

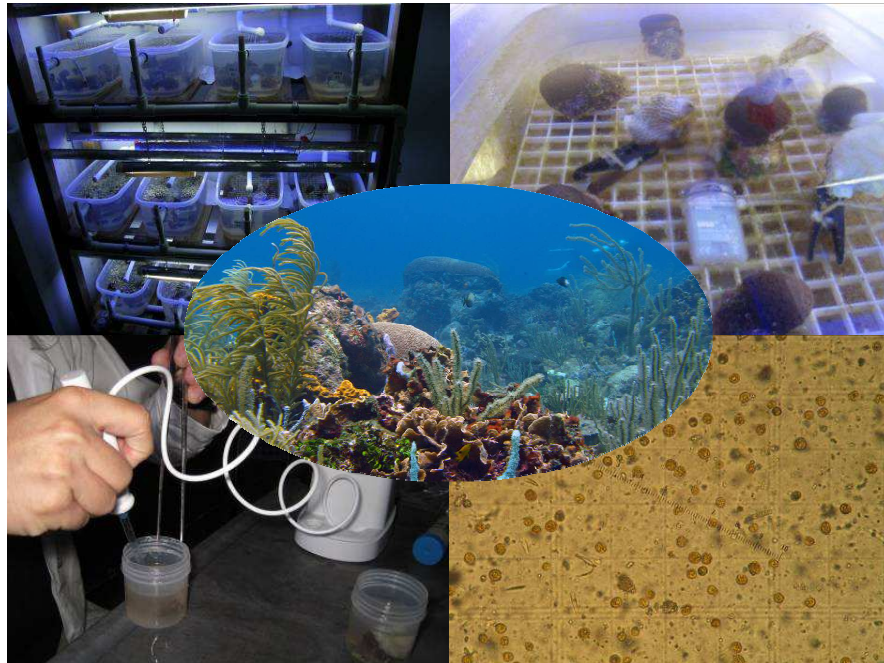
INVEMAR

COLOMBIA
50% MAR

PROYECTO PILOTO NACIONAL DE ADAPTACIÓN AL CAMBIO CLIMÁTICO – INAP -

Investigación experimental

*Tolerancia de corales al incremento de la temperatura y la
intensidad lumínica en el Área Marina Protegida Corales del
Rosario, San Bernardo e Isla Fuerte, Caribe continental
colombiano*



INFORME TÉCNICO FINAL

**Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras
“José Benito Vives de Andrés” – INVEMAR**
Vinculado al Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial

Investigación experimental en termotolerancia de corales: INFORME TÉCNICO FINAL

CUERPO DIRECTIVO

Francisco A. Arias Isaza
Director General

Jesús Antonio Garay Tinoco
Subdirector Coordinación de Investigaciones (SCI)

Carlos Augusto Pinilla González
Subdirector de Recursos y Apoyo a la Investigación (SRA)

David Alejandro Alonso Carvajal
Coordinador Programa Biodiversidad y Ecosistemas Marinos (BEM)

Mario Rueda Hernández
Coordinador Programa Valoración y Aprovechamiento de Recursos Marinos (VAR)

Luisa Fernanda Espinosa
Coordinadora Programa Calidad Ambiental Marina (CAM)

Paula Cristina Sierra Correa
Coordinadora Programa de investigación para la Gestión en Zonas Costeras (GEZ)

Georgina Guzmán Ospitia
Coordinadora Programa de Geociencias Marinas (GEO)

Oscar David Solano Plazas
Coordinador Servicios Científicos (GSC)

Elaborado por:

Tomás López Londoño
*Biólogo Marino
Investigador SIMAC / INAP*

Supervisión:

David Alejandro Alonso Carvajal
Coordinador Programa Biodiversidad y Ecosistemas Marinos (BEM)

Apoyo Técnico:

Diana Isabel Gómez López
Jefe de Línea Organización y Dinámica de Ecosistemas (ODI)

Kelly Gómez Campo
*Bióloga Marina
Investigador SIMAC / INAP*

Johanna Vega-Sequeda
*Bióloga Marina
Investigador SIMAC*

Santa Marta, mayo de 2011

INVEMAR - Cerro Punta de Betín, Santa Marta – Colombia
Apartado Aéreo 1016,
Tel: (57) (5) 4380808 -06-07 Fax: (57) (5) 4233280
<http://www.invemar.org.co>



TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. JUSTIFICACIÓN.....	2
3. ÁREA DE ESTUDIO.....	4
4. METODOLOGÍA DEL EXPERIMENTO	5
4.1. MONTAJE DE ACUARIOS	6
4.2. RECOLECCIÓN DE FRAGMENTOS Y PROCESO DE ACLIMATACIÓN	7
4.3. TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES.....	9
4.4. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE TEJIDO EN LABORATORIO	10
4.5. DENSIDAD DE ZOOXANTELAS.....	11
4.6. CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA <i>a</i>	13
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
5.1. RECOLECCIÓN DE FRAGMENTOS Y PROCESO DE ACLIMATACIÓN ..	14
5.2. TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES.....	15
5.3. DENSIDAD INICIAL DE ZOOXANTELAS	20
5.4. CONCENTRACIÓN INICIAL DE CLOROFILA <i>a</i>	21
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	22
7. BIBLIOGRAFÍA.....	23

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos experimentales aplicados en la investigación, con sus respectivos niveles de temperatura e intensidad lumínica aproximados.....	10
Tabla 2. Promedios (\pm d.e.) de la temperatura e intensidad lumínica alcanzados en los diferentes tratamientos durante el mantenimiento de las condiciones experimentales.....	16
Tabla 3. Cronología del comportamiento de las colonias durante el experimento, indicando la cantidad de colonias afectadas y los tipos de alteración fisiológica registrados cada semana y al final del experimento.....	19
Tabla 4. Promedio general y por muestras de la densidad de zooxantelas al inicio del experimento, con los respectivos datos necesarios para su estimación.....	20
Tabla 5. Promedio general y estimación en cada muestra de la concentración de clorofila <i>a</i> al inicio del experimento, con los respectivos datos necesarios para su estimación.....	21

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Especies de coral empleadas en la presente investigación.....	4
Figura 2. Ubicación y delimitación del AMP-CRSBeIF.....	5
Figura 3. Esquema del montaje en el que se desarrolló el experimento, el cual consta de cuatro tratamientos y tres réplicas por tratamiento.....	7
Figura 4. Proceso de recolección de fragmentos en campo y acomodación en los acuarios ubicados en las instalaciones del INVEMAR.....	8
Figura 5. Waterpik empleado para la extracción de tejido coralino; proceso de extracción; almacenamiento de muestras en nevera.....	11
Figura 6. Área de recuento de la cámara Neubauer con los 5 recuadros elegidos para el conteo de zooxantelas; recuadro de conteo de zooxantelas, identificando zooxantelas y otros componentes de tejido.....	13
Figura 7. Contraste de las reacciones fisiológicas observadas durante el proceso de aclimatación.....	15
Figura 8. Comportamiento de la temperatura y la intensidad lumínica en los cuatro tratamientos a lo largo del experimento.....	17
Figura 9. Colonia normal y colonias con señales fisiológicas que se interpretaron como señal de preparación para el evento reproductivo.....	17

1. INTRODUCCIÓN

El cambio climático global representa para los arrecifes coralinos una grave amenaza debido a la vulnerabilidad de los corales ante la variación de las condiciones físico-químicas del mar. El aumento de la temperatura superficial, la acidificación de los océanos debido a los elevados niveles de CO₂ y el ascenso del nivel del mar, son sólo algunas condiciones asociadas al cambio climático que limitarán el desarrollo de los arrecifes de coral (Buddemeier *et al.*, 2004; Carpenter *et al.*, 2008; Wilkinson, 2008).

En la actualidad ya se observan respuestas del ecosistema arrecifal a las condiciones ambientales ligadas al cambio climático, con eventos severos de blanqueamiento coralino ante el incremento de la temperatura superficial del mar y formación de esqueletos calcáreos débiles debido a la acidificación de los océanos (Wilkinson, 2008). El blanqueamiento coralino, conocido de esta forma por la coloración blanca que adoptan los corales luego de expulsar las zooxantelas (algas simbiotes que habitan en el tejido coralino), es en la actualidad uno de los disturbios biológicos más influyentes en la crisis actual de los arrecifes coralinos (Buddemeier *et al.*, 2004). Pronósticos de la temperatura superficial del mar asociadas al cambio climático global, anticipan la mayor ocurrencia y severidad de eventos de blanqueamiento que podrían conducir a la desaparición de los arrecifes coralinos en los próximos 30 - 50 años (Hoegh-Guldberg, 1999; Baird *et al.*, 2009).

En el Área Marina Protegida Corales del Rosario, San Bernardo e Isla Fuerte (AMP-CRSBeIF), así como en el resto del Caribe y el mundo, el blanqueamiento coralino ha sido cada vez más intenso y recurrente en las últimas décadas, convirtiéndose en una de las principales causas de deterioro arrecifal (Solano *et al.*, 1993; Díaz *et al.*, 2000; Gil-Agudelo *et al.*, 2006). El último de estos eventos ocurrió en el año 2010 y se relacionó con el incremento de la temperatura superficial del mar por encima de los 30 °C y con las elevadas descargas de aguas continentales por las fuertes lluvias frente al fenómeno La Niña. Su severidad no fue la misma en todas las áreas coralinas del Caribe colombiano, y en el AMP-CRSBeIF, por ejemplo, los arrecifes no fueron muy afectados; sin embargo, en otras áreas como el Tayrona el blanqueamiento afectó más del 70% de las formaciones coralinas y condujo a una drástica mortalidad de corales en el área (Vega-Sequeda *et al.*, en prensa).

Ante los cambios ambientales observados en la actualidad y la amenaza inminente del cambio climático, es urgente el desarrollo de investigaciones orientadas a conocer los procesos ecológicos derivados de la variabilidad climática y los diferentes tipos de respuesta en los arrecifes coralinos. Los experimentos controlados en laboratorio, como complemento a la información generada a partir de observaciones y monitoreo *in situ*, han permitido describir los diferentes mecanismos de respuesta que tienen los corales y otros organismos clave en los arrecifes (algas calcáreas, foraminíferos, equinodermos, esponjas, etc.) frente a diferentes niveles de exposición a variables ambientales ligadas al cambio climático (temperatura, CO₂, irradiación solar, etc.) (D'Croz *et al.*, 2001; Brown *et*

al., 2002; Lesser, 2004; Orr *et al.*, 2005; Kleypas *et al.*, 2006; Polato *et al.*, 2010; por mencionar sólo algunos estudios).

La presente investigación sobre “tolerancia de corales al incremento de la temperatura y la intensidad lumínica en el AMP-CRSBeIF”, busca aportar información que ayude a comprender algunos procesos fisiológicos que ocurren en corales del AMP-CRSBeIF ante el incremento de la temperatura y la intensidad lumínica, como condiciones ambientales determinantes del estado de salud de los arrecifes que pueden estar ligadas al cambio climático. El entendimiento de estos procesos ayudará a generar pronósticos sobre los posibles cambios que ocurrirían en las comunidades coralinas locales ante el cambio climático.

Este estudio hace parte de las medidas de adaptación específicas y opciones de política para prever anticipadamente los impactos del cambio climático global en Colombia, derivadas del Proyecto Piloto Nacional de Adaptación al Cambio Climático -INAP-. El proyecto ha sido financiado por el Banco Mundial con recursos GEF y comprende una serie de componentes en los que también cofinancian y participan entidades nacionales como el IDEAM, CORALINA, el Instituto Nacional de Salud, Conservación Internacional Colombia e INVEMAR.

2. JUSTIFICACIÓN

El blanqueamiento coralino es una respuesta fisiológica de los corales frente a condiciones ambientales causantes de estrés y refleja la pérdida de color cuando el coral expulsa las zooxantelas que viven en su interior o cuando sus pigmentos se han degradado, siendo una condición que de ser prolongada puede conducir a su muerte. Los eventos de blanqueamiento coralino, asociados principalmente al incremento de la temperatura superficial del mar como resultado del cambio climático global, son en la actualidad uno de los disturbios biológicos más influyentes en la crisis actual de los arrecifes coralinos.

La gran mayoría de corales viven en una relación simbiótica con zooxantelas, un tipo de alga unicelular que pertenece al grupo de los dinoflagelados. Estas algas microscópicas se hospedan en el tejido de los pólipos coralinos, donde producen componentes altamente energéticos a partir de la fotosíntesis que son transferidos al coral. En general, los corales son altamente dependientes de la relación simbiótica, recibiendo la mayor parte de su requerimiento energético por esta vía.

De todos los factores de perturbación asociados con eventos de blanqueamiento, el incremento de la temperatura relacionado usualmente con fenómenos El Niño y con el calentamiento global, es la condición más relacionada con la ocurrencia de eventos masivos de blanqueamiento coralino a nivel mundial (Iglesias-Prieto *et al.*, 1992; Reaka-Kudla *et al.*, 2003; Gil-Agudelo *et al.*, 2006; Wilkinson, 2008). Cuando el coral y las zooxantelas son expuestos a niveles de temperatura que exceden su límite de tolerancia, la estabilidad de la simbiosis se ve afectada y puede resultar en la expulsión de la zooxantelas.

Estudios más recientes han demostrado que los altos niveles de irradiación solar pueden desencadenar y/o incrementar la severidad de los eventos de blanqueamiento coralino. La elevada irradiación está relacionada principalmente con la foto-inhibición y con el efecto nocivo de la radiación UV sobre el DNA de las zooxantelas. Adicionalmente, los sistemas fotosintéticos de las zooxantelas pueden dañarse total o parcialmente dependiendo de la intensidad y tiempo de exposición (D’Croz *et al.*, 2001; Yakovleva y Hidaka, 2004).

Ante los pronósticos asociados al cambio climático global es necesario examinar la reacción de los corales a las diversas condiciones ambientales derivadas, para identificar si los corales responden de forma similar ante los nuevos tensores o si por el contrario algunos de ellos se ven más favorecidos o perjudicados. Esto ayudará a comprender los efectos del cambio climático en la estructura y dinámica de poblaciones y comunidades coralinas, y a su vez, facilitar la implementación oportuna de acciones de manejo del ecosistema frente a nuevos tensores.

La investigación experimental sobre “tolerancia de corales al incremento de la temperatura y la intensidad lumínica en el AMP-CRSBeIF” pretende aportar información para mejorar el entendimiento de la reacción de corales a dos variables relacionadas con el cambio climático y con la salud de los arrecifes, en una de las áreas con mayor biodiversidad marina del territorio nacional. Con este fin, se eligieron para la experimentación dos especies representativas que tuvieran diferentes formas de crecimiento y tipos de hábitat, teniendo en cuenta que fueran especies en las que se haya observado-documentado mayor susceptibilidad ante variaciones anormales de temperatura y/o mortalidad en las últimas décadas.

1. Coral hojas de lechuga *Agaricia tenuifolia* (Figura 1).
Colonias compuestas por hojas verticales delgadas, bifaciales. Abundante principalmente en ambientes someros e irregulares entre 1 y 15 m (Veron, 2000; Reyes y Santodomingo, 2002). Según la Lista Roja de la IUCN, su estado de “Casi Amenazada (*Near Threatened*)” se debe a la reducción extensiva del hábitat por una combinación de tensores y a la alta susceptibilidad ante eventos de blanqueamiento y enfermedades (Aronson *et al.*, 2008).
2. Coral estrella *Montastraea annularis* (Figura 1).
Colonias masivas que se dividen formando pequeños montículos. Es una especie común, especialmente en ambientes semi-protegidos y lagunas, encontrándose con mayor abundancia en el rango de 1-10 m (Veron, 2000; Reyes y Santodomingo, 2002). En la Lista Roja de la IUCN es considerada “En Peligro (*Endangered*)” debido al decline experimentado en los últimos 30 años que supera el 50%. Las principales amenazas para la especie son las enfermedades y el blanqueamiento; en el AMP fue una de las especies más afectadas y con mayor mortalidad tras el blanqueamiento del 2005 (Gil-Agudelo *et al.*, 2006; Aronson *et al.*, 2008).



Figura 1. Especies de coral empleadas en la presente investigación. Izquierda: coral hojas de lechuga *Agaricia tenuifolia*. Derecha: coral estrella *Montastraea annularis*.

3. ÁREA DE ESTUDIO

El Área Marina Protegida Corales del Rosario, San Bernardo e Isla Fuerte (Resolución 679-05 del MAVDT) se encuentra en la zona central del Caribe continental colombiano y es considerada un área estratégica debido a su biodiversidad ecosistémica. Está constituida por los archipiélagos Nuestra Señora del Rosario y de San Bernardo, el Parque Nacional Natural Corales del Rosario y San Bernardo (PNNCRSB), el Santuario de Flora y Fauna El Corchal “El Mono Hernández, la zona continental desde el canal del Dique (al norte) hasta Punta San Bernardo y el área marina desde el PNNCRSB hasta el complejo de isla Fuerte, bajo Bushnell y bajo Burbujas (al sur), extendiéndose hasta la isóbata de los 200m en la plataforma continental. Ocupa un área aproximada de 559.000 ha, involucrando los departamentos de Bolívar y Sucre (Díaz *et al.*, 2000; Alonso y Castillo, 2007) (Figura 2).

En el área se distinguen dos períodos climáticos: una época de lluvias o húmeda de abril a noviembre, caracterizada por vientos débiles y mayor influencia de la contracorriente Panamá-Colombia, y una época seca entre los meses de diciembre y abril, en la que se presenta una fuerte influencia de los Vientos Alisios y predominio de la corriente oceánica del Caribe. Entre las dos épocas hay un período de transición caracterizado por irregularidad de lluvias y vientos (CIOH-CARDIQUE, 1998). La temperatura media fluctúa entre 26 y 30 °C.

El AMP-CRSBeIF comprende las formaciones coralinas de mayor extensión en el Caribe continental colombiano, distribuidas principalmente en los archipiélagos Nuestra Señora del Rosario (68 km²) y San Bernardo (135 km²). Adicionalmente, contiene otras formaciones coralinas relevantes en isla Fuerte y los bajos Bushnell y Burbujas (17 km²) (Díaz *et al.*, 2000; Alonso y Castillo, 2007).

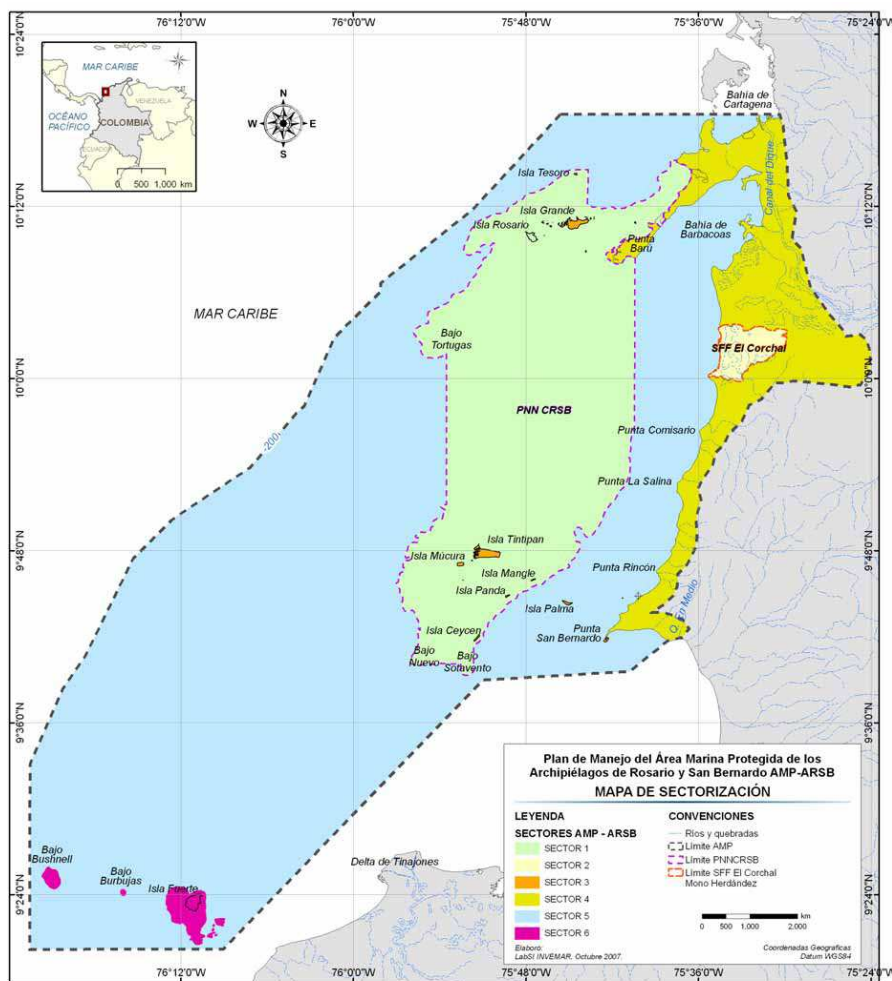


Figura 2. Ubicación y delimitación del AMP-CRSBeIF (tomado de Alonso y Castillo, 2007).

4. METODOLOGÍA DEL EXPERIMENTO

Existen innumerables caminos en los procesos de experimentación que buscan comprobar teorías existentes o apoyar/refutar nuevas hipótesis. Sin embargo, la aplicabilidad de muchos de estos caminos con sus métodos varía dependiendo de factores naturales y logísticos, siendo siempre necesario evaluar detenidamente las posibilidades y realizar ensayos preliminares para elegir un método práctico y preciso.

En esta investigación, con el fin de evaluar la sensibilidad de corales presentes en el AMP-CRSBeIF al incremento de la temperatura y la intensidad lumínica, se aplicaron algunos tratamientos experimentales a una serie de corales recolectados en el área. Como medida para identificar su reacción a las condiciones experimentales, se determinaría la densidad de zooxantelas y la concentración de clorofila *a* en el tejido coralino de diferentes muestras, tanto al inicio como al final del experimento.

Durante el desarrollo de la presente investigación, se implementó un protocolo en el que se describen la lista de materiales y procedimientos empleados en las diferentes etapas del experimento. Tomando este protocolo como referencia, se describe a continuación la serie de etapas fundamentales, acompañando cada una de ellas con algunas recomendaciones importantes.

4.1. MONTAJE DE ACUARIOS (Figura 3)

Materiales:

- Mueble de madera resistente con varias secciones
- Material de PVC de ½" y 1" (tubos, codos, tees, llaves de paso, uniones)
- Estanque de distribución en fibra de vidrio de 120-150 L
- Recipientes plásticos de 15 L
- Rejillas plásticas
- Filtros para limpiar el agua de los acuarios
- Bomba sumergible con potencia apropiada
- Termostatos sumergibles de 150 – 200 Watts
- Lámparas actínicas y fluorescentes
- Termómetros digitales
- Temporizador digital *Timer*
- Agua de mar natural o artificial (salinidad 34)
- Estanque principal y filtros biológicos (cascajo coralino y arena)

Procedimiento:

1. Se ubicaron los acuarios en las secciones determinadas de acuerdo al diseño experimental. Este consta de 12 acuarios distribuidos equitativamente en 4 filas verticales que corresponden a diferentes tratamientos y 3 niveles horizontales que corresponden a réplicas.
2. Se construyó toda la estructura de PVC por donde ingresaría y saldría el agua y se colocaron las instalaciones eléctricas donde se conectarían todos los aparatos eléctricos (bombas, termostatos, lámparas, temporizador digital).
3. Se instalaron y conectaron las luces, programando su encendido y apagado de acuerdo al ciclo diario (6 am – 6 pm encendidas; 6 pm – 6 am apagadas).
4. Se ubicó y conectó la bomba sumergible para llenar todo el montaje inicialmente con agua dulce (sin filtros biológicos), verificando que el agua circule apropiadamente y sin fugas.
5. Luego de un par de días con agua dulce circulando y lavando el montaje, se vació y llenó nuevamente con agua de mar artificial (salinidad 34).
6. Se colocaron los filtros biológicos en el estanque principal donde se filtraría el agua y se dejó curando el sistema por dos semanas.
7. Se ubicaron y conectaron los termostatos, teniendo en cuenta la temperatura requerida en los acuarios.
8. Se verificó constantemente el flujo y la temperatura en cada uno de los acuarios, realizando los ajustes que fueran necesarios para alcanzar las condiciones requeridas en los tratamientos experimentales.

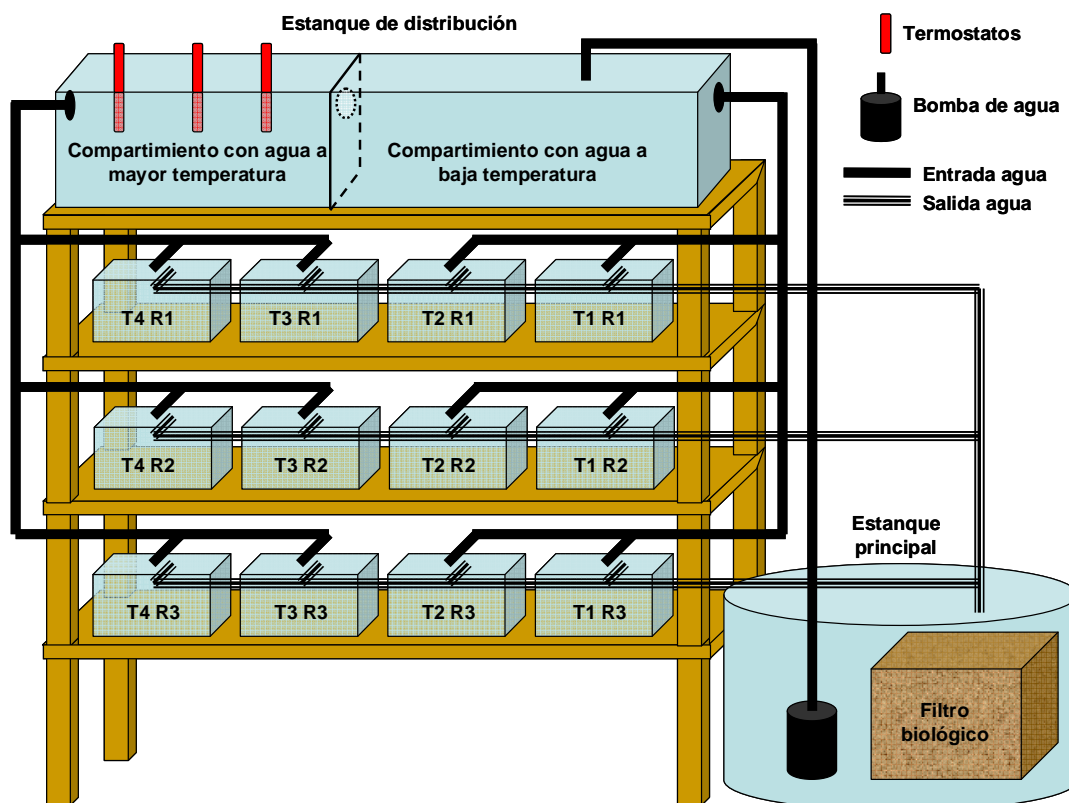


Figura 3. Esquema del montaje en el que se desarrolló el experimento, el cual consta de cuatro tratamientos (T1, T2, T3 y T4) y tres réplicas por tratamiento (R1, R2 y R3).

¡Importante!

- ✓ La adquisición de productos, las instalaciones eléctricas y la ubicación de los diferentes componentes fueron realizadas bajo la asesoría de un experto.
- ✓ Se evitó en lo posible utilizar partes metálicas que se pudieran oxidar en el montaje

4.2. RECOLECCIÓN DE FRAGMENTOS Y PROCESO DE ACLIMATACIÓN (Figura 4)

Materiales:

- Martillo
- Cincel
- Bolsas Ziploc
- Neveras
- Oxímetro
- pHmetro
- Conductímetro
- Ganchos plásticos y masilla epóxica
- Rejillas plásticas

Procedimiento:

1. Se visitaron dos sitios en el AMP-CRSBeIF con las especies de coral requeridas (inmediaciones de isla Tesoro e isla Pavitos) y con la ayuda de un martillo y un cincel se extrajeron fragmentos de entre 5 y 10 cm de diámetro de diferentes colonias, a una profundidad de 6-8 metros.
2. Se colocaron los fragmentos en bolsas Ziploc con abundante agua y se almacenaron en neveras en total oscuridad mientras se transportaban a las instalaciones del INVEMAR (Santa Marta).
3. Una vez en laboratorio, se distribuyeron los fragmentos sin sacarlos de las bolsas Ziploc en los acuarios previamente acondicionados.
4. Tras verificar que la temperatura al interior de la bolsa se niveló con la de los acuarios (luego de aproximadamente 1 hora), se comenzó a mezclar gradualmente el agua al interior de la bolsa con el agua de los acuarios.
5. Se extrajeron los fragmentos de las bolsas siempre sumergidos en el agua y se fijaron con masilla epóxica y ganchos plásticos a la rejilla ubicada en el fondo de los acuarios.
6. Se sometieron los fragmentos a un proceso de aclimatación a las condiciones de laboratorio durante 12 días antes de comenzar con los tratamientos experimentales, procurando que las condiciones fueran lo más similar posible en todos los acuarios.
7. Diariamente en la mañana y en la tarde se verificó el flujo y de agua en todos los acuarios y se tomaron mediciones de parámetros físico-químicos (temperatura, salinidad, oxígeno, pH), con el fin de monitorear la calidad del agua y realizar ajustes necesarios.

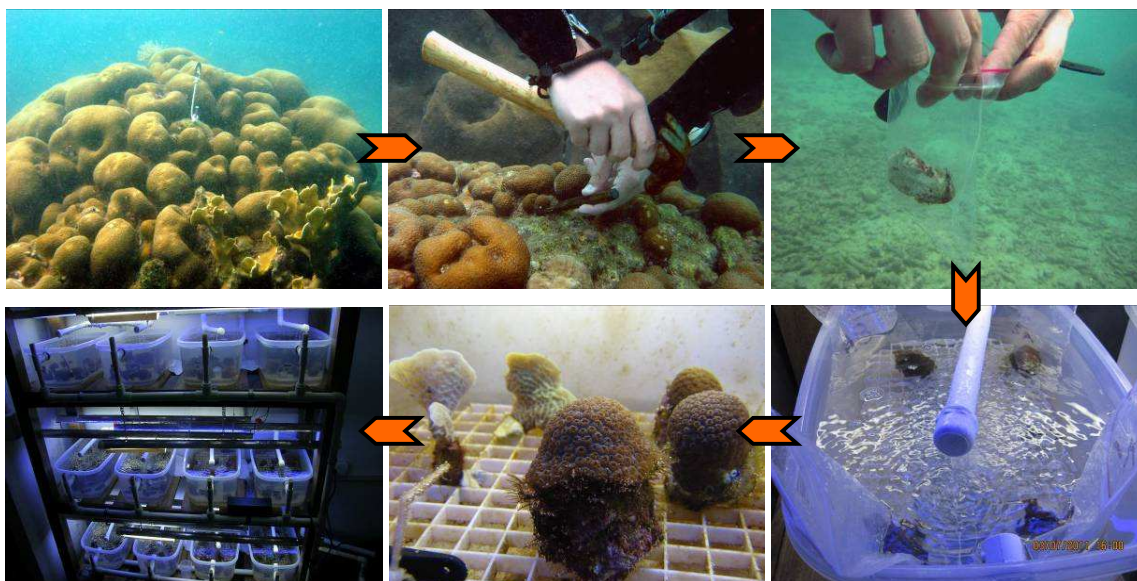


Figura 4. Proceso de recolección de fragmentos en campo y acomodación en los acuarios ubicados en las instalaciones del INVEMAR.

¡ Importante !

- ✓ Elegir en campo colonias que se encuentren en buen estado de salud y partes de ella que sean fácilmente extraíbles.

- ✓ Procurar que el tiempo de transporte al laboratorio sea mínimo, en oscuridad y manteniendo la temperatura constante para minimizar el estrés de los corales.
- ✓ Evitar al máximo tocar la parte viva del coral y la exposición al aire durante la fase de recolección y manipulación de colonias.

4.3. TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES (Tabla 1)

Materiales:

- Termostatos sumergibles de 150 – 200 Watts
- Oxímetro
- pHmetro
- Conductímetro
- Dispositivos para el registro de la temperatura y la luminosidad (HOBOS)

Procedimiento:

1. Posterior a la aclimatación, se seleccionaron las colonias saludables (buena coloración y apariencia normal) y se distribuyeron equitativamente en los acuarios del montaje. No se tuvieron en cuenta colonias que mostraron señales de deterioro.
2. Se colocaron HOBOS para el registro continuo de la temperatura y la luminosidad en cuatro acuarios elegidos de forma sistemática de modo que se incluyera uno por tratamiento. Estos dispositivos permanecieron sumergidos en los acuarios durante todo el experimento.
3. Se comenzaron a aplicar los tratamientos de forma gradual, prendiendo cada vez más termostatos hasta alcanzar la temperatura requerida en cada uno de ellos, teniendo en cuenta que el mayor nivel de temperatura fuera similar al valor registrado en eventos de blanqueamiento en el área (30-32 °C: Gil-Agudelo *et al.*, 2006).
4. Diariamente en la mañana y en la tarde se verificó el flujo de agua en todos los acuarios y se tomaron mediciones de parámetros físico-químicos (temperatura, salinidad, oxígeno, pH), con el fin de monitorear la calidad del agua y realizar ajustes necesarios.
5. Los tratamientos experimentales serían en principio mantenidos por un período de dos meses, teniendo en cuenta los períodos de temperaturas elevadas que han desencadenado eventos de blanqueamiento en el área (Gil-Agudelo *et al.*, 2006). Sin embargo, durante el desarrollo del experimento se presentó un evento fortuito que desestabilizó las condiciones y no permitió finalizarlo satisfactoriamente. Esta condición será descrita y analizada en la sección Resultados y discusión.
6. Con la información recolectada por los HOBOS, se calculó el coeficiente de variación (CV) y se verificó el grado de variación de la temperatura y la intensidad lumínica en cada tratamiento. Tomando como referencia a Guisande-González (2006), se propuso que un CV <10% es muy bajo, <15% es aceptable y >15% es alto.

¡Importante!

- ✓ Reponer continuamente el agua que se evapora en el recorrido por el sistema, teniendo en cuenta que al aumentar la temperatura aumenta la tasa de evaporación.
- ✓ Realizar recambios periódicos del agua de mar para mantener la calidad.
- ✓ Realizar mediciones periódicas del contenido de nutrientes en el agua (principalmente nitritos, nitratos, fosfatos y amonio), los cuales son indicadores de la calidad del agua.
- ✓ Si se evidencia una variación anormal de los parámetros físico-químicos y de nutrientes en el agua, es necesario realizar recambios de agua.

Tabla 1. Tratamientos experimentales aplicados en la investigación, con sus respectivos niveles de temperatura e intensidad lumínica aproximados.

Tratamiento	Temperatura	Intensidad lumínica
Tratamiento 1	Baja (≈ 28 °C)	Baja (≈ 3.000 Lux)
Tratamiento 2	Baja (≈ 28 °C)	Alta (≈ 4.000 Lux)
Tratamiento 3	Alta (≈ 30 °C)	Alta (≈ 4.000 Lux)
Tratamiento 4	Alta (≈ 30 °C)	Baja (≈ 3.000 Lux)

4.4. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE TEJIDO EN LABORATORIO (Figura 5)

Materiales:

- Martillo
- Cincel
- Bolsas Ziploc
- Refrigerador ó nevera portátil
- Hielo seco
- Irrigador de agua Waterpik
- Pinzas de laboratorio
- Beaker de 100 ml
- Frasco lavador
- Agua de mar fría filtrada

Procedimiento:

1. Se extrajeron del sistema las colonia a las que se debía realizar análisis de densidad de zooxantelas y concentración de clorofila *a*, y se fragmentaron con la ayuda de un martillo y un cincel para obtener trozos de aproximadamente 2-4 cm² de superficie con tejido coralino.
2. Se colocó el fragmento en un beaker con un poco de agua de mar fría filtrada, procurando que quede sumergido (esto ayudó a evitar salpicaduras del agua durante el siguiente paso).
3. Se adicionó agua de mar fría filtrada al Waterpik hasta alcanzar el volumen requerido para la extracción.

4. Se sujetó el fragmento con las pinzas y se dirigieron los chorros de agua del Waterpik a la superficie del fragmento con tejido coralino para remover el tejido (método de Johannes y Wiebe, 1970).
5. Se extrajo el esqueleto del beaker y se enjuagó ligeramente con agua de mar de un frasco lavador para remover cualquier vestigio de tejido.
6. La suspensión resultante se distribuyó en tubos de precipitados y se colocaron inmediatamente en una nevera portátil con hielo hasta el momento de realizar los análisis de zooxantelas y clorofila.
7. Se calculó el área del tejido coralino extraído de cada fragmento.
8. Se calculó el área del tejido coralino de cada fragmento. Para esto, se moldeó con papel aluminio la superficie del fragmento en la que se encontraba la capa viva del coral y se cortó por los límites. Posteriormente se pesó el molde de papel aluminio y se extrapoló su área con un factor de conversión, el cual fue obtenido pesando una serie de trozos de áreas conocidas (ver método de Marsh, 1970).



Figura 5. *Izquierda:* Waterpik empleado para la extracción de tejido coralino. *Centro:* proceso de extracción. *Derecha:* almacenamiento de muestras en nevera.

¡ Importante !

- ✓ Realizar todo el proceso en la mayor oscuridad como sea posible y con agua de mar fría para evitar la degradación celular y de los pigmentos fotosintéticos.
- ✓ Procurar utilizar la menor cantidad de agua en el proceso de remoción del tejido coralino con el Waterpik.
- ✓ En caso de no poder procesar las muestras de tejido de forma inmediata, se deben refrigerar en oscuridad por el menor tiempo posible.

4.5. DENSIDAD DE ZOOXANTELAS (Figura 6)

La metodología inicialmente propuesta consistía en determinar la densidad de zooxantelas en una serie de fragmentos al inicio y al final del experimento. Estos valores serían representativos de la densidad de zooxantelas en los corales del experimento y serían utilizados como marco de referencia para evaluar la reacción de los corales a los tratamientos (menor densidad de zooxantelas al final del tratamiento indicaría mayores niveles de estrés en los corales). Sin embargo, una perturbación en el sistema (ver sección 5.2) no permitió determinar los valores finales de zooxantelas y fue necesario basar el análisis en las observaciones cualitativas registradas a lo largo del experimento.

Materiales:

- Tubos de precipitados de 50 ml
- Tubo de ensayo de aproximadamente 15 ml
- Agitador para tubos de ensayo tipo *Vortex mixer*
- Pipeta Pasteur
- Pipeta de vidrio de 10 ml
- Centrifuga
- Hematocitómetro – cámara de Neubauer
- Agua de mar fría
- Microscopio óptico

Procedimiento:

1. Tanto al inicio como al final del experimento, se determinaría la densidad de zooxantelas en una serie de fragmentos con el fin de determinar la densidad de células antes y después de los tratamientos.
2. La suspensión resultante de la extracción de tejido se centrifugó por 15 minutos a 4000 rpm para concentrar la muestra.
3. Se extrajo la mayor cantidad posible del sobrenadante y se ajustó la muestra a un volumen conocido (10 o 15 ml).
4. Se agitó vigorosamente la muestra con el *Vortex mixer* durante aproximadamente cinco minutos, quedando totalmente homogenizada.
5. Se extrajo una alícuota con la pipeta Pasteur y se vertió en las dos áreas de recuento de la cámara de Neubauer.
6. La cámara con la muestra se colocó en el microscopio y se realizaron recuentos de zooxantelas en 5 de los 25 recuadros de cada área de conteo, empleando el objetivo de 40X.
7. Se repitieron los pasos 4, 5 y 6 hasta completar un total de 8 recuentos por muestra y se calculó el promedio de conteo por muestra.
8. Para calcular la densidad de zooxantelas (número de células / área de tejido en cm²), fue necesario tener en cuenta el promedio de zooxantelas contadas (n), el volumen de recuento en mm³ (V_r), el volumen de la muestra concentrada de la que se extrajo cada alícuota en ml (V_m), el área de tejido en cm² (A_t) y el equivalente mm³ - ml (1000 mm³ = 1 ml), aplicando la siguiente expresión:

$$\text{Zooxantelas / área de tejido (cm}^2\text{)} = \frac{n * V_m * 1000}{V_r * A_t}$$

9. A partir de los valores de densidad de zooxantelas obtenidos en las muestras, se calculó la densidad media de zooxantelas en los corales del experimento.

¡ Importante!

- ✓ La muestra concentrada debe estar completamente homogenizada antes de extraer las alícuotas para los conteos celulares.
- ✓ El llenado de la cámara de Neubauer con la muestra debe ser constante, evitando así diferencias en la concentración celular en las áreas de conteo.
- ✓ Se debe tener cuidado en diferenciar las zooxantelas de otras células y otros componentes del tejido coralino al momento de realizar los conteos.

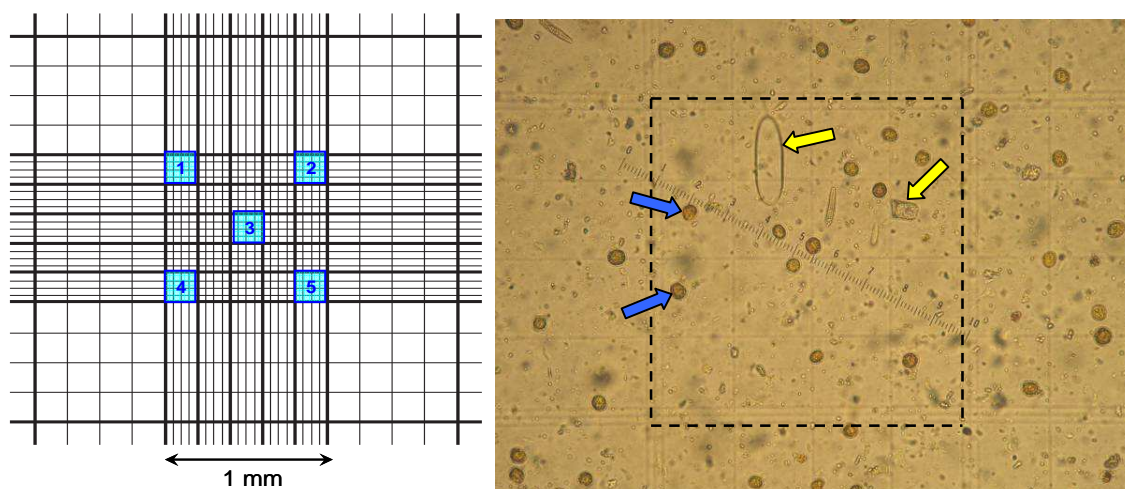


Figura 6. *Izquierda*: Área de recuento de la cámara Neubauer con los 5 recuadros elegidos para el conteo de zooxantelas. *Derecha*: Recuadro de conteo de zooxantelas (demarcado con línea discontinua), identificando zooxantelas (flechas azules) y otros componentes de tejido (flechas amarillas).

4.6. CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA α

De forma complementaria al análisis de zooxantelas, se emplearían los valores iniciales y finales de clorofila a para evaluar la reacción de los corales a los tratamientos (menor concentración de clorofila al final del experimento indicaría mayores niveles de estrés en los corales). Sin embargo, la perturbación en el sistema no permitió determinar los valores finales de clorofila a y fue necesario basar el análisis en observaciones cualitativas registradas a lo largo del experimento.

Materiales:

- Cámara de vacío
- Filtros de microfibras de vidrio Whatman
- Tubos de precipitados de 50 ml
- Pinzas de laboratorio
- Espectrofotómetro
- Acetona 90% fría
- Pipeta de vidrio de 10 ml
- Centrifuga
- Refrigerador

Procedimiento:

1. La suspensión resultante de la extracción de tejido se centrifugó por 15 minutos a 4000 rpm para concentrar la muestra.
2. Se desechó el sobrenadante y se filtró el precipitado a través de un filtro Whatman con la ayuda de una cámara de vacío.
3. Se colocó el filtro en un tubo de centrifuga de 50 ml con la ayuda de una pinza y se adicionan 10 ml de acetona fría al 90%.
4. Se maceró el filtro y se dejó en refrigeración por 24 horas.

5. Se centrifugó nuevamente la muestra a 4000 rpm durante 10 minutos para clarificar la solución.
6. Se midió la absorbancia (Abs) del sobrenadante resultante con el espectrofotómetro, en las longitudes de onda 630, 645, 665 y 750 nm.
7. La cantidad de clorofila *a* (Chl *a*) en las muestras se calculó por el método de Parsons y Strickland (1963), a partir de la siguiente expresión:

$$\text{Cantidad de Chl } a = (11.6 * \text{Abs}_{665}) - (0.14 * \text{Abs}_{630}) - (1.31 * \text{Abs}_{645})$$

8. Posteriormente, se calculó la concentración de clorofila *a* por fragmento expresada por unidad de área, siguiendo la expresión (modificada de Strickland y Parsons, 1972):

$$\text{Concentración de Chl } a = \frac{\text{Cantidad de Chl } a * V_A}{L * A_t}, \text{ donde:}$$

V_A = Volumen de acetona para la extracción en ml

A_t = Área de tejido coralino en cm^2 (calculada con el papel aluminio)

L = Longitud de la celda espectrofotométrica en cm

9. A partir de las concentraciones de clorofila *a* en las muestras, se calculó la concentración media de clorofila *a* en los corales del experimento.

¡ I m p o r t a n t e !

- ✓ La lectura a 750 nm sirve como una corrección para turbidez; su valor se sustrae de todos los demás valores de absorbancia (630, 645 y 665 nm).
- ✓ Es necesario ajustar en 0 la absorbancia con las diferentes longitudes de onda en una celda de referencia conteniendo sólo acetona 90%.
- ✓ Realizar todo el proceso en la mayor oscuridad como sea posible y en frío para evitar la degradación celular y de los pigmentos fotosintéticos.
- ✓ En caso de no poder procesar la muestra de forma inmediata, se deben refrigerar en oscuridad por el menor tiempo posible.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. RECOLECCIÓN DE FRAGMENTOS Y PROCESO DE ACLIMATACIÓN

El día 18 de agosto de 2010 se recolectaron 144 fragmentos de corales, 72 del coral hojas de lechuga *Agaricia tenuifolia* y 72 del coral estrella *Montastraea annularis*, en formaciones coralinas cercanas a isla Tesoro e isla Pavitos, en el archipiélago de Nuestra Señora del Rosario. Ese mismo día se transportaron a las instalaciones del INVEMAR para comenzar el proceso de aclimatación a las condiciones del laboratorio.

Durante el proceso de aclimatación, se procuró mantener las condiciones ambientales lo más estable posible en todos los acuarios del experimento. Durante este proceso, el promedio de la temperatura fue de $28,0 \pm 1,47$ °C y el promedio de la intensidad lumínica de $2378 \pm 323,01$ Lux.

Todos los fragmentos de *A. tenuifolia* evidenciaron señales de estrés severo durante la aclimatación y debieron ser extraídos de los acuarios. Algunas de las reacciones evidenciadas fueron: blanqueamiento total, blanqueamiento parcial y/o localizado y desprendimiento de tejido (Figura 7). La no inclusión de estas muestras en el experimento, permitió mantener la confiabilidad del análisis basado en la reacción de los corales a los tratamientos experimentales y no a otras condiciones inherentes al confinamiento.

Contrario a lo observado en *A. tenuifolia*, en la especie *M. annularis* todos los fragmentos se mantuvieron saludables durante la aclimatación, evidenciando buena coloración y actividad de los pólipos hasta antes de comenzar con los tratamientos (Figura 7).



Figura 7. Contraste de las reacciones fisiológicas observadas durante el proceso de aclimatación. Los fragmentos de *M. annularis* (flechas azules) mantuvieron su coloración y buen estado de salud, mientras que los de *A. tenuifolia* (flechas amarillas) mostraron señales de estrés severo y deterioro, como blanqueamiento total (izquierda), blanqueamiento parcial (centro) y desprendimiento de tejido (derecha).

Existen diferencias significativas en las estrategias de vida de los corales que determinan en gran medida su grado de tolerancia y sobrevivencia frente a perturbaciones. La especie *M. annularis* hace parte de un grupo de corales que generalmente alcanza grandes tallas y tienen tiempos de vida prolongados. Los individuos de estas especies son especialmente resistentes a disturbios y tienen altas tasas de sobrevivencia. Por el contrario, el grupo de corales del que hace parte *A. tenuifolia* tiene ciclos de vida cortos y son más sensibles a disturbios, por lo que presentan altas tasas de mortalidad (Bak y Engel, 1979; Harrison y Wallace, 1990; Knowlton, 2001). Las reacciones de estas dos especies de corales durante el proceso de aclimatación, demostraron los diferentes grados de sensibilidad y adaptabilidad a la variación de las condiciones ambientales, relacionados con las estrategias de vida de las especies.

5.2. TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES

Los tratamientos experimentales comenzaron a implementarse el día 31 de agosto de 2010, 13 días después de la llegada de los fragmentos al sistema. Al momento de iniciar los tratamientos se tenían únicamente los 72 fragmentos de *M. annularis*, distribuidos equitativamente en el sistema de acuarios (seis por

acuario). Todos los fragmentos del coral *A. tenuifolia* fueron extraídos durante la aclimatación.

Durante el mantenimiento de las condiciones experimentales, la temperatura de nivel bajo en los Tratamientos 1 y 2 se mantuvo cercano a 28,9 °C, mientras que la temperatura de nivel alto en los Tratamientos 3 y 4 estuvo cercana a 30,5 °C. La intensidad lumínica de nivel bajo en los Tratamientos 1 y 4 se mantuvo cercana a 2100 Lux, mientras que la intensidad lumínica de nivel alto en los tratamientos 2 y 3 alrededor de 3500 Lux (Tabla 2, Figura 8).

Tabla 2. Promedios (\pm d.e.) de la temperatura e intensidad lumínica alcanzados en los diferentes tratamientos durante el mantenimiento de las condiciones experimentales.

Tratamiento	Variable	
	Temperatura (°C)	Intensidad lumínica (Lux)
Tratamiento 1	28,93 \pm 0,55	2240,25 \pm 0,29
Tratamiento 2	28,90 \pm 1,00	3667,98 \pm 317,82
Tratamiento 3	30,55 \pm 0,67	3455,74 \pm 429,88
Tratamiento 4	30,40 \pm 0,62	2073,35 \pm 348,69

Durante la implementación de los tratamientos se registró cierta variabilidad en los niveles de temperatura e intensidad lumínica de cada tratamiento, a pesar del control riguroso de estas variables en los acuarios. No obstante, los coeficientes de variación calculados evidenciaron que dicha variabilidad fue muy baja en la mayoría de los casos ($CV < 10\%$) (Figura 8).

Alrededor del 23 de septiembre, casi un mes después de haber comenzado los tratamientos, algunos corales de *M. annularis* comenzaron a evidenciar condiciones fisiológicas anormales (dilatación de pólipos, aumento del tamaño de la boca del pólipo, etc.) (Figura 9), que parecían indicar su preparación para llevar a cabo el proceso de reproducción sexual característico de corales. En estos eventos, que generalmente ocurren de forma sincrónica entre arrecifes durante algunas noches cada año (en el año 2010 se presentó en las noches del 27 al 30 de septiembre: *obs. per.*), se liberan gametos masculinos y femeninos al medio marino donde ocurre la fertilización y el desarrollo larval (Harrison, 2011). En respuesta a esta condición, se monitoreó de cerca el comportamiento de los corales para registrar si efectivamente se llevaría a cabo la reproducción y la forma como afectaría las condiciones del montaje.

No se registró la liberación de gametos en los acuarios del experimento, a pesar de las señales fisiológicas cada vez más evidentes de los corales (Figura 9). No obstante, desde el 29 de septiembre (semana 5 con los tratamientos), la calidad del agua en el sistema comenzó a deteriorarse drásticamente (mal olor, mayor turbidez, elevada producción de espuma) y los corales comenzaron a mostrar señales de estrés severo que no tenían relación aparente con los tratamientos (Tabla 3). A raíz de esta condición, se infiere que posiblemente SI hubo liberación en el agua de algún producto sexual de talla muy reducida o en dilución, que no pudo ser detectado pero que desestabilizó radicalmente todo el sistema.

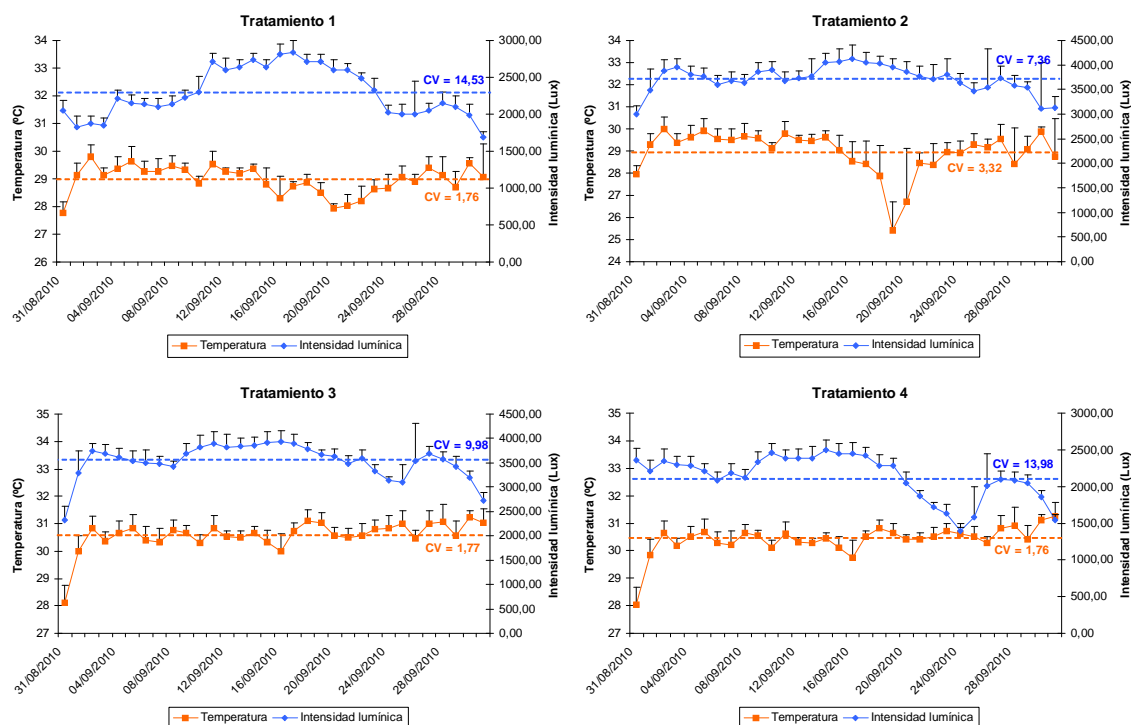


Figura 8. Comportamiento de la temperatura y la intensidad lumínica en los cuatro tratamientos a lo largo del experimento. Las líneas discontinuas corresponden al promedio de cada variable y CV corresponde al coeficiente de variación. Las medidas de variación diaria corresponden a la desviación estándar.



Figura 9. Colonia normal (izquierda) y colonias con señales fisiológicas que se interpretaron como señal de preparación para el evento reproductivo (centro y derecha).

Ante el deterioro de la calidad del agua, se realizaron una serie de recambios parciales de agua con el fin de controlar la situación; sin embargo, no se logró estabilizar nuevamente el sistema ni aplacar el efecto adverso observado en los corales. Para el día 1 de octubre, prácticamente todos los corales en el experimento estaban afectados y mostraban un serio detrimento de su estado de salud o se encontraban ya muertos (Tabla 3). Los corales que habían mostrado las primeras alteraciones fisiológicas fueron los que evidenciaron los primeros signos de estrés fisiológico severo y los que se degradaron más rápidamente. Sin embargo, el desequilibrio del sistema y el deterioro de la calidad del agua fueron de tal magnitud, que el resto de los fragmentos comenzaron a mostrar los mismos síntomas de forma casi inmediata.

La perturbación en el sistema a causa de este evento fortuito obligó a terminar el experimento de forma prematura el 1 de octubre del 2010 y no permitió calcular los valores finales de clorofila *a* y zooxantelas. A falta de este valor, se buscó repetir el experimento luego de la respectiva adecuación del montaje; sin embargo, la ocurrencia de un evento masivo de blanqueamiento coralino en el Caribe colombiano que comenzó en los últimos meses del año 2010 y se extendió hasta los primeros del 2011 (descripción del evento: Vega-Sequeda *et al.*, en prensa), impidió su ejecución.

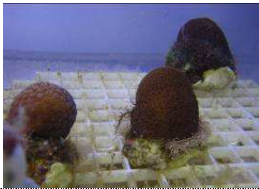



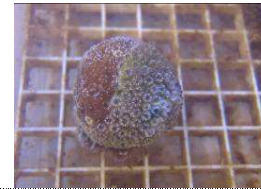
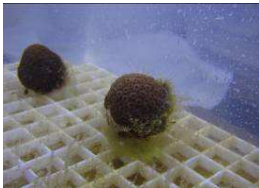














Ante la falta del valor final de clorofila y zooxantelas, se emplearon las observaciones cualitativas registradas en los corales durante el desarrollo del experimento hasta antes de presentarse la perturbación, como herramienta alternativa de análisis. No obstante, se aclara que el tiempo de exposición a los tratamientos fue bajo y que sólo una minoría de colonias alcanzó a evidenciar señales de estrés fisiológico (14 colonias \approx 20%), condición que limita la elaboración de un análisis robusto sobre la reacción de los corales a temperaturas e intensidades lumínicas elevadas.

Las principales alteraciones fisiológicas de *M. annularis* registradas fueron: palidecimiento, blanqueamiento localizado y desprendimiento de tejido. El tratamiento donde se presentó una mayor frecuencia de colonias con estas alteraciones fisiológicas fue el Tratamiento 3, con un total de ocho (8) colonias. Por el contrario, el tratamiento donde se registraron menos colonias con alteraciones fue el Tratamiento 4, con cero (0) colonias (Tabla 3).

La frecuencia de alteración de colonias en cada tratamiento (número de colonias afectadas y tipo de alteración) permitió establecer una aproximación al grado de tolerancia-sensibilidad que tiene *M. annularis* a los diferentes niveles de temperatura e intensidad lumínica. Un análisis discreto basado en estas observaciones sugirió que el Tratamiento 3, que combinaba los niveles altos de temperatura e intensidad lumínica, fue el más perjudicial para los corales. El Tratamiento 2, con el nivel alto de intensidad lumínica y bajo de temperatura, fue el segundo con mayor grado de afectación de corales. Curiosamente el Tratamiento 4, que conjugaba niveles de elevada temperatura y baja intensidad lumínica, pareció ser el más tolerable.

Las anomalías térmicas, asociadas comúnmente con eventos El Niño y con el cambio climático global, han sido históricamente reconocidas como la principal causa de ruptura de la simbiosis coral-zooxantela y de blanqueamiento coralino (Iglesias-Prieto *et al.*, 1992; Reaka-Kudla *et al.*, 2003; Wilkinson, 2008). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que la elevada irradiación solar, actuando de forma independiente o combinada con las elevadas temperaturas, también juega un importante papel en los eventos masivos de blanqueamiento (Hoegh-Guldberg, 1999; Dunne y Brown, 2001; Anthony y Connolly, 2007). La información generada a partir de esta investigación apoya este último supuesto y sugiere que el grado de afectación por blanqueamiento y otros signos de deterioro, es función de la presión conjunta de los niveles de temperatura e intensidad lumínica.

Tabla 3. Cronología del comportamiento de las colonias durante el experimento, indicando la cantidad de colonias afectadas y los tipos de alteración fisiológica registrados cada semana. Se reporta la cantidad acumulada de colonias que mostraron alteraciones durante los tratamientos, hasta antes de la perturbación en el sistema (semana 5).

	Semana 1 (ag 31-sep 6)	Semana 2 (sep 7-13)	Semana 3 (sep 14-20)	Semana 4 (sep 21-27)	Semana 5 (sep 28–oc 1)	No. colonias alteradas por tratamientos
T 1	Todas las colonias sanas 	Todas las colonias sanas 	Todas las colonias sanas 	2 colonias [palidecimiento] 	Perturbación en el sistema, todas las colonias afectadas 	2
T 2	Todas las colonias sanas 	Todas las colonias sanas 	1 colonia [desprendimiento de tejido] 	3 colonias [palidecimiento] 	Perturbación en el sistema, todas las colonias afectadas 	4
T 3	Todas las colonias sanas 	4 colonias [blanqueamiento localizado] 	1 colonia [palidecimiento] 	3 colonias [palidecimiento] 	Perturbación en el sistema, todas las colonias afectadas 	8
T 4	Todas las colonias sanas 	Todas las colonias sanas 	Todas las colonias sanas 	Todas las colonias sanas 	Perturbación en el sistema, todas las colonias afectadas 	0

Los resultados de esta investigación resaltan la importancia de incluir la variable “intensidad lumínica” en los modelos predictivos de blanqueamiento coralino, los cuales suelen estar basados únicamente en anomalías térmicas (e.g. Coral Reef Watch Satellite Bleaching Alert System: <http://coralreefwatch-satops.noaa.gov/SBA.html>). Una aproximación multivariada que incluya las variaciones de intensidad lumínica en estos modelos, podría arrojar estimaciones más precisas del riesgo de afectación de estos eventos (Anthony y Connolly, 2007).

5.3. DENSIDAD INICIAL DE ZOOXANTELAS

Al comenzar los tratamientos, se determinó la densidad inicial de zooxantelas en los corales del experimento a partir de diez fragmentos de diez colonias elegidas al azar del sistema de acuarios. Durante el proceso de centrifugación para concentrar las muestras, se fragmentó accidentalmente uno de los tubos de ensayo y se derramó una de las muestras. A partir de las nueve muestras restantes, se realizaron los respectivos conteos (72 en total, 8 por muestra) y se determinó el promedio de la densidad de zooxantelas por muestra y a nivel general (Tabla 4).

La densidad de zooxantelas al inicio del experimento (~7 millones de células / cm²) se encontró en el rango de los valores reportados en otros estudios (1,5 millones/cm²: Klepel *et al.*, 1989; 1,6 millones/cm²: Battey y Porter, 1998; 5-35 millones/cm²: Fitt *et al.*, 2000), lo que indica que aparentemente las colonias mantenían un buen estado de salud al inicio de los tratamientos.

Tabla 4. Promedio general y por muestras de la densidad de zooxantelas al inicio del experimento, con los respectivos datos necesarios para su estimación.

Muestra No.	Volumen muestra (ml)	Área de tejido (cm ²)	Promedio de conteos	Densidad de zoox. Calculada (células / cm ²)
M 1	10	5,77	72,63	6.296.965,32
M 2	10	5,77	44,88	3.890.895,95
M 3	10	5,43	55,75	5.130.368,10
M 4	10	5,87	38,25	3.259.943,18
M 5	10	6,87	156,63	11.404.733,01
M 6	10	5,33	93,50	8.765.625,00
M 7	15	8,27	105,88	9.605.594,76
M 8	15	10,50	67,25	4.803.571,43
M 9	10	3,17	63,50	10.026.315,79
Promedio general				7.020.445,84
D.E.				2.977.660,29

5.4. CONCENTRACIÓN INICIAL DE CLOROFILA α

Al comenzar los tratamientos experimentales, se determinó la concentración inicial de clorofila α en los corales del experimento a partir de diez fragmentos provenientes de las mismas diez colonias empleadas para el análisis de zooxantelas. Se determinaron las absorbancias en las longitudes de onda respectivas y se determinó el área aproximada del tejido coralino del que se extrajo la muestra. Una de las muestras obtenidas mostró valores anómalos de absorbancia (valores negativos, luego de sustraer el factor de corrección por turbidez) y no fue tenida en cuenta en los análisis (Tabla 4).

A partir de las nueve muestras resultantes, se determinó una concentración media de clorofila α al inicio de los tratamientos de $0,88 \pm 0,71 \mu\text{g} / \text{cm}^2$. La cantidad de clorofila α en las muestras se encontró en un promedio de $5,37 \pm 4,52 \mu\text{g}$ (Tabla 4).

Tabla 5. Promedio general de la concentración de clorofila α al inicio del experimento. Se registra la concentración de clorofila α y los valores de absorbancia obtenidos para cada muestra, indicando la muestra que no fue tenida en cuenta por valores anómalos (-).

Colonia No.	Área tejido (cm^2)	ABSORBANCIA							$\mu\text{g Chl } \alpha$	[$\mu\text{g Chl } \alpha / \text{cm}^2$]
		750	665	665*	645	645*	630	630*		
Colonia 1	7,00	0,004	0,127	0,123	0,056	0,052	0,081	0,077	1,35	0,19255714
Colonia 2	6,47	0,008	0,12	0,112	0,057	0,049	0,081	0,073	1,22	0,18940052
Colonia 3	7,97	0,005	0,438	0,433	0,126	0,121	0,161	0,156	4,84	0,60783891
Colonia 4	6,37	0,004	0,303	0,299	0,096	0,092	0,128	0,124	3,33	0,52311832
Colonia 5	10,83	0,007	1,295	1,288	0,346	0,339	0,433	0,426	14,44	1,33265262
Colonia 6	9,47	0,043	0,957	0,914	0,289	0,246	0,369	0,326	10,23	1,08110915
Colonia 7	3,03	0,071	0,617	0,546	0,234	0,163	0,255	0,184	6,09	2,00911319
Colonia 8	7,00	0,046	0,146	0,1	0,122	0,076	0,183	0,137	1,04	0,14875143
Colonia 9	3,23	0,053	0,572	0,519	0,198	0,145	0,239	0,186	5,80	1,79517835
Colonia 10 (-)	8,43	0,25	0,47	0,22	0,172	-0,078	0,215	-0,035	2,66	0,31530593
Promedio									5,37	0,8755244
D.E.									4,52	0,71092132

Las diferentes unidades de medida empleadas para reportar la concentración de pigmentos fotosintéticos en especies de corales (*e.g.* Log Chl α/cm^2 ; Chl $\alpha/\text{zooxantela}$; Chl $\alpha/\text{pólipo}$), dificultó y limitó la posibilidad de realizar análisis comparativos con otros estudios. Sólo se ubicó un estudio que reporta la concentración del pigmento en la misma especie y en las mismas unidades a las utilizadas en esta investigación (Battey y Porter, 1998: $3,78 \mu\text{g Chl } \alpha/\text{cm}^2$, colonias a 10 m de profundidad); comparada con este reporte, la concentración inicial de clorofila α encontrada en los fragmentos de *M. annularis* fue relativamente baja ($0,87 \pm 0,71 \mu\text{g Chl } \alpha/\text{cm}^2$). Esta condición podría estar relacionada con la degradación del pigmento durante el proceso de aclimatación o con un error de detección por parte del método.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La experimentación con corales del AMP-CRSBeIF permitió profundizar en el conocimiento que se tiene sobre las posibles reacciones de los corales ante la variación de las condiciones ambientales, principalmente de temperatura e intensidad lumínica.

Durante la fase de aclimatación, el deterioro generalizado de los fragmentos de *Agaricia tenuifolia* evidenciaron una mayor sensibilidad de esta especie a la variación de las condiciones ambientales naturales. Por el contrario, la sobrevivencia de todos los fragmentos de *Montastraea annularis* demostraron su elevada resistencia y capacidad adaptativa. Las reacciones observadas demuestran los diferentes grados de sensibilidad y tolerancia relacionados con las estrategias de vida de las dos especies.

El registro de alteraciones fisiológicas en las colonias durante el desarrollo del experimento permitió establecer una aproximación a la sensibilidad de *M. annularis* a diferentes niveles de temperatura e intensidad lumínica. Las principales alteraciones fisiológicas fueron el palidecimiento, el blanqueamiento localizado y el desprendimiento de tejido coralino. El tratamiento que combinaba los niveles de elevada temperatura e intensidad lumínica fue el más perjudicial para los corales. Por el contrario, el tratamiento que conjugaba niveles de elevada temperatura y baja intensidad lumínica pareció ser el más tolerable. La evidencia sugiere que el grado de afectación por blanqueamiento y otros signos de deterioro es función de la presión simultánea de los niveles de temperatura y luz.

La densidad inicial de zooxantelas (~7 millones de células / cm²) se encontró en el rango de otros reportes, lo que indica que al iniciar el experimento las colonias parecían estar saludables.

La concentración inicial de clorofila *a* (0,87 µg Chl *a*/cm²) fue baja comparada con otros estudios, condición que podría estar relacionada con la degradación del pigmento durante la aclimatación o a un error de detección del método.

Los resultados apoyan la inclusión de la variable “intensidad lumínica” en los modelos predictivos de blanqueamiento coralino con el fin de obtener estimaciones más precisas del riesgo de afectación por blanqueamiento coralino.

Es fundamental tener en cuenta procesos inherentes al ciclo de vida de los corales, como los eventos reproductivos, en la planeación y desarrollo de investigaciones experimentales. Procurar evitar estos eventos en el sistema para favorecer el control de las condiciones experimentales.

El desarrollo de investigaciones experimentales *ex situ* requiere de períodos de tiempo prolongados y numerosos ensayos para obtener resultados confiables; adicionalmente, su éxito puede ser bajo debido a la alta sensibilidad de algunos corales al cambio de las condiciones ambientales naturales. Una alternativa elemental es la implementación de experimentos *in situ*, donde se evita la exposición a variables relacionadas con el cautiverio y se obtiene información relevante sobre las reacciones fisiológicas de los corales ante algún tensor.

La generación de conocimiento sobre la dinámica de los ecosistemas en el marco del cambio climático es un tema relevante para el manejo efectivo de los recursos naturales ante futuros tenses. Las investigaciones adelantadas hasta la actualidad son sólo un primer paso. Futuros análisis deberán ser realizados para verificar y complementar la evidencia generada a partir de esta investigación, promoviendo una mejor comprensión de la reacción de los corales presentes en el AMP-CRSBeIF ante tenses ligados al cambio climático y al desarrollo.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Alonso, D. y P. Castillo (Eds). 2007. Plan de manejo del Área Marina Protegida de los Archipiélagos del Rosario y San Bernardo. INVEMAR-MAVDT-UAESPNN-INCODER-CARSUCRE-CARDIQUE-EPA CARTAGENA-DIMAR. Santa Marta, Colombia. 159 p.
- Anthony, K.R.N. y S.R. Connolly. 2007. Bleaching, energetics, and coral mortality risk: effects of temperature, light, and sediment regime. *Limnol. Oceanogr.*, 52(2): 2007: 716-726.
- Aronson, R., Bruckner, A., Moore, J., Precht, B. y E. Weil. 2008. *Agaricia tenuifolia*. En: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.4. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 06 May 2011.
- Baird, A.H., R. Bhagooli, P.J. Ralph, S. Takahashi. 2009. Coral bleaching: the role of the host. *Trends in Ecology and Evolution*, 24(1): 16-20.
- Bak, R.P.M. y M.S. Engel. 1979. Distribution, abundance and survival of juvenile hermatypic corals (Scleractinia) and the importance of life history strategies in the parent coral community. *Marine Biology*, 54: 341-352.
- Bathey, J.F. y J.W. Porter. 1998. Photoadaptation as a whole organism response in *Montastraea annularis*. *Proc. 6th Int. Coral Reef Symp.*, 3: 79-87
- Buddameier, R.W., J.A. Kleypas y R.B. Aronson. 2004. Coral reefs and global climate change: potential contributions of climate change to stress on coral reef ecosystem. Prepared for the Pew Center on Global Climate Change. 56 p.
- Brown, B.E., C.A. Downs, R.P. Dunne y S.W. Gibb. 2002. Exploring the basis of thermotolerance in the reef coral *Goniastrea aspera*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 242: 119-129
- Carpenter, K.E. *et al.* 2008. One-third of reef building corals face elevated extinction risk from climate change and local impacts. *Scienceexpress. Report*, 1:10.1126.
- CIOH-CARDIQUE. 1998. Caracterización y diagnóstico integral de la zona comprendida entre Galerazamba y bahía Barbacoas. Cartagena. 160 p.
- D'Croz, L., J.L. Maté y J.A. E. Oke. 2001. Responses to elevated sea water temperature and UV radiation in the coral *Porites lobata* from upwelling and non-upwelling environments on the Pacific coast of Panama. *Bull. Mar. Sci.*, 69(1): 203-214
- Díaz, J.M., L.M. Barrios, M.H. Cendales, J. Garzón-Ferreira, J. Geister, M. López-Victoria, G.H. Ospina, F. Parra-Velandia, J. Pinzón, B. Vargas-Angel, F. Zapata y S. Zea. 2000. Áreas coralinas de Colombia. INVEMAR, Santa Marta. Serie de Publicaciones Especiales No 5. 175 p.
- Dunne, R.P. y B.E. Brown. 2001. The influence of solar radiation on bleaching of shallow water reef corals in the Andaman Sea, 1993-1998.
- Fitt, W.K., F.K. McFarland, M.E. Warner y G.C. Chilcoat. 2000. *Limnol. Oceanogr.*, 45(3): 677-685
- Gil-Agudelo, D.L., J. Garzón-Ferreira, A. Rodríguez-Ramírez, M.C. Reyes-Nivia, R. Navas-Camacho, D.E. Venera-Pontón, G. Díaz-Pulido y J.A. Sánchez. 2006. Blanqueamiento coralino en Colombia durante el año 2005: En: INVEMAR Informe del Estado de los Ambientes Marinos y Costeros de Colombia: Año 2005. Serie de publicaciones periódicas del INVEMAR No 8, Santa Marta. 83-87 pp.
- Guisande-González, C. 2006. Tratamiento de datos. Ediciones Díaz de Santos. España. 356 p.

- Harrison, P.L. 2011. Sexual reproduction of scleractinian corals. En: Coral reefs: An Ecosystem in Transition. Springer Science+Business Media B.V. 59-85 pp.
- Harrison, P.L. y C.C. Wallace. 1990. Reproduction, dispersal and recruitment of scleractinian corals. En: Dubinsky, Z. (Ed). Ecosystems of the World 25. Coral Reefs. Elsevier Science B.V. Amsterdam, The Netherlands. 133-208 pp.
- Hoegh-Guldberg O. 1999. Climate change, coral bleaching, and the future of the world's coral reefs. *Marine Freshwater Research* 50: 839-866
- Iglesias-Prieto, R., J.L. Matta, W.A. Robins y R.K. Trench. 1992. Photosynthetic response to elevated temperature in the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum* in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89: 10302-10305
- Johannes, R.E. y W.J. Wiebe. 1970. Method for determination of coral tissue biomass and composition. *Limnology and Oceanography* 15:822-824
- Kleppel, G.S., R.E. Dodge y C.J. Reese. 1989. Changes in pigmentation associated with the bleaching of stony corals. *Limnol. Oceanogr.*, 34(7): 1331-1335
- Kleypas, J.A., R.A. Feely, V.J. Fabry, C. Langdon, C.L. Sabine y L.L. Robbins. 2006. Impacts of ocean acidification on coral reefs and other marine calcifiers: a guide for future research, report of a workshop held 18-20 April 2005, St. Petersburg, FL, sponsored by NSF, NOAA, and the U.S. Geological Survey. 88 p.
- Knowlton, N. 2001. The future of coral reefs. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 98(10): 5419-5425
- Lesser, M.P. 2004. Experimental biology of coral reef ecosystems. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 300: 217-252
- Marsh, J.A. Jr. 1970. Primary productivity of reef-building calcareous red algae. *Ecology*, 51(2): 255-263.
- Orr, J.C. *et al.* 2005. Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature*, 437. doi:10.1038/nature04095.
- Parsons, T.R. y J.D.H. Strickland. 1963. Discussion of spectrophotometric determination of marine-plant pigments, with revised equations for ascertaining chlorophylls and carotenoids
- Polato, N.R., C.R. Voolstra, J. Schnetzer, M.K. DeSalvo, C.J. Randall, A.M. Szmant, M. Medina y I.B. Baums. 2010. Location-specific responses to thermal stress in larvae of the reef-building coral *Montastraea faveolata*. *PLoS ONE*, 5(6): e11221. doi:10.1371/journal.pone.0011221
- Reaka-Kudla, M.L., D.S. O'Connell, J.D. Regan y R. Wicklund. 2003. Effects of temperature and UV-B on different components of coral reef communities from the Bahamas. NOAA/RSMAS. V29-v34.
- Reyes, J. y N. Santodomingo. 2002. Manual de identificación CITES de Invertebrados marinos de Colombia. Serie de documentos generales INVEMAR No. 8; Serie manuales de identificación CITES de Colombia. 99 p.
- Solano, O.D., G. R. Navas, S.K. Moreno-Forero. 1993. Blanqueamiento coralino de 1990 en el Parque Nacional Corales del Rosario (Caribe colombiano). *An. Inst. Invest. Mar. Punta Betin.* 22: 97-111.
- Strickland, J.D.H. y T.R. Parsons. 1972. A practical handbook of seawater analysis. Fisheries Research Board of Canada, Ottawa. 310 p.
- Vega-Sequeda, J., R. Navas-Camacho, K. Gómez-Campo, T. López-Londoño y D.L. Duque. EN PRENSA. Estado de los arrecifes coralinos en Colombia. En: INVEMAR. Informe del Estado de los Ambientes y Recursos Marinos y Costeros en Colombia: Año 2010. Serie de publicaciones periódicas del INVEMAR No 8, Santa Marta.
- Veron, J. 2000. Corals of the World. Australian Institute of Marine Science. Australia. Vol 2: 429 p.
- Wilkinson, C. 2008. Status of coral reefs of the world: 2008. Global Coral Reef Monitoring Network, and Reef and Rainforest Research Centre, Townsville.
- Yakovleva, I. y M. Hidaka. 2004. Differential recovery of PSII function and electron transport rate in symbiotic dinoflagellates as a possible determinant of bleaching susceptibility of corals. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 268: 43-53