

**Cianobacterias bentónicas arrecifales: Evaluación de sus interacciones alelopáticas  
mediante ensayos *in situ* en comunidades coralinas  
Islas del Rosario, Caribe colombiano**

**CHRISTIAN FELIPE NIETO PANQUEVA**

**Trabajo de Grado para optar al Título de Biólogo Marino**

**Directora**

Mónica Puyana Ph.D.  
Profesora Titular  
Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano

**Asesor**

Julian Prato  
Biólogo Marino  
Cand M.Sc. Microbiología

Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano  
Facultad de Ciencias Naturales e Ingeniería  
Programa de Biología Marina  
Bogotá, D.C.  
2012

# CIANOBACTERIAS BENTÓNICAS ARRECIFALES: EVALUACIÓN DE SUS INTERACCIONES ALELOPÁTICAS MEDIANTE ENSAYOS *IN SITU* EN COMUNIDADES CORALINAS ISLAS DEL ROSARIO, CARIBE COLOMBIANO

**Christian Felipe Nieto**

Grupo de Investigación de Bioprospección y Biotecnología  
Facultad de Ciencias Naturales e Ingeniería  
Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Bogotá, Colombia.

**RESUMEN.** A nivel mundial, varias especies de cianobacterias marinas bentónicas forman afloramientos en zonas arrecifales donde pueden propiciar mortalidad en animales y degradación de corales y otros organismos. Recientemente, los afloramientos de cianobacterias bentónicas son recurrentes en varias localidades del Caribe Colombiano (Islas del Rosario, San Andrés y Providencia, Santa Marta). En estos eventos las cianobacterias crecen sobre el sustrato, corales, pastos y otros organismos bentónicos sin que sus efectos sobre estas comunidades se hayan dimensionado. Este estudio evaluó las interacciones entre cianobacterias y corales hermatípicos y octocorales con el fin de identificar si hay efectos deletéreos de las cianobacterias atribuibles a mecanismos alelopáticos. Para esto se incorporaron extractos de cianobacterias a geles de Phytigel™ que se expusieron al contacto directo con el coral *Porites porites* y el octocoral *Briareum asbestinum*. Después de 24, 48 y 72h de exposición se evaluó por HPLC (CLAE) el perfil de pigmentos fotosintéticos de sus zooxanthellas asociadas. El extracto aislado a partir de *Lyngbya* spp. mostró un claro efecto sobre los perfiles cromatográficos de zooxanthellas evidenciado por un incremento en feofitina, un producto de degradación de la clorofila. El efecto se incrementó cuanto mayor fue el tiempo de exposición. Las cianobacterias tienen la capacidad de competir eficientemente por espacio con corales por sus rápidas tasas de crecimiento, defensas contra la herbivoría y mecanismos alelopáticos.

**Palabras clave:** Alelopatía, *Porites porites*, *Briareum asbestinum*, pigmentos fotosintéticos, *Lyngbya*.

**ABSTRACT.** World-wide, several species of bloom-forming marine benthic cyanobacteria grow in reef areas causing mortality in animals and degradation of corals and other organisms. Recently, cyanobacterial blooms have become recurrent in several locations at the Colombian Caribbean (Rosario, San Andrés and Providencia islands, Santa Marta). In these events cyanobacteria grow over the substrate, corals, sea grasses and other organisms but their effect has not been assessed. This study evaluated interactions between cyanobacteria and hermatypic coral and octocorals, in order to identify any deleterious effects that could be related to allelopathic mechanisms. Cyanobacterial extracts were incorporated into Phytigel™ gels and placed in direct contact with the coral *Porites porites* and the octocoral *Briareum asbestinum*. After 24, 48 and 72h of exposure, chromatographic profiles of associated zooxanthellae was evaluated by HPLC. The extract from *Lyngbya* spp. showed a clear effect on the zooxanthellae chromatographic profiles evidenced by an increase in pheophytin, a degradation product from chlorophyll. The effect was greater with longest exposure time. Cyanobacteria can compete against corals due to their fast growth rates, defenses against herbivory and allelopathic mechanisms

**Key-words:** Allelopathy, *Porites porites*, *Briareum asbestinum*, photosynthetic pigments, *Lyngbya*.

## INTRODUCCIÓN

Las cianobacterias son bacterias con capacidades fotosintéticas que en la actualidad son motivo de preocupación, por su frecuente y recurrente aparición en arrecifes coralinos y porque aparentemente no hay mecanismos biológicos para su control en tales ecosistemas (Thacker y Paul, 2001; Paul *et al.*, 2005; Ritson-Williams *et al.*, 2005). Los afloramientos de cianobacterias bentónicas marinas suelen presentarse en aguas someras y protegidas y pueden, por acción del oleaje, terminar en la playa como arribazones (Burja *et al.*, 2001). No es muy claro cuáles son los factores ambientales que contribuyen a la formación de estos afloramientos, pero parece haber una relación de éstos con una acción del oleaje leve, los niveles de fosfatos y la biodisponibilidad de hierro (O'Neil *et al.*, 2000; Kuffner y Paul, 2004). Sin embargo, cepas individuales de cianobacterias varían enormemente en la dinámica de sus afloramientos y en muchos casos parecen estar más controladas por disturbios físicos que por la disponibilidad de nutrientes o la competencia con macroalgas (Thacker y Paul, 2001). En arrecifes coralinos, dada su abundancia durante ciertas épocas y en ciertas localidades, las cianobacterias pueden llegar a jugar un papel similar al de las algas en términos de producción primaria y relaciones con herbívoros (Paul *et al.*, 2001).

Dada su baja o nula paladeabilidad a la gran mayoría de herbívoros generalistas, los afloramientos de ciertas cianobacterias, generan una gran diversidad de compuestos químicos (Kuffner *et al.*, 2006) Estos compuestos, los cuales tienen actividad antidepredadora y antifouling tienen además propiedades alelopáticas e inhiben el reclutamiento de larvas de corales (Kuffner y Paul, 2004; Kuffner *et al.*, 2006). Kuffner y Paul (2004) determinaron que la presencia de *Lyngbya majuscula* tuvo un efecto negativo en la supervivencia larval de *Acropora surculosa* (especie que libera sus gametos al medio) y reclutamiento de *Pocillopora damicornis* (especie vivípara) en Guam. Posteriormente, en experimentos realizados en los Cayos de la Florida, Kuffner *et al.*, (2006) determinaron que tanto algas pardas como *Dictyota* y *Lobophora*, así como varias especies de la cianobacteria *Lyngbya*, no solo inhibieron el asentamiento larval del coral *Porites astreoides* y del octocoral *Briareum asbestinum* sino que la mortalidad de los reclutas se incrementó cuando entraron en contacto con estas algas. Así, tanto algas como cianobacterias resultan ser competitivamente superiores a los corales inhibiendo su reclutamiento.

El blanqueamiento es una respuesta al estrés ambiental por parte de corales y otros organismos que tienen endosimbiosis con zooxanthellas (Kleppel *et al.*, 1989). El blanqueamiento es una pérdida de pigmentación por expulsión o reorganización de las zooxanthellas al interior del hospedero o degradación de pigmentos de las mismas como una posible respuesta adaptativa a las nuevas condiciones ambientales de irradiación y temperatura (Rowan *et al.*, 1997; River y Edmunds, 2001; Venn *et al.*, 2006). Los autores coinciden en que eventos frecuentes prolongados de blanqueamiento afectan la eficiencia energética de los corales, su tasa de crecimiento, incrementan su susceptibilidad a patógenos y competidores y reducen su supervivencia (resumido en Venn *et al.*, 2006). Los mecanismos por los cuales se cree ocurren los fenómenos de blanqueamiento, son por la inhibición de los fotosistemas, alteración del ciclo de Calvin y exposición a especies reactivas de oxígeno de los pigmentos fotosintéticos que se encuentran en las zooxanthellas, resultando en degradación de los mismos y eliminación de las zooxanthellas por parte del hospedero (resumido en Venn *et al.*, 2006).

En varias localidades del Caribe colombiano (Archipiélago de San Andrés, Providencia y Santa Catalina, Islas del Rosario, Parque Nacional Natural Tayrona) las cianobacterias recubren diferentes tipos de sustrato incluyendo algas y corales durante ciertas épocas del año (Elvira Alvarado y Valeria Pizarro com. pers.). Se ha podido constatar igualmente que algunas cianobacterias, al crecer sobre corales u octocorales, pueden causar blanqueamiento, necrosis o regresión del tejido (M. Puyana obs.

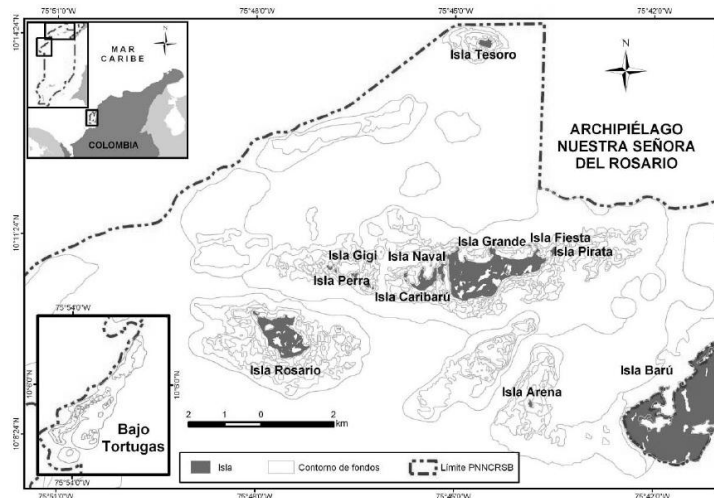
pers.). Por esta razón, se pretendió evaluar la posible existencia de un mecanismo químico (alelopatía), que permita a las cianobacterias competir eficientemente por espacio con corales y Octocorales.

## MATERIALES Y METODOS

### Área de estudio

El estudio se llevo a cabo en el Archipiélago de Nuestra Señora del Rosario ( $10^{\circ} 11' N$ ,  $75^{\circ} 48' W$ ). El Archipiélago de las Nuestra Señora del Rosario es un conjunto de islas bajas rodeadas por extensas formaciones coralinas, ubicado a 54 km al suroeste de la Bahía de Cartagena, Caribe Colombiano (Figura 1). El área, que comprende aproximadamente  $120 \text{ km}^2$ , hace parte del Parque Nacional Natural Corales del Rosario y San Bernardo (PNNCRSB). Fueron seleccionadas tres zonas de buceo en inmediaciones de Isla Grande, conocidas como Botellas y Pavitos, donde se llevo a cabo la recolección de tapetes bentónicos de cianobacterias. Posteriormente el experimento de alelopatía se realizo en el área norte arrecifal de dicha isla, en el sitio conocido como Ministerio.

El área se encuentra dentro de la zona de convergencia intertropical (ZCIT), bajo la influencia constante de vientos del noreste y sureste. El promedio anual para la temperatura superficial del mar es de  $27,5^{\circ}\text{C}$ , contando con precipitaciones de aproximadamente 1013 mm y una salinidad cercana a 35 UPS. La marea presenta una variación con un rango entre 17 y 58 cm (Sánchez *et al.*, 1999).



**Figura 1.** Archipiélago del Parque Nacional Natural Corales del Rosario y San Bernardo, Caribe Colombiano (Modificado de INVEMAR, 2009).

### Recolección e identificación de muestras

El material con el que se prepararon los extractos fue recolectado en las Islas del Rosario en septiembre de 2011. Las muestras de cianobacterias se desprendieron manualmente del sustrato (empleando guantes de látex) y se introdujeron en bolsas de velo suizo. Una vez en superficie, las

muestras fueron marcadas con papel pergamino y transferidas a bolsas Ziplock™. El material se mantuvo bajo congelación en el laboratorio de “Bioprospección y Biotecnología” de la Universidad Jorge Tadeo Lozano hasta el momento de su análisis. Para identificar las especies de cianobacterias recolectadas, se almacenó una pequeña porción de muestra (aproximadamente 15 g), que fue preservada en una solución de formol en agua de mar al 4%. La identificación se realizó en los laboratorios de la UJTL, con un microscopio Nikon acoplado a un computador con el software para análisis de imágenes NIS-Elements Br 2.30 Imaging. Los caracteres más importantes para la identificación taxonómica incluyeron las medidas de longitud y ancho de las células, la presencia de vaina mucilaginosa recubriendo los filamentos y la forma de las células terminales de los mismos, siguiendo la clave taxonómica de Komárek y Anagnostidis (2005).

### **Preparación de extractos**

Las muestras de cianobacterias que se encontraban congeladas fueron liofilizadas para luego ser sometidas a un proceso de extracción exhaustiva con una mezcla 1:1 de metanol-diclorometano. El solvente fue removido mediante rotoevaporación para obtener un extracto concentrado (Rasher y Hay, 2010). Se obtuvieron y posteriormente evaluaron tres extractos: LP: Tapete de *Lyngbya* spp. de crecimiento sobre fondos rocosos (Isla Pavitos, 7 m de profundidad), BF: Biopelícula de cianobacterias sobre organismos bentónicos (Botellas, Isla Grande; 3 m de profundidad) y BPVA: *Lyngbya* de coloración violeta oscuro (fondos arenosos de Isla Pavitos, 8m de profundidad).

### **Ensayo de toxicidad con *Artemia salina***

El ensayo de letalidad (CL<sub>50</sub>) contra *Artemia salina* es una prueba ampliamente usada para la determinación de propiedades tóxicas de cianobacterias (Yoo y Gerwick, 1995; Sittachita *et al.*, 2000; Tan, 2000). Para el ensayo, se incubaron los cistos de *Artemia* hasta eclosión en agua de mar artificial (3,8 % sal marina) a una temperatura entre 26-30 °C. Para el ensayo se evaluaron concentraciones de 1000, 500, 100 y 10 ppm de cada extracto crudo resuspendido en etanol, utilizando 15 larvas de *Artemia* por pozo. Se emplearon como controles agua de mar con y sin etanol-acetona y como control positivo dicromato de potasio a 100 ppm. 24 horas después de la adición de los extractos, se contó el número de sobrevivientes. La determinación de la CL<sub>50</sub> se realizó mediante el método gráfico propuesto por Sam (1993).

### **Experimento de alelopatía**

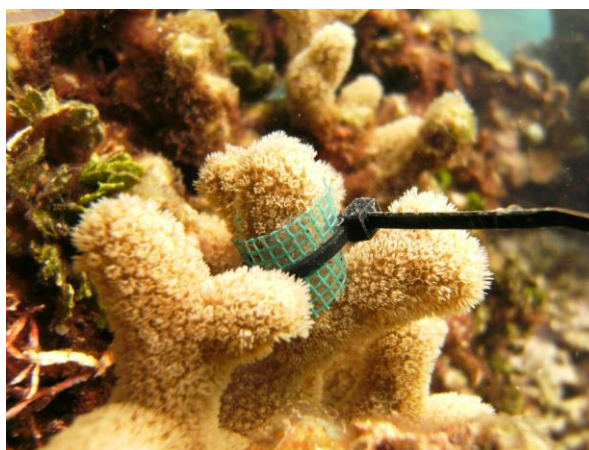
Los experimentos en campo se realizaron en el mes de abril de 2012. Para evaluar el potencial efecto alelopático de los extractos de cianobacterias, éstos se incorporaron en geles que se expusieron en contacto directo con corales y octocorales sanos de las especies *Porites porites* y *Briareum asbestinum*, respectivamente. Los geles se removieron gradualmente con el fin de evaluar si se podía apreciar blanqueamiento, el cual se considera como un indicador de estrés en corales (Titlyanov *et al.*, 2007). Dado que la determinación visual del blanqueamiento es muy subjetiva, éste se determinó mediante técnicas cromatográficas analíticas con el fin de evaluar la abundancia y variación de los principales pigmentos fotosintéticos posterior al contacto con los extractos.

Para este experimento se asumieron varios supuestos: (1) cada una de las ramitas de coral (tratamiento o control) estaba influenciada por el mismo nivel de radiación lumínica, (2) la diversidad y proporción de clados de zooxanthellas asociadas (Knowlton y Rohwer, 2003), era la misma en toda la rama y en toda la colonia, (3) en consideración a los numerales anteriores, se asumió entonces que la concentración de pigmentos fotosintéticos entre ramitas en un tiempo cero y sin tratamiento

alguno debería ser la misma, (4) las condiciones de extracción de los pólipos y posterior obtención de extractos orgánicos se realizaron de una manera uniforme para todos los tratamientos y controles.

Los extractos crudos, fueron incorporados en matrices gelatinosas del polisacárido Phytigel™ siguiendo la metodología propuesta por Thacker *et al.* (1998) y Rasher y Hay (2010). El gel se preparó mezclando Phytigel™ con agua caliente, y posteriormente cuando la mezcla se enfrió un poco, se añadió el extracto resuspendido en un poco de acetona. Antes que se endureciera la mezcla, ésta fue vertida en moldes de acrílico cuyo fondo estaba cubierto con anjeo plástico. El anjeo le da mayor solidez a la matriz de Phytigel™ y permite su mejor manipulación en campo. Para los controles, solo se añadió solvente a la matriz de Phytigel™. Los extractos se incorporaron a la misma concentración natural presente en los afloramientos que es alrededor del 6% (Prato, datos sin publicar).

El experimento de alelopatía se realizó en la localidad Ministerio, sobre la barrera arrecifal ubicada al norte de Isla Grande. Para la realización del experimento, se seleccionó un número no mayor a tres colonias del coral digitiforme *Porites porites* y del octocoral *Briareum asbestinum*, dada su abundancia local y con el fin de facilitar el fraccionamiento y obtención de las porciones para el análisis de pigmentos por HPLC. Las bandas de anjeo plástico y Phytigel™ con y sin extractos, fueron dispuestas sobre las ramas de los corales y octocorales y sujetas con amarres plásticos con especial cuidado para no dañar los pólipos (Figura 2). Para el ensayo, se seleccionaron colonias grandes que tuvieran un número suficiente de ramificaciones o “deditos”. Por cada colonia se dispusieron cinco bandas de Phytigel™ con el mismo extracto de cianobacterias. Se dispusieron dos controles en la misma colonia, una banda de Phytigel™ sin extracto, para evaluar si había un efecto por contacto directo con una superficie sólida y una banda de Phytigel™ sin extracto pero con colorante para alimentos con el fin de emular la coloración del extracto -que suele ser verde oscura- y descartar respuestas de blanqueamiento atribuibles a oscurecimiento. Adicionalmente al momento de retirar el experimento, se tomaron muestras de coral (cinco por colonia) sin tratamiento alguno para comparar con las ramas de coral sometidas a tratamientos con extracto. Las bandas tratamiento y control fueron retiradas a las 24, 48 y 72 horas de contacto para el coral y a las 48 horas para el octocoral, esto con el fin, en el caso del octocoral, de obtener un resultado sin la influencia de las defensas química que presentan estos organismos (Puyana *et al.*, 2004).



**Figura 2.** Ensayo de alelopatía contra corales: Disposición de bandas de Phytigel™ sobre una colonia de *Porites porites* (Prato datos sin publicar).

Una vez retiradas las bandas, se evaluaron las respuestas de los corales y el octocoral (blaqueamiento, regresión de tejido o necrosis), y se tomaron fotografías de cada tratamiento y control. Seguidamente, se partieron los fragmentos de coral (tanto tratamientos como controles) con pinzas pico de loro. Cada fragmento se envolvió en papel de aluminio y se introdujo en mini bolsas Ziplock™. Las bolsitas fueron llevadas inmediatamente a la superficie y congeladas en un baño de hielo seco y acetona, el cual baja la temperatura hasta  $-70^{\circ}\text{C}$ , de esta forma se buscó prevenir la degradación de los pigmentos fotosintéticos de las zooxanthellas. Los fragmentos de coral fueron transportados y mantenidos en congelación hasta el momento del análisis.

### **Cuantificación y análisis de pigmentos**

Actualmente se determina el rendimiento fotosintético de las zooxanthellas asociadas a corales como una medida del estrés de éstas a variables ambientales. La determinación puede hacerse *in situ* mediante un fluorómetro PAM subacuático que mide la eficiencia del fotosistema II en organismos fotosintéticos (Rasher y Hay, 2010). Una manera alternativa y que reduce costos, la constituye el análisis del contenido de pigmentos de las zooxanthellas, mediante extracción de los mismos y cuantificación por HPLC con base en los métodos propuestos por Kleppel *et al.* (1989) y Venn *et al.* (2006), procedimiento que se llevó a cabo en el presente trabajo.

Para la extracción de pigmentos fotosintéticos se descongelaron los fragmentos coralinos a temperatura ambiente y se removieron los pólipos contenidos en un fragmento de coral de  $1\text{ cm}^2$ . Esta área fue delimitada mediante láminas aluminio previamente cortadas (Figura 3). Los pólipos se removieron con pinzas metálicas a ras de la superficie del esqueleto coralino. La técnica fue estandarizada luego de comprobar que otros procedimientos, tales como la succión de la zona con una pipeta Pasteur conectada a una bomba de vacío, el soplado a alta presión y la inmersión en buffer ZIB (NaCl 0,4M; Na<sub>2</sub>EDTA 10mM y Tris -pH 7,5- 20mM) para extraer las zooxanthellas (Venn *et al.*, 2006), resultaron ineficientes en términos de la cantidad de pólipos obtenidos. La biomasa de pólipos se extrajo con acetona al 100% a  $0^{\circ}\text{C}$  y sonicación durante dos minutos. Con el fin de minimizar la eventual degradación de pigmentos fotosintéticos, todo el proceso se realizó en una cámara de oscuridad, la cual contaba con luz atenuada mediante papel celofán de color amarillo y verde. Los extractos fueron filtrados a través de pipetas Pasteur con tapones de algodón, secados mediante rotoevaporación y almacenados bajo atmósfera de nitrógeno (Kowaleska y Szymczak, 2001). Los extractos fueron transportados en frío y totalmente oscurecidos al laboratorio de Productos Marinos Naturales del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia para ser analizados por HPLC.



**Figura 3.** Zona de extracción de pólipos (1 cm<sup>2</sup>) en un fragmento de *Porites porites* mediante delimitación de una banda de lámina de aluminio.

Previo a la inyección en el HPLC, los extractos crudos fueron resuspendidos en acetona acuosa al 90% y se les adicionó como par iónico una solución de acetato de amonio, en proporción 2:1 (v/v), aumentando la hidrofobicidad y por tanto el tiempo de retención de las moléculas a analizar (Hovarth *et al.*, 1977).

Para el análisis, cada extracto fue filtrado usando membranas PVDF de 0,45 µm de diámetro. Se inyectaron 100 µL de cada extracto a una concentración de 1,33 mg mL<sup>-1</sup> (2 mg extracto en 1 mL acetona más 0,5 mL de la solución de par iónico) a una columna Phenomenex<sup>TM</sup> RP-18, la cual fue mantenida a temperatura ambiente y eluída con un gradiente de fase móvil terciario (0,5M acetato de amonio en metanol/agua 85:15, acetonitrilo/acetato de etilo 90:10 y acetonitrilo 100%), a un flujo de 1 ml min<sup>-1</sup> durante 50 minutos, con cambios lineales, de acuerdo con lo propuesto por Louda *et al.* (2000). La lectura espectral se realizó a 420nm, debido a la absorción lumínica de los pigmentos fotosintéticos en cuestión (Levy *et al.*, 2003).

La identificación preliminar de los pigmentos se realizó con base en los máximos de absorción UV de los principales picos en el cromatograma resultante y los tiempos de retención de los mismos comparando con los datos reportados en la literatura (Louda *et al.*, 2000; Venn *et al.*, 2006), dado que fue imposible conseguir en el país en un tiempo y a costos prudentiales, estándares de pigmentos de dinoflagelados. En consideración a lo anterior solo se tuvieron en cuenta para el análisis carotenoides y clorofilas totales. También se tuvieron en cuenta las feofitinas que son productos de degradación de la clorofila. La cuantificación se realizó basada en las áreas bajo la curva de cada cromatograma de acuerdo a la integración realizada por el cromatógrafo. La variación de los pigmentos en comparación con los controles se realizó mediante estadística descriptiva, debido a que en la mayoría de los casos no se contó con el número de muestras suficientes por tratamiento para efectuar una análisis por métodos paramétricos o no paramétricos, según fuera el caso.

## RESULTADOS

### Identificación de las cianobacterias usadas en el experimento de alelopatía

**Muestra LP:** Tapetes de cianobacterias recolectados al norte de la Isla Pavitos (Islas del Rosario) entre 5 y 15 m de profundidad. Estos tapetes de cianobacterias se caracterizaron por presentar filamentos



gruesos que se pueden ver a simple vista, muy enredados entre sí, de color rojizo o violeta. Los filamentos crecían generalmente anclados a sustratos duros como rocas y esqueletos de coral. Esta muestra resultó estar compuesta por ensambles de *L. majuscula* y *L. sordida*. *L. majuscula* presentó tricomas de 42-44  $\mu\text{m}$  de ancho y células de 7-12  $\mu\text{m}$  de longitud, los tricomas no presentaron constricciones intertabiculares y estaban envueltos en una vaina mucilaginosa de 49 a 51  $\mu\text{m}$  de ancho. Células apicales redondeadas, sin caliptra o atenuaciones. Esta especie ha sido reportada en el Caribe colombiano por Díaz-Pulido y Díaz-Ruiz (2003) y por Prato (datos por publicar) en el Archipiélago de las Islas del Rosario, San Andrés, Providencia y Santa Catalina. Los filamentos de *L. sordida* midieron 42-43  $\mu\text{m}$  de ancho y las células de 8-12  $\mu\text{m}$  de longitud, los tricomas estaban envueltos en vainas mucilaginosas de 49 a 51  $\mu\text{m}$  de ancho y a diferencia de *L. majuscula*, presentaron constricciones intertabiculares. Las células apicales fueron redondeadas sin caliptra ni atenuaciones.

**Muestra BF:** Tapetes de cianobacterias recolectados en arrecifes al norte de Isla Grande en el sector Botellas (Islas del Rosario) entre 5 y 15 m de profundidad. Estos tapetes de cianobacterias crecían a manera de biopelícula muy delgada de coloración violeta oscura a rojiza, sobre sustratos arenosos, macroalgas y cascajo de coral. Los filamentos se desprendían fácilmente del sustrato y se desintegraban fácilmente al contacto. Esta muestra resultó estar compuesta por filamentos de *Oscillatoria margaritifera* (cerca de un 97%) y *Oscillatoria* sp (cerca del 3%). El morfotipo identificado como *Oscillatoria* sp. presentó tricomas de 13-16  $\mu\text{m}$  de ancho y células de 3-4  $\mu\text{m}$  de longitud, con constricciones intertabiculares y sin vainas mucilaginosas. Las células apicales eran redondeadas y en ocasiones un poco cónicas. *Oscillatoria margaritifera* presentó tricomas sin vainas mucilaginosas de 21-26  $\mu\text{m}$  de ancho, con constricciones intertabiculares y células de 4-6  $\mu\text{m}$  de longitud. Los tricomas estaban en ocasiones suavemente atenuados hacia los extremos. Las células apicales eran redondeadas y en ocasiones presentaban una caliptra no muy notoria. *O. margaritifera* ha sido reportada en el Caribe colombiano en el Archipiélago de las Islas del Rosario, San Andrés, Providencia y Santa Catalina por Prato (datos por publicar).

**Muestra BPVA:** Tapetes de cianobacterias recolectados en zonas arenosas al sur de la Isla Pavitos en el sector (Islas del Rosario) entre 7 y 15 m de profundidad. Estos tapetes se caracterizaron por crecer sobre sustratos arenosos y en praderas de pastos marinos formando densas agregaciones a manera de almohadas de 3 a 10 cm de espesor. Estos tapetes presentaban una coloración pálida-blanca en la parte basal y rojiza en la parte apical superior. Esta muestra resultó estar compuesta por complejos ensambles de diferentes especies pertenecientes a los géneros *Oscillatoria*, *Lyngbya* y *Phormidium*. Se observaron tres morfotipos de *Lyngbya*, un morfotipo de *Oscillatoria* y un morfotipo de *Phormidium*. *Lyngbya* sp. morfotipo 1, presentó tricomas de 28-31  $\mu\text{m}$  de ancho y células de 3-7  $\mu\text{m}$  de longitud, tricomas sin constricciones intertabiculares y células apicales redondeadas y en algunas ocasiones cónicas. *Lyngbya* sp. morfotipo 2, presentó tricomas de 24-26  $\mu\text{m}$  de ancho y células de 4-6  $\mu\text{m}$  de longitud, tricomas sin constricciones intertabiculares y células apicales redondeadas y en ocasiones atenuadas. *Lyngbya* sp. morfotipo 3, presentó tricomas de 20-22  $\mu\text{m}$  de ancho y células de 3-5  $\mu\text{m}$  de longitud sin constricciones intertabiculares y células apicales redondeadas. Todos los morfotipos de *Lyngbya* presentaron tricomas envueltos por vainas mucilaginosas. El morfotipo de *Oscillatoria* presentó tricomas de 10-12  $\mu\text{m}$  de ancho y células de 1  $\mu\text{m}$  a 3  $\mu\text{m}$  de longitud, tricomas sin constricciones intertabiculares ni vainas mucilaginosas con células apicales redondeadas. El morfotipo de *Phormidium* presentó tricomas de 8-9  $\mu\text{m}$  de ancho, los tricomas no presentaron constricciones intertabiculares pero sí estaban envueltos en vainas mucilaginosas transparentes, con células apicales eran redondeadas.

### Determinación de la CL<sub>50</sub> contra *Artemia salina*

Para el ensayo se evaluaron concentraciones de 1000, 500, 100 y 10 ppm de cada extracto crudo. Transcurridas 24 horas de exposición, se encontró que los extractos BF y LP presentaron valores de CL<sub>50</sub> para *Artemia salina*, mayores y relativamente cercanos entre sí (350 ppm y 330 ppm respectivamente), mientras que para el extracto BPVA, la CL<sub>50</sub> fue bastante menor presentando un valor de 50 ppm. De acuerdo con los valores de CL<sub>50</sub>, Los extractos BF y LP se consideran medianamente tóxicos mientras que el extracto BPVA es muy tóxico.

### Experimento de alelopatía

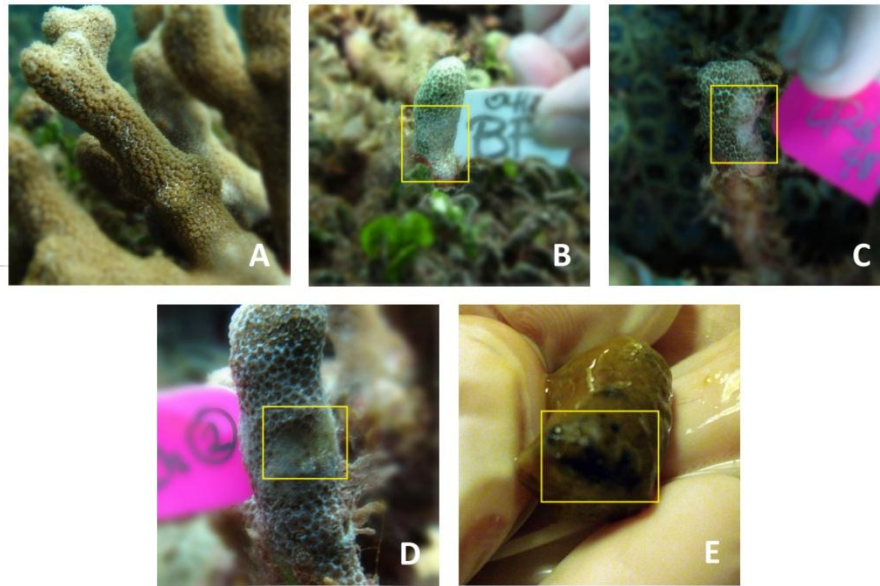
Se analizaron de tres a cinco fragmentos de coral por tratamiento como se muestra en la Tabla 1. Para el extracto LP solamente se tuvo en cuenta el tratamiento a las 24 horas dado que los tratamientos a las 48 y 72 horas se perdieron. De la misma manera a las 72 horas solo fue posible realizar la comparación de los tratamientos con el control sin manipulación alguna, debido a que los controles de Phytigel™ y oscurecimiento también se perdieron.

**Tabla 1.** Número de muestras recolectadas -coral y octocoral- y cuyos pigmentos fotosintéticos fueron analizados por medio de HPLC

Extracto/Tratamiento	Tiempo Transcurrido			
	Coral			Octocoral
	<i>Porites porites</i>			<i>Briareum asbestinum</i>
	24H	48H	72H	48H
LP	3	0*	0*	0*
BF	5	5	5	3
BPVA	4	5	5	4
Control Phytigel™	5	3	0*	5
Control Oscurecimiento	4	2	0*	5
Control sin manipulación alguna	4	3	3	3
Control t=0		3		3

\*Tratamientos instalados, pero que se perdieron

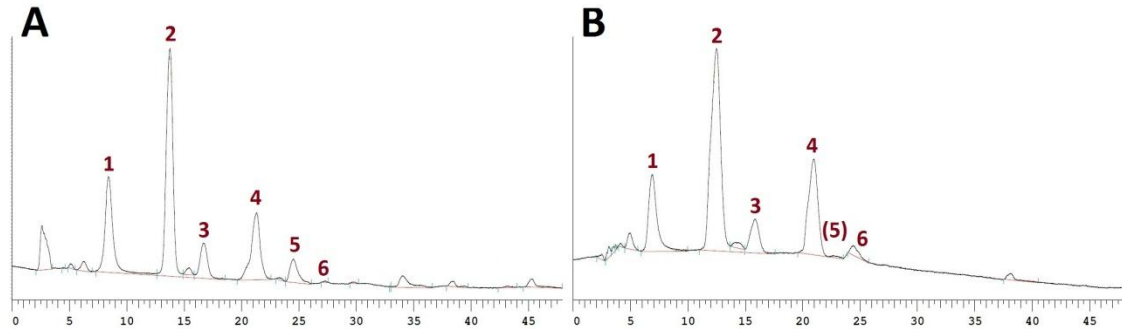
Como se aprecia en la Figura 4, el contacto de los corales con las bandas de Phytigel con extracto de cianobacterias tuvo efectos negativos en éstos, evidenciados como retracción de los pólipos, blanqueamiento ó erosión sobre la superficie de cada rama de *Porites porites*. Este efecto fue aparentemente mayor conforme aumentó el tiempo de exposición. En el segmento E de la fotografía, se llega a observar incluso una coloración negra de una parte del fragmento, atribuible posiblemente a presencia de bacterias sulfato-reductoras.



**Figura 4.** Efecto de los extractos de cianobacterias sobre el coral *Porites porites*. **A:** coral sin manipular **B, C y D:** deterioro transcurrido 24, 48 y 72 horas respectivamente; **E:** signos de necrosis (a las 72h) evidenciados al momento de la extracción de los pólipos.

#### **Perfil de pigmentos de zooxanthellas asociadas a *Porites porites* y *Briareum asbestinum***

Se obtuvo el perfil de pigmentos de cada fragmento de coral expuesto a los tratamientos experimentales o controles. Los cromatogramas típicos se muestran en la Figura 5. Los espectros UV de los picos que mostraron una mejor separación por HPLC, junto con sus respectivos tiempos de retención, se consideraron como criterios de selección de los seis principales pigmentos considerados para el análisis que correspondieron a: (1) dinoxantina (xantófila), (2) diadinoxantina (xantófila), (3) clorofila-c, (4) clorofila-b, (5) clorofila-a y (6) feofitina.



**Figura 5.** Perfil cromatográfico de pigmentos fotosintéticos: (1) dinoxantina (xantófila), (2) diadinoxantina (xantófila), (3) clorofila-c, (4) clorofila-b, (5) clorofila-a y (6) feofitina de **(A)** *Porites porites* y **(B)** *Briareum asbestinum*.

### Experimentos con *Porites porites*

A continuación se describen los resultados más sobresalientes, teniendo en cuenta el efecto de cada extracto por separado, sobre cada pigmento (Figura 6).

#### Extracto BPVA

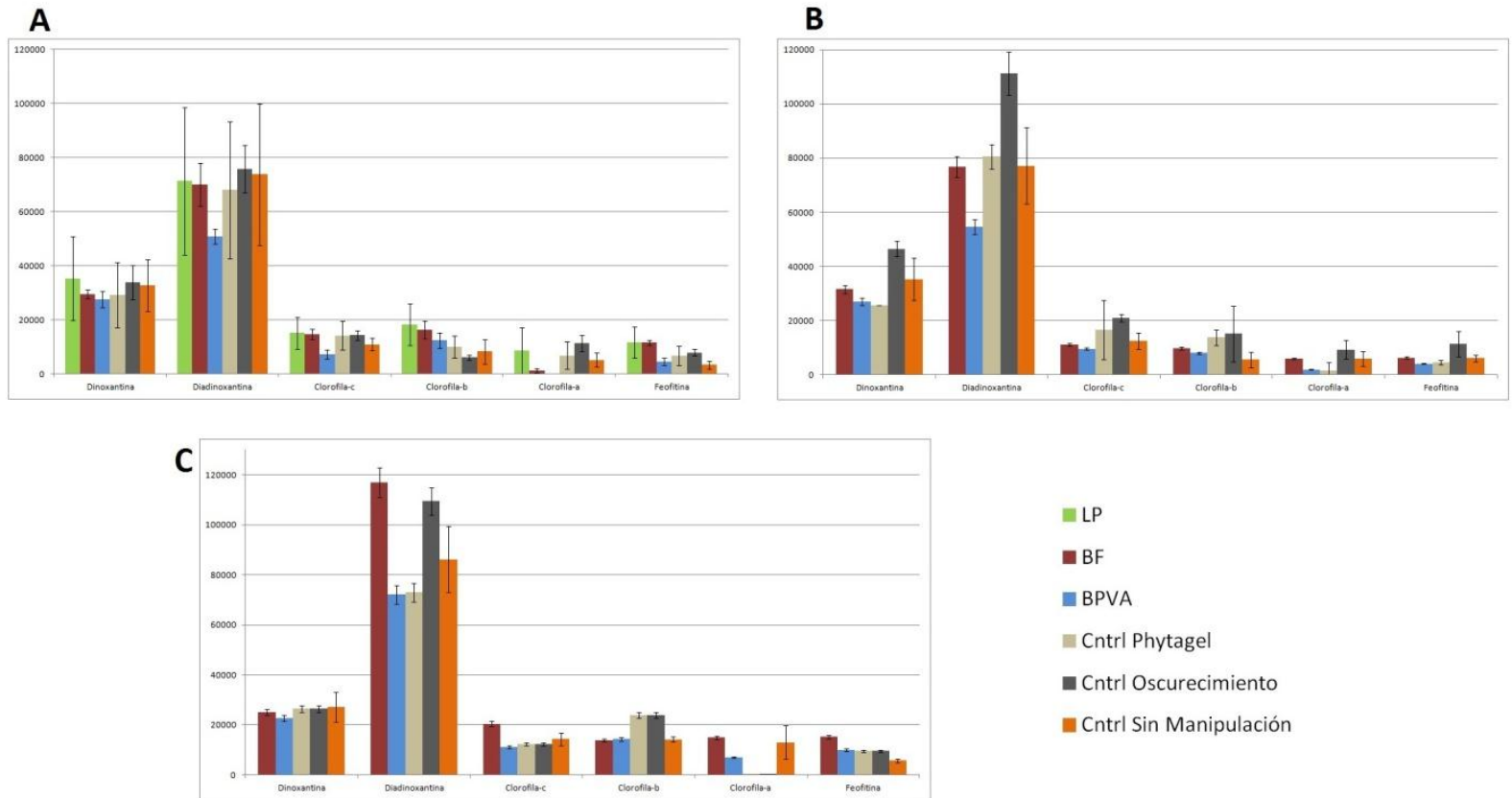
A las 24 horas de exposición, se apreciaron cantidades menores de dinoxantina, diadinoxantina y especialmente clorofila-c respecto a los controles. No se evidenció la presencia de clorofila-a. Siguiendo con la tendencia a las 48 horas de exposición, la concentración de diadinoxantina se redujo aún más y mostró una diferencia abrupta frente a los controles y demás tratamientos. Finalmente, a las 72 horas, este tratamiento fue el que presentó una menor concentración de dinoxantina respecto a los controles.

#### Extracto BF

A las 24 horas, el efecto de este tratamiento se caracterizó por mostrar un inusual incremento en la cantidad de clorofila-b. Caso contrario ocurrió con la clorofila-a, donde el tratamiento causó la mayor disminución de este pigmento en comparación con los controles. La concentración de feofitina, se incrementó en este tratamiento en comparación con los otros tratamientos.

#### Extracto LP

Las concentraciones de pigmentos a lo largo del tiempo se mantuvieron constantes con los controles para este extracto, sin embargo a las 24 horas, se generó un aumento de la clorofila-b respecto a los controles.

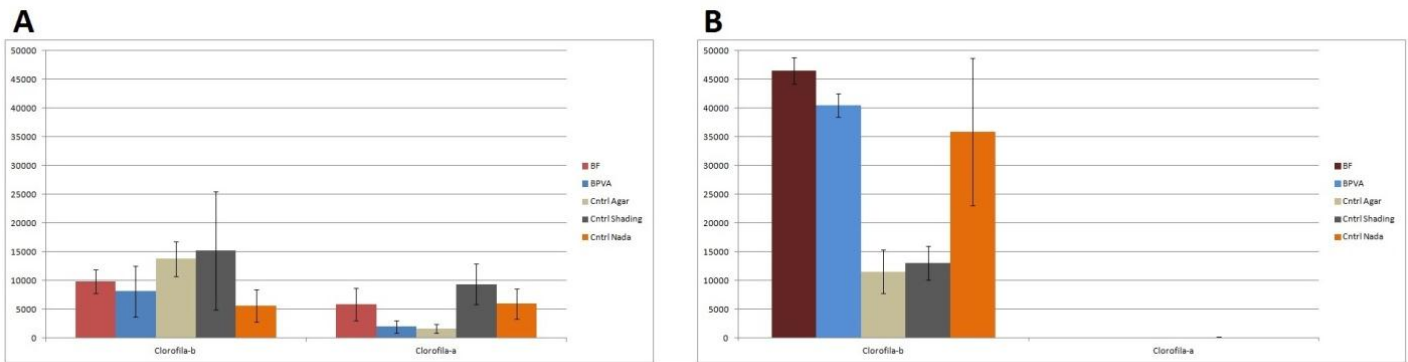


**Figura 6.** Variación en la concentración (mAU) de pigmentos fotosintéticos de zooxanthellas asociadas al coral *Porites porites* posterior a exposición a extractos de cianobacterias. Tiempo de exposición: (A) 24 horas, (B) 48 horas y (C) 72 horas.

Transcurridas 72 horas, la cantidad de feofitina se encontró relativamente constante tanto entre tratamientos como en controles, excepto en el control sin manipulación donde su concentración fue mínima.

#### Experimentos con *Briareum asbestinum*

Para *Briareum asbestinum* solo se recolectaron muestras a las 48 hrs de exposición. Al comparar la variación de pigmentos tanto en *Porites* sp., como en *Briareum* sp., se encontró que las cantidades de diadinoxantina, dinioxantina, clorofila-c y feofitina, se encontraron en proporciones relativamente similares. Sin embargo, tal como se muestra en la Figura 7, pigmentos como la clorofila-b se presentaron en mayor concentración en *Briareum asbestinum*, mientras que *Porites porites* exhibió una mayor cantidad de clorofila-a.



**Figura 7.** Concentraciones de clorofila-b y clorofila-a (mAU) de zooxantellas asociadas a **(A)** *Porites porites* y **(B)** *Briareum asbestinum*, posterior a exposición a extractos de cianobacterias

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El ensayo se basó en la evaluación de las propiedades alelopáticas de los extractos de cianobacterias, sin embargo no se descartan efectos de reducción de oxígeno (ahogamiento) y asociación de bacterias sulfuro-reductoras que caracterizan los ensamblajes de cianobacterias en el medio (Baumgartner *et al.*, 2006).

El extracto que presentó un mayor efecto sobre la concentración de pigmentos fotosintéticos de zooxantellas fue BPVA, que incidentalmente fue el más tóxico contra *Artemia salina*. Este extracto se obtuvo de un ensamblaje de varias especies de los géneros *Lyngbya*, *Oscillatoria* y *Phormidium* dentro de las que cabe resaltar *Lyngbya majuscula* y *Lyngbya sordida*, además de *Oscillatoria* spp. De acuerdo con Nagle y Paul (1998) y Chang *et al.* (2002), *Lyngbya majuscula* se caracteriza por ser una prolífica fuente de compuestos con reconocida y marcada toxicidad y propiedades alelopáticas (Osborne *et al.*, 2001). Los resultados obtenidos en este estudio, sugieren que *Lyngbya* spp. recurre a mecanismos alelopáticos para competir con corales afectando la constitución de pigmentos fotosintéticos asociadas a sus zooxantellas (Bhagooli y Hidaka, 2003).

No se evidenciaron diferencias entre los controles de oscurecimiento y los controles de Phytigel™, por lo cual se puede asumir que los geles y su posible efecto abrasivo como tal, no tuvieron un efecto deletéreo sobre corales u octocorales. Se podría sugerir que la disminución en la radiación lumínica que provocarían los tapetes de cianobacterias al crecer sobre estos organismos podría ser la causante del blanqueamiento. Sin embargo, en este trabajo los geles por sí solos no mostraron un efecto mientras que los geles con extracto sí lo hicieron. Incluso se ha podido determinar que bloqueos experimentales de irradiación (hasta de un 40%) permiten al coral funcionar eficientemente por un tiempo sin que se manifieste blanqueamiento (Falkowsky *et al.*, 1990).

En el ensayo, se notó un aumento en la concentración de feofitina en todas las ramas de coral que estuvieron expuestas a los extractos de cianobacterias conforme aumentó el tiempo de exposición a los mismos. En los controles sin manipulación, este pigmento siempre se mantuvo en concentraciones bajas. La feofitina es un producto de degradación de la clorofila (Marker, 1977; Cartaxana *et al.*, 2003), así un mecanismo por el cual las cianobacterias podrían competir con los corales sería afectando los principales pigmentos fotosintéticos de éstos para debilitarlos. *Briareum*

*asbestinum* mostró una clara diferencia en la concentración de pigmentos en el control de Phytigel™ respecto al control sin manipulación. La reducción de la concentración de pigmentos en el control de Phytigel™ puede ser atribuible al contacto directo o una posible abrasión. Durante el tiempo de duración del estudio no se detectaron respuestas de blanqueamiento atribuibles a un efecto alelopático de los extractos de cianobacterias aunque no se descarta una neutralización de los efectos de las cianobacterias de compuestos producidos por el octocoral (Puyana *et al.*, 2004).

La determinación visual del blanqueamiento, que convencionalmente es la más usada, puede llegar a ser en ocasiones muy subjetiva. Por lo anterior, la cuantificación de pigmentos, específicamente clorofilas, carotenoides y feopigmentos, se constituye como una alternativa de mayor eficacia para lograr dicho fin. Mediante la evaluación de sus variaciones, se puede inferir que tipo de condiciones están influyendo en el estado fisiológico en el que se encuentran los corales. Tradicionalmente se ha evaluado solamente las variaciones de clorofila-b como indicadores de blanqueamiento pero es importante tener en cuenta las variaciones de estos otros pigmentos en zooxanthellas posteriores a eventos de blanqueamiento (Venn *et al.*, 2006).

## **CONCLUSIONES**

El perfil de pigmentos fotosintéticos, evaluado mediante HPLC (CLAE), de las zooxanthellas asociadas a corales, como *P. porites* y el octocoral *B. asbestinum*, sometidos a 24, 48 y 72h de exposición a extractos de cianobacterias, se constituye como una importante herramienta que permite obtener resultados concluyentes en cuanto al nivel de afectación fisiológico de los corales. La presencia de pigmentos como feofitina y la disminución de pigmentos de tipo carotenos, xantofilas y clorofilas deben ser consideradas como un claro indicador de degradación.

Las cianobacterias tienen la capacidad de competir eficientemente por espacio con corales por sus rápidas tasas de crecimiento, defensas contra la herbivoría y mecanismos alelopáticos., lo anterior, debe ser considerado como una limitante a los numerosos intentos de recuperación de arrecifes que se llevan a cabo hoy en día. Factores como la sobrepesca y remoción de herbívoros pueden contribuir, junto con el calentamiento global, a modificar la estructura y dinámica de estos ecosistemas.

## **RECOMENDACIONES**

Con el fin de lograr una mejor aproximación a la variación en el contenido de pigmentos de zooxanthellas asociadas a corales como resultado del contacto directo con cianobacterias, sería deseable poder establecer el experimento durante un tiempo mayor –al menos una semana-, evaluar un mayor número de especies de coral con niveles de tolerancia variables a contacto y poder contar con perfiles cromatográficos estándar de los pigmentos evaluados.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mi mamá, Ana Silvia Panqueva, por su incontenible amor y porque debido a ella, mis sueños y esperanzas nunca se han visto abatidas, porque siempre me ha enseñado que batallar es la mejor opción que existe en la vida. A Mónica Puyana, por sus inmensurables cualidades humanas, por decidir nuevamente ser mamá conmigo y porque más que mostrarme el camino hacia la excelencia académica, continuamente vive enseñándome como ser una mejor persona. A mi hermana Karol, por ser mi amiga, y mi compinche por saber

aprender las mejores cosas de ser joven y vivir siempre mostrándomelas A Julian Prato, por su desinteresada transmisión de conocimientos y sus enseñanzas de hermano mayor. A todo el grupo de Productos Naturales Marinos de la Universidad Nacional de Colombia, en especial al profesor Freddy Ramos y Lina Bayona por su indispensable ayuda en el análisis químico de las muestras y su acogimiento en el mundo del HPLC. A Nicolás Restrepo e Isabel Castellanos, por su gran colaboración, por sus brillantes ideas y creer como yo en el universo de la Bioprospección. A Rafael Vieira, Paola Pinzón y el personal del Oceanario de las Islas del Rosario por permitirnos usar las instalaciones del CEINER durante la fase de campo, por su incomparable colaboración y acogernos de la mejor manera y hacerse partícipes de nuestro trabajo. A Zamy, que más que un amigo siempre será mi hermano. A mis amigos Italo, Adriana, Liliana por estar conmigo siempre en el proceso de convertirse en Biólogos Marinos. A todas las demás personas que durante estos años me han mostrado su apoyo y su convicción en lo que hago.



## BIBLIOGRAFÍA

- Bhagooli, R., Hidaka, M. 2003. Comparison of stress susceptibility of *in hospite* and isolated zooxanthellae among five coral species. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 291: 181-197.
- Baumgartner, L., Reid, R., Dupraz, C., Decho, A., Buckely, D., Spear, J., Przekop, K., Visscher, P. 2006. Sulfate reducing bacteria in microbial mats: changing paradigms, new discoveries. *Sedimentary Geology*, 185: 131-145.
- Burja, A., Banaigs, B., Abou-Mansour, E., Burgess, J., Wright, P. 2001. Marine cyanobacteria, a prolific source of natural products. *Tetrahedron*, 57: 9347-9377.
- Cartaxana, P., Jesus, B., Brotas, V. 2003. Pheophorbide and pheophytin a-like pigments as useful markers for intertidal microphytobenthos grazing by *Hydrobia ulvae*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 58(2): 293-297.
- Chang, Z., Flatt, P., Gerwick, W., Nguyen, V., Willis, C., Sherman, D. 2002. The barbamide biosynthetic gene cluster: a novel marine cyanobacterial system of mixed polyketide synthase (PKS)-non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) origin involving an unusual trichloroleucyl starter unit. *Gene*, 296: 235-247.
- Díaz-Pulido G, Díaz-Ruiz M. 2003. Diversity of benthic marine algae of the Colombian Atlantic. *Biota Colombiana*, 4(2): 203-246.
- Falkowski, P., Jokiel, P., Kinzie, R. 1990. Irradiance and corals. En: DUBINSKY, Z. (ed.) *Coral Reefs*. 89-107 p. *Ecosystems of the World*. Elsevier Science Publishers.
- Hovarth, C., Melander, W., Molnar, I., Molnar, P. 1977. Enhancement of retention by ion-pair formation in Liquid Chromatography with Nonpolar Stationary Phases. *Anal. Chem*, 49(14): 2295-2305.
- Invemar 2009. Lineamientos para un Plan de Manejo de arrecifes coralinos del Área Marina Protegida Corales del Rosario, San Bernardo e Isla Fuerte en el contexto de Cambio Climático. Diseño e Implementación de un Programa de Adaptación en las áreas insulares del Caribe Continental Colombiano Proyecto INAP. Informe Técnico Final. Santa Marta. 91 pp.
- Kleppel, G., Dodge, R., Reese, C. 1989. Changes in pigmentation associated with the bleaching of stony corals. *Limnology and Oceanography*, 34(7): 1331-1335.
- Komárek, J., Anagnostidis, K. 2005. Cyanoprokaryota. 2. Teil/2nd Part: Oscillatoriales. En: Büdel, B., Krienitz, L., Gärtner, G., Schagerl, M. (Eds.), *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Vol. 19/2, Elsevier/Spektrum, Heidelberg, 759 pp.
- Kowaleska, G., Szymczak, M. 2001. Influence of selected abiotic factors on the decomposition of chlorophylls. *Oceanologia*, 43(3):315-328.
- Knowlton, N., Rohwer, F. 2003. Multispecies Microbial Mutualisms on Coral Reefs: The Host as a Habitat. *The American Naturalist*, (162): S51-S62.
- Kuffner I., Paul V. 2004. Effects of the benthic cyanobacterium *Lyngbya majuscula* on larval recruitment of the reef corals *Acropora surculosa* and *Pocillopora damicornis*. *Coral Reefs*, 23: 455-458.
- Levy, O., Dubinsky, Z., Achituv, Y. 2003. Photobehavior of stony corals: responses to light spectra and intensity. *The Journal of Experimental Biology*, 206: 4041-4049.
- Louda, J., Loitz, J., Rudnick, D., Baker, E. 2000. Early diagenetic alteration of chlorophyll-a and bacteriochlorophyll-a in a contemporaneous marl ecosystem; Florida Bay. *Organic Chemistry*, 31: 1561-1580.
- Marker, A.F.H. 1977. Some problems arising from the estimation of chlorophyll a and pheophytin a in methanol. *Limnology and Oceanography*, 22(3): 578-579.

- Nagle, D., Paul, V. 1998. Chemical defense of a marine cyanobacterial bloom. *Journal of Experimental Marine Biology*, 225: 29-38.
- O'Neil, J., Shaw, G., Dennison, W. 2000. Blooms of the toxic cyanobacteria *Lyngbya majuscula* in coastal Queensland waters. Abstracts 9th International Conference on Algal Blooms. Tasmania, 2000.
- Osborne, N., Webb, P., Shaw, G. 2001. The toxins of *Lyngbya majuscula* and their human and ecological health effects. *Environment International*, 27: 381-392.
- Paul, V., Cruz-Rivera, E., Thacker, R. 2001. Chemical mediation of macroalgal-herbivore interactions. 227-265 pp. En: McClintock, J.B. y Baker, B.J. (eds.) *Marine Chemical Ecology*. CRC Press, Boca Raton, Florida, EEUU. 610 p.
- Paul V., Thacker R., Banks, K., Golubic, S. 2005. Benthic cyanobacterial bloom impacts the reefs of South Florida (Broward County, USA). *Coral Reefs*, 24:693-697.
- Prato J. (Por publicar). Afloramientos de cianobacterias marinas bentónicas en San Andrés, Providencia y las Islas del Rosario (Caribe colombiano): Caracterización y evaluación de su posible papel ecológico. Trabajo de grado para optar al título de MSc en Microbiología. Universidad Nacional de Colombia.
- Puyana, M., Narvaez, G., Paz, A., Osorno, O., Duque, C. 2004. Pseudopterosin content variability of the purple sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae* at the islands of San Andres and Providence (SW Caribbean) 30(6): 1183-1201.
- Rasher, D. Y Hay, M. 2010. Chemically rich seaweeds poison corals when not controlled by herbivores. *PNAS*, 107: 9683-9688.
- Ritson-Williams, R., Paul V., Bonito, V. 2005. Marine benthic cyanobacteria overgrow coral reef organisms. *Coral Reefs*, 24: 629.
- River, G., Edmunds, P. 2001. Mechanisms of interaction between macroalgae and scleractinians on a coral reef in Jamaica. *Journal of Experimental Marine Biology*, 261: 159-172.
- Rowan, R., Knowlton, N., Baker, A., Jara, J. 1997. Landscape ecology of algal symbionts creates variation in episodes of coral bleaching. *Nature*, 388: 265-269.
- Sánchez, J.A, Alvarado, E.A., Gil, M., Charry, H., Arenas, O.L., Chasqui, L., García, R. 1999. Synchronous mass spawning of *Montastraea annularis* (Ellis y Solander) and *Montastraea faveolata* (Ellis y Solander) (Faviidae: Scleractinia) at Rosario Islands, Caribbean coast of Colombia. *Bull. Mar. Sci.*, 65 (3): 873-879.
- Sam, T.W. 1993. Toxicity testing using the brine shrimp: *Artemia salina*. En: Colegate, S. y Molineux, R.B. (eds). *Bioactive Natural Products: Detection, isolation and structural determination*. CRC Press Inc. Boca Raton, Fl. 528 pp.
- Sitachitta, N.; Williamson, R.T.; Gerwick, W.H. 2000. Yanucamides A and B, Two New Depsipeptides from an Assemblage of the Marine Cyanobacteria *Lyngbya majuscula* and *Schizothrix* Species. *J. Nat. Prod.*, 63: 197-200.
- Tan, L.T. 2007. Bioactive natural products from marine cyanobacteria for drug discovery *Phytochemistry*, 6): 954-979.
- Thacker, R.W, Becerro, M.A., Lumbang, W.A., Paul, V.J. 1998. Allelopathic Interactions between sponges on a Tropical Reef. *Ecology*, 79(5):1740-1750.
- Thacker R., Paul V. 2001. Are benthic cyanobacteria indicators of nutrient enrichment? Relationships between cyanobacterial abundance and environmental factors on the reef flats of Guam. *Bull. Mar. Sci.*, (69): 497-508.
- Titlyanov, E., Yakovleva, I., Titlyanova, T. 2007. Interaction between benthic algae (*Lyngbya bouillonii*, *Dictyota dichotoma*) and scleractinian coral *Porites lutea* in direct contact. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 342: 282-291.

- Venn, A., Wilson, M., Trapido-Rosenthal, H., Keely, B.Y., Douglas, A. 2006. The impact of coral bleaching on the pigment profile of the symbiotic alga, *Symbiodinium*. *Plant, Cell and Environment*, 29: 2133-2142.
- Yoo, H.D., Gerwick W.H. 1995. Curacins B and C, New antimitotic natural products from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *J. Nat. Prod.*, (58): 1961-1965.