo de grado de Pregrado, Dpto. de Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia

Patterson KL, Porter J W, Ritchie KB, Polson SW, Mueller E, Peters EC, Santavy DL, Smith GW (2002) The etiology of white pox, a lethal disease of the Caribbean elkhorn coral, *Acropora palmata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(13): 8725-8730

Pollock FJ, Lamb JB, Field SN, Heron SF, Schaffelke B, Shedrawi G, Willis BL (2014) Sediment and turbidity associated with offshore dredging increase coral disease prevalence on nearby reefs. *Plos one* 9 (7): 1-9

Porter JW, Torres C, Sutherland KP, Meyers MK, Callahan MK, Ruzicka R, Colella M (2011) Prevalence, severity, lethality, and recovery of dark spots syndrome among three Floridian reef-building corals. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 408(1-2): 79-87 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2011.07.027>

Rädecker N, Pogoreutz C, Voolstra C R, Wiedenmann J, Wild C (2015) Nitrogen cycling in corals: The key to understanding holobiont functioning? *Trends in Microbiology* 23(8):490-497

Ramírez González A, De Ramírez IB, Correal F, Jesús E. (1985) Ecología descriptiva de las llanuras medrepurias del PNN, Corales del Rosario y de San Bernardo, FEN Colombia.

Ravindran J & Raghukumar C (2002) Pink line syndrome (PLS) in the scleractinian coral *Porites lutea*. *Coral Reefs*, 21(3): 252-252

Ravindran J & Raghukumar C (2006) Pink-line syndrome, a physiological crisis in the scleractinian coral *Porites lutea*. *Marine Biology* 149(2): 347-356

Raymundo LJ, Couch CS, Harvell CD, Raymundo J, Bruckner AW, Work TM, Weil E, Woodley CM, Jordan-dahlgren E, Willis BL (2008) Coral disease handbook guidelines for assessment, monitoring & management.

Rey-Arévalo M (2013) Etiología Bacteriana de las enfermedades coralinas presentes en *Acropora* sp. ubicado en Isla Fuerte – Bolívar (Colombia). Trabajo de grado de Maestría, Facultad de estudios Ambientales y Rurales, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia

Rey-Arévalo M, Diez-Ortega H, Ramírez A (In press) (2015-1). Métodos de toma de muestra y cultivo para aislamiento de bacterias patógenas del coral *Acropora palmata* asociadas con las enfermedades en Colombia. *Invemar*. Artículo en revisión.

Rey-Arévalo M, Diez-Ortega H, Ramírez A (In press) (2015-2). Identificación de las bacterias asociadas con las enfermedades coralinas presentes en la especie de coral *Acropora palmata* en Isla Fuerte (Caribe, Colombia). *Applied and Environmental Microbiology*. Artículo en revisión.

Richardson L & Aronson R (2002) Infectious diseases of reef corals. *Proceedings of the Ninth International Coral Reef Symposium, Bali, 23-27 October 2000* (2): 1225-1230

Riegl B, Bruckner A, Coles SL, Renaud P, Dodge RE (2009) Coral reefs. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1162(1): 136-186

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

Ritchie K & Smith G (1998) Type II white-band disease. *Rev Biol Trop*, 46(suppl 5): 199-203

Roder C, Arif C, Bayer T, Aranda M, Daniels C, Shibl A, Chavanich S, Voolstra CR (2014) Bacterial profiling of white plague disease in a comparative coral species framework. *ISME Journal: Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology* 8(1): 31-39 doi:10.1038/ismej.2013.127

Rogers CS & Garrison G (2001) *Manual para el monitoreo de arrecifes de coral en el caribe y atlántico occidental* . Servicio de Parques Nacionales

Rohwer F, Breitbart M, Jara J, Azam F, Knowlton N (2001) Diversity of bacteria associated with the Caribbean coral *Montastraea franksi*. *Coral Reefs* 20(1): 85-91

Rosenberg E & Barash Y (2005) Microbial diseases of corals. *Oceans and health: Pathogens in the marine environment* (pp. 415-430) Springer.

Rosenberg E, Kellogg C A, Rohwer F (2007) Coral microbiology. *Oceanography*, 20(2): 146-154

Różalski A, Torzewska A, Moryl M, Kwil I, Maszewska A, Ostrowska K, Stażek P (2012) *Proteus* sp.–an opportunistic bacterial pathogen–classification, swarming growth, clinical significance and virulence factors. *Folia Biologica et Oecologica* 8(1): 1-17

Sánchez D, Obando P, Betancourt J, Ibarra K, Ríos M, Cuadrado Í, Obando P, Garces D, Villaraga M, Sierra O, Vivas Aguas LJ (2014) Diagnóstico y evaluación de la calidad de las aguas marinas y costeras del Caribe y Pacífico colombianos. Red de vigilancia para la conservación y protección de las aguas marinas y costeras de Colombia (REDCAM). INVEMAR, informe técnico 2014.

Schoepf V (2013) *Physiology and Biogeochemistry of Corals Subjected to Repeat Bleaching and Combined Ocean Acidification and Warming*. Trabajo de grado de Maestría. The Ohio State University. USA.

Sekar R, Mills DK, Remily E R, Voss JD, Richardson L L (2006) Microbial communities in the surface mucopolysaccharide layer and the black band microbial mat of black band-diseased *Siderastrea siderea*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9): 5963-5973

Sekar R, Kaczmarzky LT, Richardson LL (2008) Microbial community composition of black band disease on the coral host *Siderastrea siderea* from three regions of the wider Caribbean. *Marine Ecology Progress Series* 362: 85-98

Séré MG, Tortosa P, Chabanet P, Quod J, Sweet MJ, Schleyer MH (2015) Identification of a bacterial pathogen associated with porites white patch syndrome in the western Indian ocean. *Molecular Ecology* 24 (17): 4570–4581

Sheridan C, Grosjean P, Leblud J, Palmer CV, Kushmaro A, Eeckhaut, I (2014) Sedimentation rapidly induces an immune response and depletes energy stores in a hard coral. *Coral Reefs* 33(4): 1067-1076

Sheridan C, Kramarsky-Winter E, Sweet M, Kushmaro A, Leal MC (2013) Diseases in coral aquaculture: Causes, implications and preventions. *Aquacultura* 396–399(0): 124-135 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.02.037>

- Shnit-Orland M & Kushmaro A (2009) Coral mucus-associated bacteria: A possible first line of defense. *FEMS Microbiology Ecology* 67(3): 371-380
- Sun W, Peng C, Zhao Y, Li Z, Liles MR (2012) Functional gene-guided discovery of type II polyketides from culturable actinomycetes associated with soft coral *Scleronephthya* sp. *Plos One* 7(8), 1-11. doi:10.1371/journal.pone.0042847
- Sutherland KP, Porter JW, Torres C (2004) Disease and immunity in Caribbean and Indo-pacific zooxanthellate corals. *Marine Ecology Progress Series*, 266: 265-272
- Sutherland KP, ShabanS, Joyner JL, Porter JW, Lipp EK (2011) Human pathogen shown to cause disease in the threatened eklhorn coral *Acropora palmata*. *PLoS One*, 6(8): 234-68
- Tait K, Hutchison Z, Thompson FL, Munn CB (2010) Quorum sensing signal production and inhibition by coral-associated vibrios. *Environmental Microbiology Reports* 2(1): 145-150
- Vega RL, Burkepile DE, Fuchs C, Shantz AA, McMinds R, Zaneveld JR (2014) Chronic nutrient enrichment increases prevalence and severity of coral disease and bleaching. *Global Change Biology* 20(2): 544-554
- Velmurugan S, John ST, Nagaraj DS, Ashine TA, Kumaran S, Pugazhvendan S (2015) Isolation of actinomycetes from shrimp culture pond and antagonistic to pathogenic *Vibrio* spp. and WSSV. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* 4(7): 82-92
- Veron J, Hoegh-Guldberg O, Lenton T, Lough J, Obura D, Pearce-Kelly P, Sheppard CRC, Spalding M, Stafford-Smith MG, Rogers A (2009) The coral reef crisis: The critical importance of < 350ppm CO₂. *Marine Pollution Bulletin* 58(10): 1428-1436
- Vicente J, Stewart A, Song B, Hill RT, Wriugh, JL (2013) Biodiversity of actinomycetes associated with caribbean sponges and their potential for natural product discovery. *Marine Biotechnology* 15 (4): 413-424
- Von Prahl H, & Erhardt H (1985) *Colombia: Corales y arrecifes coralinos* Fondo para la Protección del Medio Ambiente" José Celestino Mutis"--Fen Colombia.

You J, Cao L, Liu G, Zhou S, Tan H, Lin Y (2005) Isolation and characterization of actinomycetes antagonistic to pathogenic *Vibrio* spp. from nearshore marine sediments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21(5): 679-682

Weil E, Smith G, Gil-Agudelo DL (2006) Status and progress in coral reef disease research. *Diseases of Aquatic Organisms*, 69(1): 1-7

Wu Y, Chen Y, Wen J, Ma Y, Ma X (2014) Epidemiology of foodborne disease outbreaks caused by *Vibrio parahaemolyticus*, China, 2003-2008. *Food Control* 46:197-202

Zhang X, He F, Wang G, Bao J, Xu X, Qi S (2013) Diversity and antibacterial activity of culturable actinobacteria isolated from five species of the south China sea gorgonian corals. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29(6): 1107-1116

Zhenyu X, Shaowen K, Chaoqun H, Zhixiong Z, Shifeng W, Yongcan Z (2013) First characterization of bacterial pathogen, *Vibrio alginolyticus*, for *Porites andrewsi* white syndrome in the south China Sea. *PloS one* 8(9): 1-8

11. ANEXOS (VER MEDIO MAGNÉTICO)

11.1. ANEXO 1

11.2. ANEXO 2

11.3. ANEXO 3

11.4. ANEXO 4