

**RECOLECTA Y ANÁLISIS DE INFORMACIÓN PARA EL ESTUDIO DE COMUNIDADES
MICROBIOLÓGICAS Y SU ASOCIACIÓN CON CORALES**

GERMÁN DANIEL AGUILAR PEÑA

**UNIVERSIDAD DE BOGOTÁ JORGE TADEO LOZANO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA
ÁREA ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
PROGRAMA DE BIOLOGÍA MARINA
SANTA MARTA
2023**

**RECOLECTA Y ANÁLISIS DE INFORMACIÓN PARA EL ESTUDIO DE COMUNIDADES
MICROBIOLÓGICAS Y SU ASOCIACIÓN CON CORALES**

GERMÁN DANIEL AGUILAR PEÑA

Plan de Trabajo Profesionalizante para optar por el título de Biólogo Marino

Tutor

**JORDAN STEVEN RUIZ TOQUICA
Biólogo Marino, MSc. en Microbiología**

Profesor Monitor

**NATALIA RINCÓN DÍAZ
Bióloga, MSc. en Ciencias – Biología Marina**

**UNIVERSIDAD DE BOGOTÁ JORGE TADEO LOZANO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA
ÁREA ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
PROGRAMA DE BIOLOGÍA MARINA
SANTA MARTA
2023**

Contenido

RESUMEN	4
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN	4
MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	5
Peligro ambiental	5
Registro de variables ambientales	5
Bacterias del microbioma coralino	6
Fragmentos de coral	6
OBJETIVO GENERAL	7
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
METODOLOGÍA	7
Área de estudio	7
Recolecta de las muestras de agua y datos fisicoquímicos	8
Estimación de cobertura, frecuencia de interacciones y signos de deterioro	9
Análisis estadístico	9
Extracción y preparación del ADN total	9
Vivero de fragmentos de coral y aclimatación	10
RESULTADOS	10
Recolecta de las muestras de agua y datos fisicoquímicos	10
Estimación de cobertura, frecuencia de interacciones y signos de deterioro	11
Extracción y preparación del ADN total	12
Vivero de fragmentos de coral y aclimatación	14
DISCUSIÓN	18
CONCLUSIONES	19
BIBLIOGRAFÍA	19
ANEXOS	22

RESUMEN

La obtención de material biológico y genético es fundamental y la base para el estudio de las comunidades microbianas que se encuentran asociadas a los corales. Este trabajo se enfocó en recolectar y analizar información relacionada con las condiciones ambientales, biológicas y microbiológicas, tanto en campo como en condiciones experimentales, orientado en preparar el estudio de las comunidades microbianas a asociadas a corales en la bahía de Chengue e Inca Inca, Santa Marta, Magdalena. Así pues, se registraron datos de temperatura, salinidad, concentración de oxígeno y pH, provenientes de los sitios de muestreo. Además, se determinó la cobertura, frecuencia de interacciones y signos de deterioro dentro de las formaciones arrecifales. Asimismo, se extrajo ADN total microbiano a partir de muestras de tejido y mucus de los corales recolectados durante la época seca de 2022-2023 y la lluviosa de 2022. Por último, se examinó el estado de un vivero de fragmentos de coral, recolectando información sobre parámetros fisicoquímicos y condiciones de aclimatación, con el fin de preparar los fragmentos para experimentos posteriores. La información acá presentada sirve de base para la toma de decisiones a futuro y contribuye al desarrollo de estudios que permitan revelar la respuesta del microbioma asociado a los corales bajo diferentes condiciones.

ABSTRACT

Obtaining biological and genetic material is fundamental and the basis for the study of microbial communities that are associated with corals. This work focused on collecting and analyzing information related to environmental, biological and microbiological conditions, both in the field and in experimental conditions, aimed at preparing the study of microbial communities associated with corals in the bay of Chengue and Inca Inca, Santa Marta, Magdalena. Thus, temperature, salinity, oxygen concentration and pH data were recorded from the sampling sites. In addition, the coverage, frequency of interactions and signs of deterioration within the reef formations were determined. Total microbial DNA was also extracted from tissue and mucus samples from corals collected during the 2022-2023 dry season and the 2022 rainy season. Finally, the state of a coral fragment nursery was examined, collecting information on physicochemical parameters and acclimatization conditions, in order to prepare the fragments for further experiments. The information presented here serves as a basis for future decision-making and contributes to the development of studies that reveal the response of the microbiome associated with corals under different conditions.

INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN

Los arrecifes coralinos son sistemas complejos que cuentan con una alta productividad, traducida en bienes y servicios para las poblaciones aledañas (Villamizar, 2021). Sin embargo, están rodeados de factores que amenazan su salud y prevalencia en el futuro. Que abarcan desde actividades humanas, como contaminación de aguas fluviales, actividades turísticas y pesca destructiva, hasta el blanqueamiento coralino causado por el aumento de la temperatura del mar (Westmacott, Teleki, Wells, & West, 2000). De ahí surge la búsqueda de mecanismos que ayuden a entender como ocurre el cambio y lograr mitigar los efectos adversos provocados.

Los corales se encuentran asociados con comunidades bacterianas, las cuales se cree que juegan un papel importante en la salud de estos, relativamente desconocido (Bourne & Munn, 2005). Se ha demostrado que las bacterias que se encuentran asociadas a los corales se diferencian de las que están presentes en el agua de mar circundante, y están relacionadas

filogenéticamente entre especies de coral. (Ritchie y Smith, 2004; Barott et al., 2011). Por ende, un cambio en la composición de dichas comunidades puede incidir en la susceptibilidad de enfermedades.

El presente informe se centró en el análisis de material biológico y genético con el fin de justificar los métodos por los cuales es posible analizar los microbiomas coralinos, su interacción y el papel que juegan en la restauración de arrecifes de coral afectados. Se observó cualitativa y cuantitativamente las muestras de ADN proveniente tres épocas climáticas distintas, en dos años diferentes. Así mismo, se estableció un vivero de fragmentos de coral con el fin de instaurar la base para otros la realización de estudios *a posteriori*.

MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

Peligro ambiental

La constante exposición a factores estresantes provocados por factores antropogénicos y variaciones ambientales amenazan la supervivencia de los corales a nivel mundial. Se ha estudiado la expulsión del carbono orgánico en cantidades considerables por parte de los corales (Wild, Niggli, Naumann y Hass, 2010) y la influencia de la temperatura en la composición (Lee, Davy, Tang y Kench, 2016), provocando el cambio en las comunidades microbianas que allí se encuentren. En un estudio se analiza el efecto de las descargas continentales en los ensamblajes microbianos, comparando sitios contaminados con agroquímicos y sitios no contaminados, resultando en la presencia de diferentes ensamblajes (McDevitt, Baum, Garren y Vega, 2017). Estos acontecimientos revelan la gravedad y el amplio espectro de amenazas a los que son susceptibles los corales.

Otro aspecto son las interacciones biológicas que ocurren dentro del arrecife, que influyen en la salud y desarrollo de los corales. El espacio físico, indispensable para la fijación del coral, es un recurso limitado en un lugar que, en general, es escaso, y se disputa contra diferentes organismos; como esponjas, otros corales, organismos invertebrados y algas. Esta última relación es la más frecuente y la que juega un papel fundamental en procesos de degradación arrecifal, donde las algas aprovechan las perturbaciones que sufren los corales, y colonizan sustrato abiótico, como también sustrato enfermo o muerto (López, Flórez y Quan-Young, 2020).

Los procesos de competencia requieren energía, la cual puede verse limitada en procesos indispensables como la reproducción, lucha contra enfermedades y el crecimiento. La incidencia de las enfermedades coralinas causadas por agentes microbianos disminuye la cobertura del coral (Vega *et al.*, 2008). Actualmente se cuenta con numerosos estudios sobre la cobertura coralina en diferentes sectores del Caribe, en su mayoría se evidencia la reducción de la cobertura viva de coral, sugiriendo un patrón de degeneración y declive (Gardner et al., 2003). De ahí radica la importancia del entendimiento y capacidad de evaluar y reducir riesgos, así como el esfuerzo para identificar patógenos aun desconocidos y sus formas de transmisión entre corales y su método de propagación (Zambrano y Villalpando, 2020).

Registro de variables ambientales

La importancia del muestreo ambiental radica en que proporciona información de las variables ambientales de un determinado sitio. Permite conocer procesos que definen y moldean variables bióticas, así como estandarizar condiciones, y visualizar las respuestas que generan los cambios de las fluctuaciones normales. Dicho entendimiento juega un papel importante

e influye en la toma de decisiones de temas fundamentales, como lo es la intervención enfocada en la salud de los arrecifes de coral.

Bacterias del microbioma coralino

Los corales incorporan poblaciones de diferentes microorganismos, como algas, bacterias y arqueas, con relaciones mutualistas, beneficios que van desde fotosíntesis, fijación de nitrógeno, hasta el suministro de nutrientes y protección contra enfermedades u estresores (Calixto *et al.*, 2020). El microbioma coralino está constantemente cambiando, es dependiente del tiempo y espacio, del nicho y estresores ambientales, que pueden inducir cambios (van Oppen y Blackall, 2019). Las comunidades bacterianas parten de una especialización funcional (Kimes, 2010) y se han encontrado mayoritariamente en el tejido y el mucus del coral (Garren y Azam, 2010; Pollock *et al.*, 2018).

Comprender los factores atribuibles a las enfermedades, el declive y la muerte de corales, ha incrementado el interés científico y de ámbito global, ya que la comprensión de lo acontecido incentiva la búsqueda de estrategias para la protección y conservación (Ocampo, Rodríguez y Becerril, 2021), y en este caso, la caracterización de los microorganismos presentes en los corales.

En ese sentido, las tecnologías emergentes de secuenciación del ADN han promovido el estudio de dichas comunidades y su relación con sus ambientes específicos. Es de gran valor conocer, detallar y agrupar las comunidades microbianas asociadas a los corales, la importancia subyace en que más del 99% de las bacterias marinas no se ha logrado aislar en técnicas de cultivo tradicionales (Ramos *et al.*, 2018). Así que la aplicación de técnicas genómicas que permite la identificación tiene como resultado la generación de información útil para la diversidad y clasificación taxonómica (Valenzuela *et al.*, 2015; Weber, DeForce y Apprill, 2017).

Dicho conocimiento conlleva a la creación de propuestas novedosas, como lo es la producción y uso de probióticos, que, por medio de bacterias mutualistas asociadas al coral, se traten enfermedades infecciosas, combatir organismos patógenos y producir compuestos antimicrobianos (Teplitski y Ritchie, 2009). Asociado a lo anterior, Reshef *et al.* (2006) propone la hipótesis de “la existencia de una relación dinámica entre microorganismos simbióticos y las condiciones ambientales provoca la selección del holobionte de coral más ventajoso”. Todo esto enfocado a la optimización de los procesos adaptativos del coral a factores estresantes, en una escala de tiempo más corta de lo que ocurriría naturalmente (Herrera, 2022).

Fragmentos de coral

Los métodos de restauración coralina pueden ser una estrategia para recuperación y conservación de las funciones ecológicas de los arrecifes. Una de estas estrategias es la “jardinería” que utiliza metodología de acuicultura para establecer viveros protegidos *in situ* o *ex situ*, con miras a repoblación, estudios experimentales o para la industria de acuarios marinos (Forsman, Rinkevich y Hunter, 2006). La presencia de un vivero radica principalmente en la restauración de ecosistemas de arrecife coralinos, sometidos a afectaciones constantes que limitan la supervivencia.

Los altos costos monetarios de tener un vivero en tierra, en comparación con el medio natural (Edwards *et al.*, 2010) se equilibra a la hora de poder administrar el vivero, es decir, las condiciones del laboratorio permiten regular las variables clave, de tipo ambiental y biológico, que de otra manera no fuesen posible controlar. La tenencia de fragmentos de corales

proporciona una fuente sostenible y en constante expansión de corales para la restauración ecológica, reduciendo la necesidad de recolecta de poblaciones silvestres (Lirman y Schopmeyer, 2016) y permite aspectos relacionados con la reproducción sexual, y la cría de larvas de coral, disponiendo de una reserva genética en caso de muerte por asfixia u otros fenómenos naturales (Rodríguez *et al.*, 2022), y no dejando de lado la educación ambiental que se adquiere cuando se incentiva el cuidado de estos corales.

Un periodo de aclimatación influye directamente en la supervivencia de los fragmentos. Los ejemplares se encuentran bajo estrés al momento de seccionar la colonia en el medio natural y cuando son transportados a su centro de cría. La química del agua, idealmente, debería de replicar la que se encuentra en la naturaleza donde se encuentran los corales (Borneman, 2008). Factores principales comúnmente son la aireación, sedimentación, biota asociada y las variables fisicoquímicas como la temperatura, luz, salinidad, pH, nitritos, fosfatos, entre otros. Las consecuencias de no llevar una correcta aclimatación son la afectación de los corales, el estrés provoca la expulsión de las zooxantelas, afectando los resultados posteriores enfocados en dicho tema.

OBJETIVO GENERAL

Probar la obtención de material e información biológica y genética para el estudio de las comunidades microbianas asociadas a corales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Registrar el comportamiento de los datos ambientales y biológicos recolectados en los sitios de muestreo.
2. Examinar y preparar el ADN total a partir de muestras de tejido y mucus del coral.
3. Examinar y monitorear el estado de un vivero de fragmentos de coral durante el periodo de aclimatación.

METODOLOGÍA

Área de estudio

La recolecta de los datos y material biológico se ha llevado a cabo durante las épocas seca de 2022-2023 y lluviosa 2022 en dos sitios contrastantes ubicados en la Bahía de Santa Marta, departamento del Magdalena (Figura 1). El sitio 1 se encuentra localizado en la bahía de Chengue (11°19'30"N 74°07'41"O), dentro del Parque Nacional Natural Tayrona, área nacional protegida. El sitio 2, está situado en playa Inca Inca (11°12'58"N 74°14'06"O), fuera del sistema de áreas protegidas e impactado por las actividades turísticas, urbanas y comerciales de la zona. La información y muestras biológicas relacionadas con los muestreos de 2022 fueron recolectadas en un estudio previo (Ruiz-Toquica *et al.* en preparación), mientras que la toma de datos ambientales y la recolecta de muestras de la época seca de 2023 se llevaron a cabo en el presente trabajo.

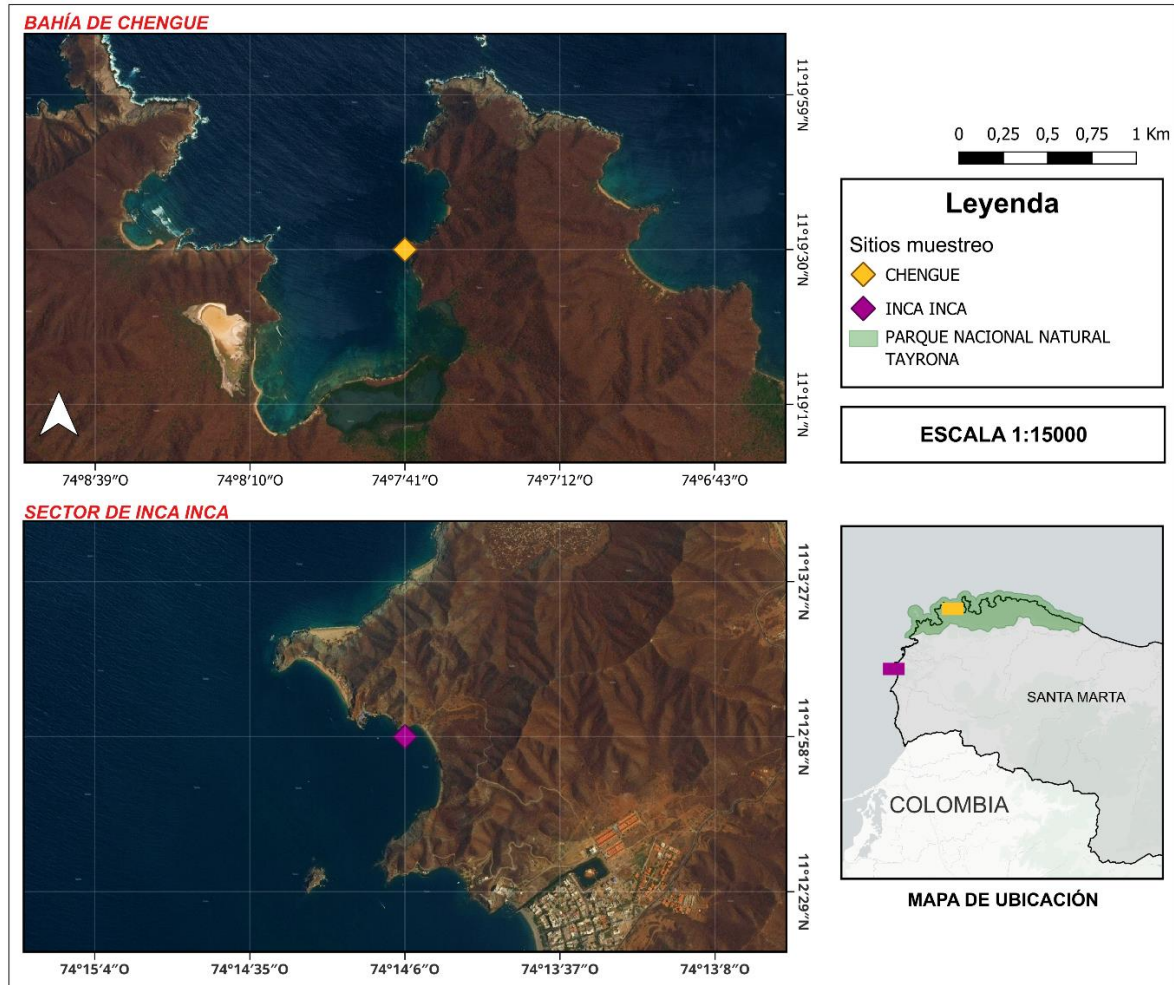


Figura 1. Mapa del área de estudio en la bahía de Santa Marta. Los rombos representan los sitios de muestreo. Amarillo: Bahía de Chengue, ubicado dentro del PNN Tayrona (verde); morado: sector de Inca Inca.

Recolecta de las muestras de agua y datos fisicoquímicos

Las muestras se recolectaron gracias al permiso individual “Permisos individuales y marco para la recolección de especímenes de especies silvestres de la diversidad biológica con fines de investigación científica no comercial” que se obtuvo a través de la Resolución 191 del 16 de diciembre de 2021 expediente PIR 007-2021. El Permiso Marco fue expedido por la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales (ANLA) de Colombia a través de la Resolución 1715 del 30 de diciembre de 2015 y la actualización de la Instrucción Normativa No. 00213 del 28 de enero de 2021.

En cada sitio, se tomaron muestras de agua por triplicado, a una profundidad entre 6-8 m, con una botella Van Dorn, que posteriormente fueron almacenadas en botellas estériles. Dichas muestras se dispusieron de la siguiente manera: aproximadamente 1 L se dispuso para el análisis de ADN; cerca de 100 mL se almacenaron para experimentos asociados al proyecto MICROBIOMA CORALES (recuento de microorganismos); el agua restante se utilizó para la toma *in situ* de la temperatura, salinidad, pH y oxígeno disuelto. Todas las muestras de agua se mantuvieron a 4 °C hasta el retorno a las instalaciones de la Universidad Jorge Tadeo Lozano sede Santa Marta.

Durante la medición de las variables ambientales se utilizaron sondas WTW™ ProfiLine™ con medidor de conductividad portátil Cond 3110 para medir la salinidad y temperatura. Para el pH se usó la sonda el medidor portátil pH 3210, y para el oxígeno disuelto el medidor de portátil Oxi 3310.

Estimación de cobertura, frecuencia de interacciones y signos de deterioro

Simultáneamente, se determinó la cobertura, frecuencia de interacciones y signos de deterioro de un conjunto de imágenes de foto-cuadrantes tomadas por Ruiz-Toquica *et al.* (en preparación) en las formaciones arrecifales dominadas por el coral *Madracis auretenra* durante la época lluviosa de 2022.

Se estimó el porcentaje de cobertura de 60 cuadrantes (0,25 m²) para un total de 15 m² en cada sitio. La composición de la comunidad bentónica se determinó por medio de 13 categorías, siendo los cuatro grupos principales: coral duro, coral blando, macroalgas y sustrato abiótico. El grupo de coral duro se dividió en las categorías *Madracis auretenra* y otros corales duros. Las macroalgas se dividieron en carnosas, filamentosas/cianobacterias y coralinas costrosas-CCA. La categoría de sustrato abiótico se definió en sedimentos y coral muerto y vacío. Los grupos restantes aluden a hidrocorales y esponjas. El porcentaje de cada categoría de comunidad bentónica se estimó a partir de 30 puntos aleatorios utilizando el programa Photo Quad v1.4.

Las interacciones en los parches de *M. auretenra* se estimó a través de las frecuencias de contacto registradas. Cualquier rama del coral que tocara físicamente otros corales duros/blandos, macroalgas, esponjas, u otros invertebrados. La frecuencia de interacción de los grupos funcionales se determinó contando el número de cuadrículas donde se producía el contacto sobre las cuadrículas totales en cada cuadrado. Los datos se expresaron en porcentaje.

Adicionalmente, se registró el estado de salud de los parches de *M. auretenra* y la presencia de signos de deterioro. La frecuencia de blanqueamiento, palidez, mortalidad parcial, volcamiento, sedimentación y mordeduras se estimaron por la manifestación de dicha condición en cada cuadrado, y fue expresado a porcentaje.

Análisis estadístico

Los datos se expresaron como promedio \pm error estándar como medidas de tendencia central y de dispersión respectivamente. Además, bajo el programa PRIMER 7, los datos se transformaron con Log (x + 1) con el fin de realizar un análisis multivariante permutado de la varianza (PERMANOVA), con distancia euclidiana, permutaciones no restringidas, error tipo III y 999 permutaciones aleatorias, para comparar la similitud entre los sitios muestreados.

Extracción y preparación del ADN total

Con el fin de continuar con el estudio de las comunidades microbianas asociadas a los corales, se obtuvo ADN total a partir de muestras de mucus y tejido del coral *M. auretenra* y del agua de mar, para ambos sitios. Las muestras biológicas, es decir, los fragmentos del coral fueron recolectados y procesadas por triplicado por Ruiz-Toquica *et al.* (en preparación) durante los muestreos de la época seca (marzo) y lluviosa (octubre) de 2022 y seca (abril) de 2023, y se mantuvieron preservadas a -20 °C hasta su procesamiento. Las muestras se categorizaron con base en su procedencia o condición: época de muestreo, localidad, presencia o ausencia de alga en el tejido coralino, coral sano o enfermo y tipo de muestre (mucus o tejido). De esta manera, el ADN total de estas muestras se extrajo a través del kit DNeasy® PowerSoil Pro-kit de QIAGEN™ siguiendo las instrucciones del fabricante. Se

extrajo el ADN de un total de 161 muestras, luego, las muestras triplicadas de cada condición fueron mezcladas para un total de 54 muestras de ADN total. El ADN se verificó en geles de agarosa al 0,8%, utilizando el Loading Buffer II Ambion™ para cargar las muestras en los pozos del gel. Las lecturas se realizaron en el equipo Biorad Gel Doc Imaging System bajo luz UV, y se determinó la presencia o ausencia de ADN, así como su estado: poco, degradado o en perfecto estado.

Además, se evaluó la concentración y calidad (260/280 y 260/230) por medio de espectrofotometría a través del NanoDrop Multiskan™ FC Microplate Photometer. Se reportaron medidas de tendencia central y de dispersión. Finalmente, se evaluaron la relación 260/280 y la relación 260/230 como prueba secundaria de pureza de las muestras obtenidas. El ADN total es adecuado para aplicaciones de PCR y secuenciación, y se preservó en agua grado molecular estéril a -20 °C hasta su procesamiento.

Vivero de fragmentos de coral y aclimatación

Por medio de buceo autónomo se recolectaron fragmentos de coral de las especies *Porites sp* en la bahía de Chengue. Los corales fueron cortados desde su base con ayuda de una pinza y depositados en bolsas ziploc estériles. En la superficie, los corales se mantuvieron con agua de mar tomada del sitio y dentro de un contenedor cerrado. Los fragmentos se transportaron lo más pronto posible a las instalaciones de la Universidad, se lavaron con agua de mar filtrada, se removieron organismos adheridos, y se cortaron en ramas de ~ 3 cm. Las ramas limpias se adhirieron a una superficie plana en forma de 'pin' o galleta circular hechas con restos de esqueleto de coral, con ayuda de masilla epóxica de uso industrial. Finalmente, se dispusieron en un sistema de recirculación de agua de mar consolidado por Ruiz-Toquica *et al.* (en preparación).

Este sistema soporta dos canaletas, una encima de la otra, las cuales contienen los fragmentos de coral, donde el agua de mar circula por luz UV, un filtro mecánico y un filtro biológico. Además, cuenta con aireación constante y energía lumínica para el sostenimiento de los corales.

La limpieza y mantenimiento de los fragmentos de coral se efectuó cada ocho días, con el fin de remover las algas adheridas a las galletas y fragmentos. Es importante resaltar que el agua de mar debe de presentar temperatura y salinidad similar al agua que contiene los fragmentos, ya que un cambio brusco en dichas variables puede afectar la estresar los fragmentos de coral.

Para el buen funcionamiento del vivero, se llevó a cabo un seguimiento riguroso, recopilando lecturas de temperatura y salinidad del agua todos los días, en la mañana y en la tarde. Así mismo, parámetros como nitritos, fosfatos y KH, usando el kit de colorimetría API®, y pH fueron tomados una vez a la semana. Se tuvo en cuenta la tasa de sobrevivencia y signos de deterioro con el fin de detectar anomalías.

RESULTADOS

Recolecta de las muestras de agua y datos fisicoquímicos

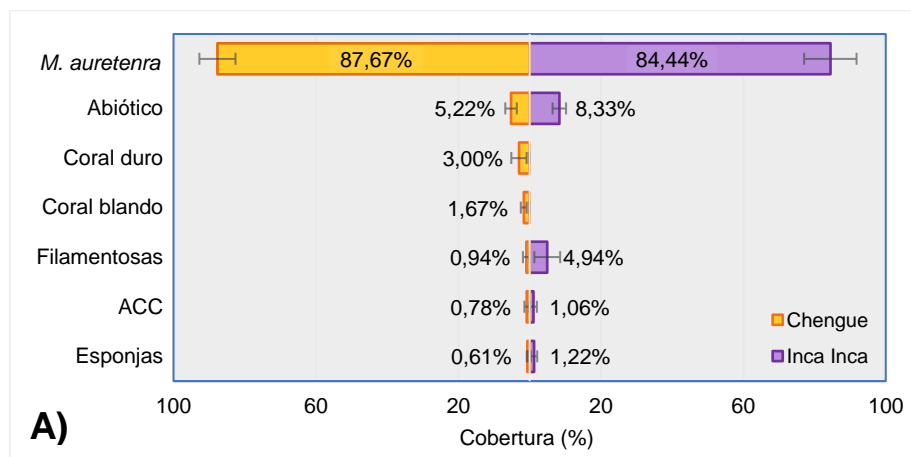
En la tabla 1 se presentan los valores de las variables ambientales registradas en los dos sitios muestreados. Los valores de la temperatura, salinidad y pH presentan valores similares entre los dos sitios. La saturación de oxígeno es mayor en Inca Inca en comparación con su contraparte. Las variables fisicoquímicas no variaron significativamente entre los sitios (PERMANOVA; *Pseudo-F* = 41,53; *d.f* = 5; *P* > 0,05; Anexo 1).

Tabla 1. Variables ambientales evaluadas en los sitios muestreados.

Variable ambiental	Chengue	Inca Inca
Temperatura (°C)	26,08 ± 0,17	26,33 ± 0,07
Salinidad	35,56 ± 0,14	35,43 ± 0,09
pH	8,12 ± 0,00	8,13 ± 0,16
Saturación oxígeno (%)	73,50 ± 0,00	85,90 ± 1,59
Concentración oxígeno (mg/L)	5,96 ± 0,06	6,92 ± 0,17

Estimación de cobertura, frecuencia de interacciones y signos de deterioro

Se encontró una mayor cobertura del parche coralino de *M. auretenra* ubicado en Chengue (Figura 2A), que consta del 87,67% en comparación con el 84,44% de cobertura del parche en Inca Inca. En segundo lugar, se encuentra el componente abiótico, que, en ambos sitios, fue compuesto mayormente por coral muerto. Se destaca una mayor cuantía de componentes en Chengue, esto basado en la presencia de las categorías: coral duro, coral blando y *Millepora spp.* ausentes en Inca Inca. Seguidamente, la estimación de frecuencia de contacto (Figura 2B) registró un mayor porcentaje similar en ambos sitios en la categoría 'sin contacto'. Simultáneamente, se resalta las siguientes condiciones en Inca Inca: un mayor porcentaje de cobertura de algas filamentosas/cianobacterias, una alta carga de material particulado, evidente en el registro fotográfico, y una mayor proporción de signos de deterioro (Figura 2C), siendo el volcamiento el más frecuente (75%), seguido de palidez y blanquimiento del coral, con 45 y 38,3% respectivamente. Finalmente, se subraya la ausencia de macroalgas carnosas.



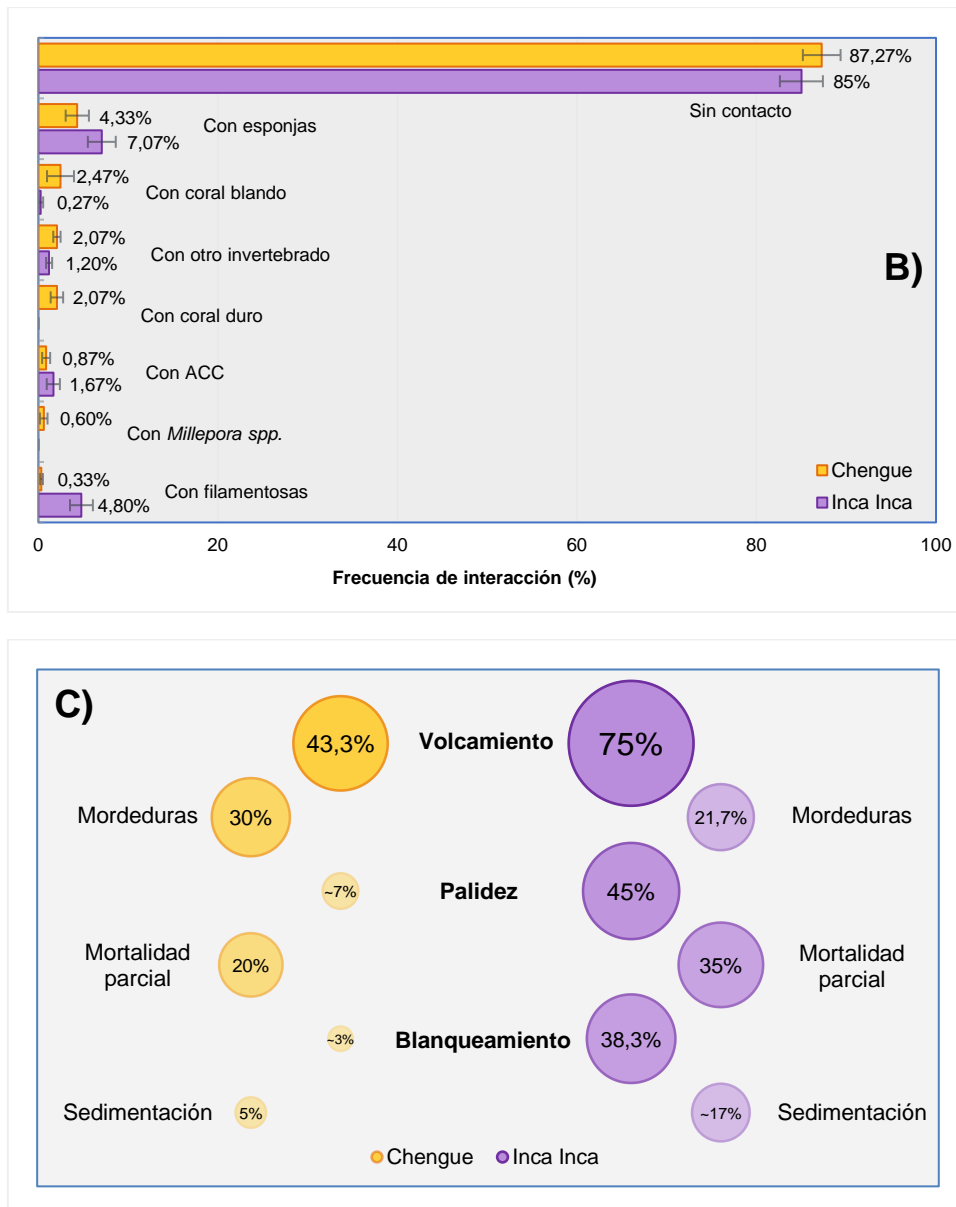


Figura 2. Estimación del estado de los parches del coral *M. auretenra* ubicados en los dos sitios muestreados. A) porcentaje de cobertura (promedio \pm error estándar) de la composición del bentos arrecifal. B) Frecuencia de contacto (promedio \pm error estándar) de *M. auretenra* con otras categorías arrecifales. C) Frecuencia (%) de signos de deterioro en los parches de *M. auretenra*. **ACC**=algas costrosas coralinas.

Extracción y preparación del ADN total

Se logró extraer aproximadamente el 84% de las muestras. Según el ejemplo de la figura 3, se clasificaron de la siguiente manera: el 54% de las muestras fue 'óptimo', 15% presentaba 'poco ADN', 11% era de 'bajo peso molecular' y 4% estaba 'degradado'. El 16% restante no resultó ser positivo, por lo que se clasificó como 'ausente', es decir, no había presencia de ADN.

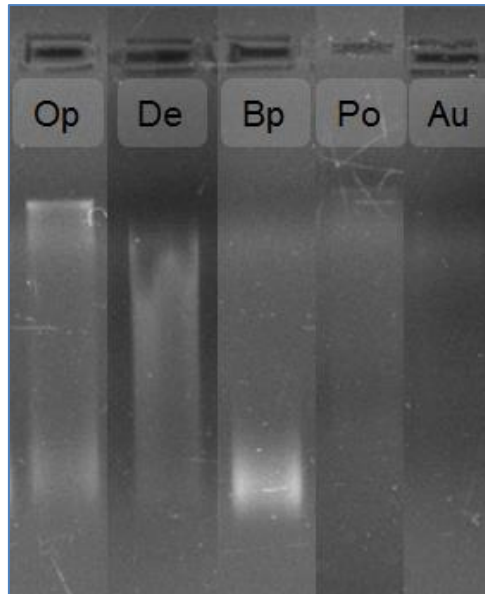


Figura 3. Ejemplo de clasificación de la integridad del ADN en la prueba de electroforesis en gel de agarosa. **Op**=Óptimo, **De**=Degradado, **Bp**=Bajo peso molecular, **Po**=Poco, **Au**=Ausente.

La comparación de extracción de ADN total según la condición (Figura 4) presentó una mayor extracción en las muestras provenientes del mucus del coral (95,8%, n = 24) en comparación con las muestras provenientes del tejido (75%, n = 24). Para el caso del agua de mar filtrada, la extracción fue de un 66,6% (n = 6). Para el año 2022, se resalta un mayor porcentaje de extracción en la época seca (83%, n = 18) en comparación con la época lluviosa de ese mismo año (66%, n = 18). De igual forma, la época seca del año 2023 se obtuvo el 100% de extracción (n = 18), resaltando que dichas muestras se tomaron recientemente, por lo que no llevaban un proceso prolongado de criopreservación, en contraste con las muestras del año 2022.

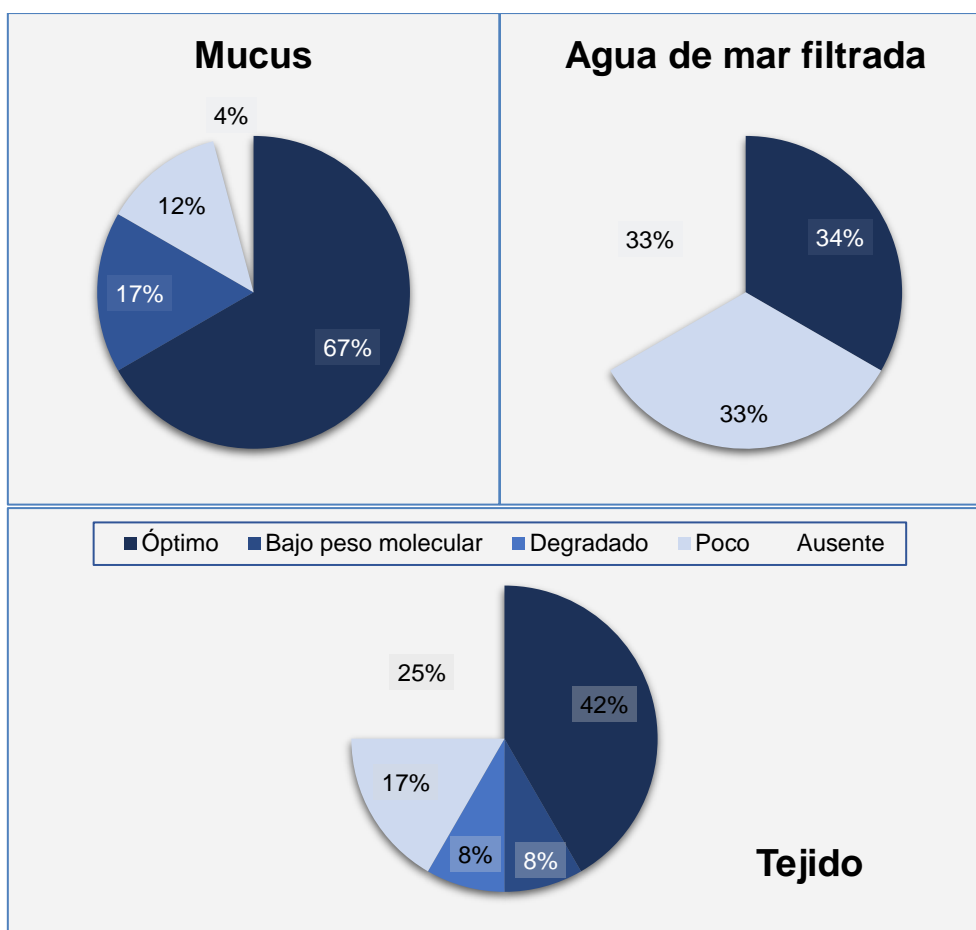


Figura 4. Porcentaje de extracción de ADN total dependiendo de la condición de procedencia.

La concentración de ADN total presentó una variabilidad representada en un rango de variación -9×10^{-3} ng/ μ L y 0,14 ng/ μ L. La relación 260/280 (Tabla 2) presentó un rango de variación -6 hasta 13 nm. Para la relación 260/230 evidenció un rango entre -0,11 y 1,14 nm. Según los rangos de "pureza" aceptable para el ADN, alrededor de 1,8 y 2,1, aproximadamente el 46% de las muestras entra dentro de dicho rango.

Tabla 2. Estadísticos descriptivos de la cuantificación y pureza de las muestras de ADN.

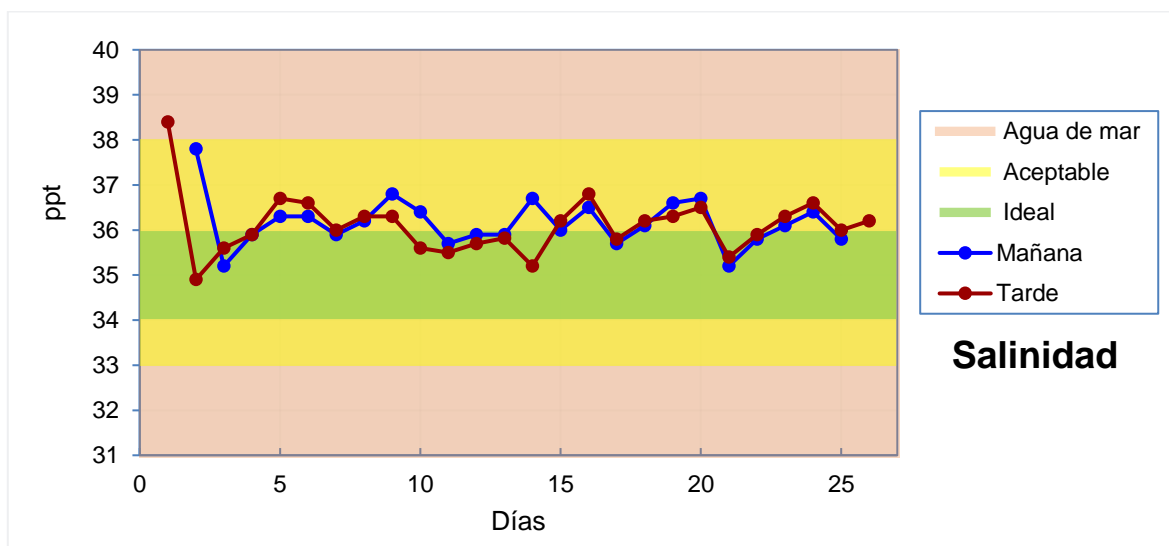
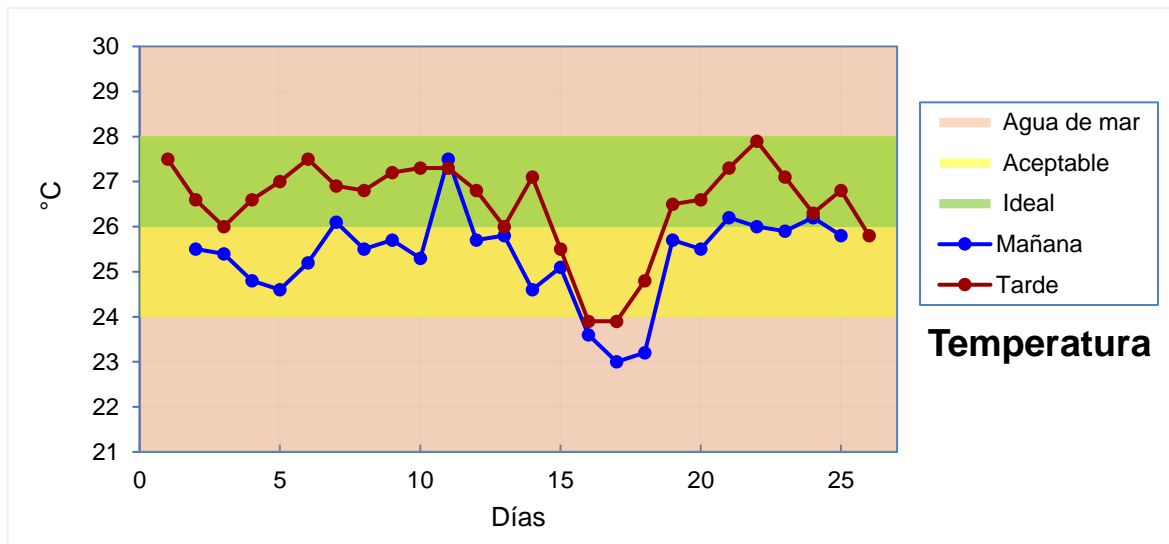
	Media	Error estándar	Mínimo	Máximo
Concentración de ADN (ng/ μ L)	0,0267	\pm 0,003	-0,009	0,144
260/280 (nm)	2,152	\pm 0,293	-5	13
260/230 (nm)	0,26	\pm 0,036	-0,113	1,145

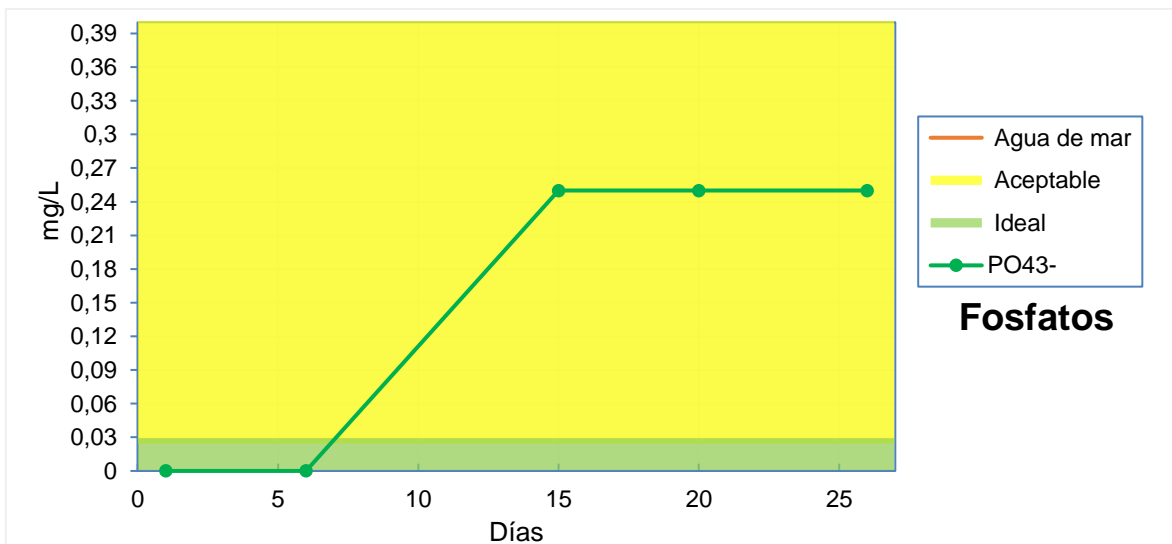
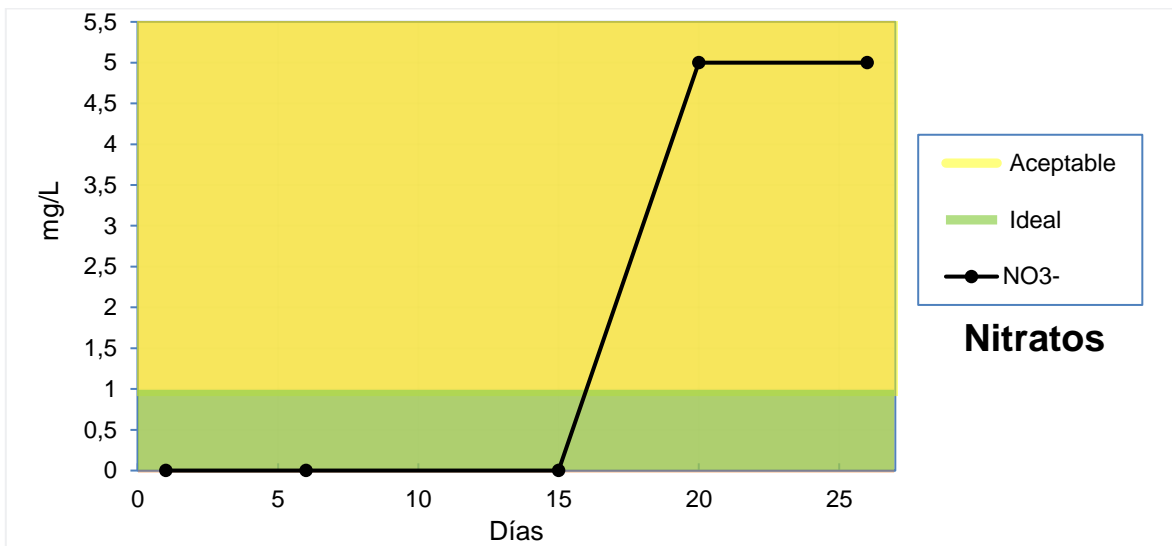
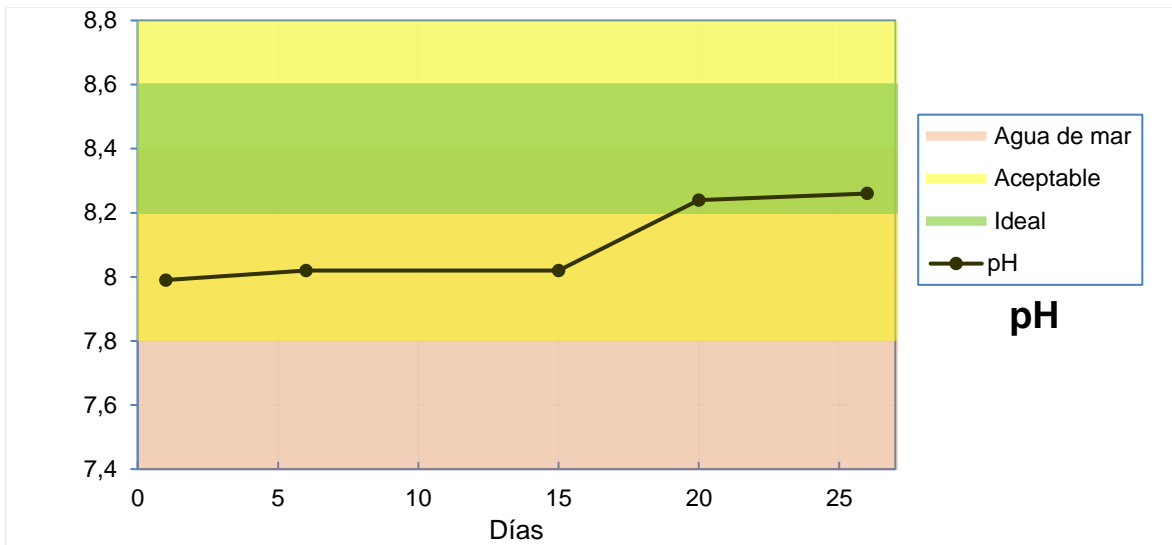
Vivero de fragmentos de coral y aclimatación

El seguimiento del vivero tuvo una duración de aproximadamente un mes, con 36 fragmentos de coral de la especie *Porites sp.* Respecto a las variables registradas (Figura 5), se tomó como base el trabajo de Borneman (2008), que menciona los valores recomendables para un vivero de coral. En primer lugar, la temperatura media fue de 25,32 °C \pm 0,19 en la mañana y 26,5 °C \pm 0,2 en la tarde. Con mínimos de 23 °C y máximos de 27,9 °C, acontecidos en la mañana y la tarde respectivamente. En su mayoría, los datos se encuentran dentro del rango

'aceptable', con una fracción que sale de dicho rango. Esto ocurrió debido a inconvenientes en el laboratorio, donde el aire acondicionado falló. Asociado a esta franja, que se halla dentro de los 15 a 20 días, se evidencia signos de estrés, mencionados posteriormente.

La salinidad registró un promedio de 36,13 ppt \pm 0,08 y se mantuvo dentro del rango aceptable-ideal, al igual que el pH, que registró un promedio de 8,12 \pm 0,13. En paralelo, los nitritos y fosfatos, em principio, se registraron valores de cero, sin embargo, el uso de agua de recambio no adecuada provocó el aumento de estos. Esto se sumó a la afectación en los fragmentos de coral.





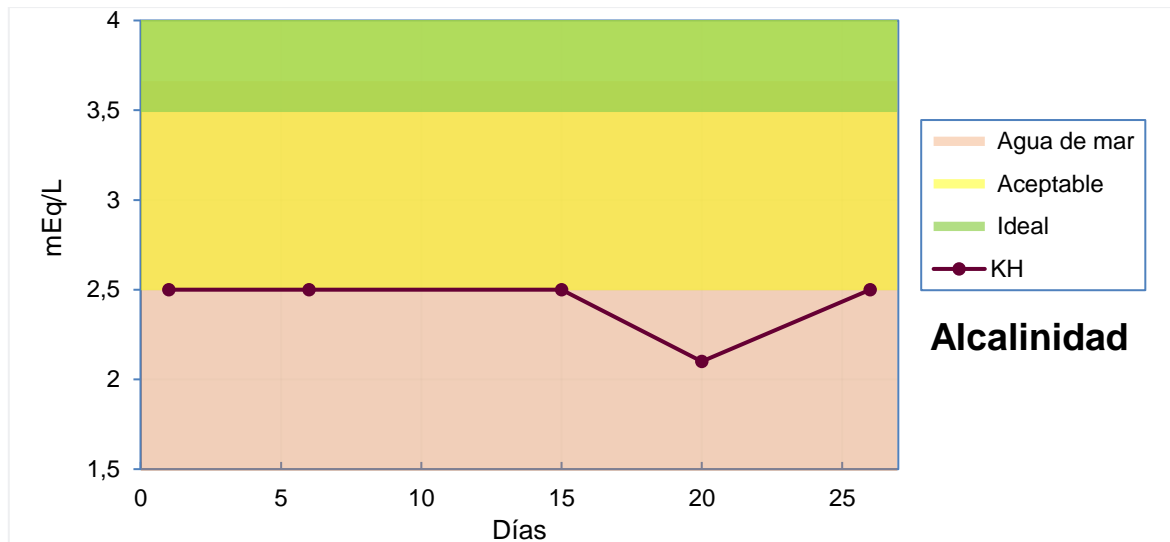


Figura 5. Recopilación de los parámetros estudiados en el vivero de fragmentos de coral. Lecturas de temperatura, salinidad, nitritos, fosfatos y KH. En verde se refleja la franja de valor que se considera ‘ideal’, en amarillo el valor de ‘aceptable’, y en rojo el valor del ‘agua de mar’.

Se detectaron signos de estrés en los fragmentos de coral (Figura 6). Principalmente, iniciaba con la retracción de los pólipos, y como fase final, la aparición de mucus alrededor de todo el coral. Esto se debe a dos causas: Primeramente, el aumento de nitritos (5-10 mg/L) y fosfatos (0,25 mg/L) en el agua, los cuales inicialmente presentaban valores de cero. Seguido del mal funcionamiento de los equipos de aire acondicionado en el laboratorio, los cuales acusaron una variación brusca en la temperatura (alrededor de 3 °C de diferencia) en un periodo corto de tiempo. Como resultado de la presencia y persistencia de estos signos de estrés, se procedió a la aplicación de un filtro líquido biológico (Stability®), que contiene una mezcla específica de bacterias que faciliten la eliminación de desechos orgánicos, nitrito, nitrato y amoníaco, siendo esencial en el rápido tratamiento de los desechos presentes en el agua.

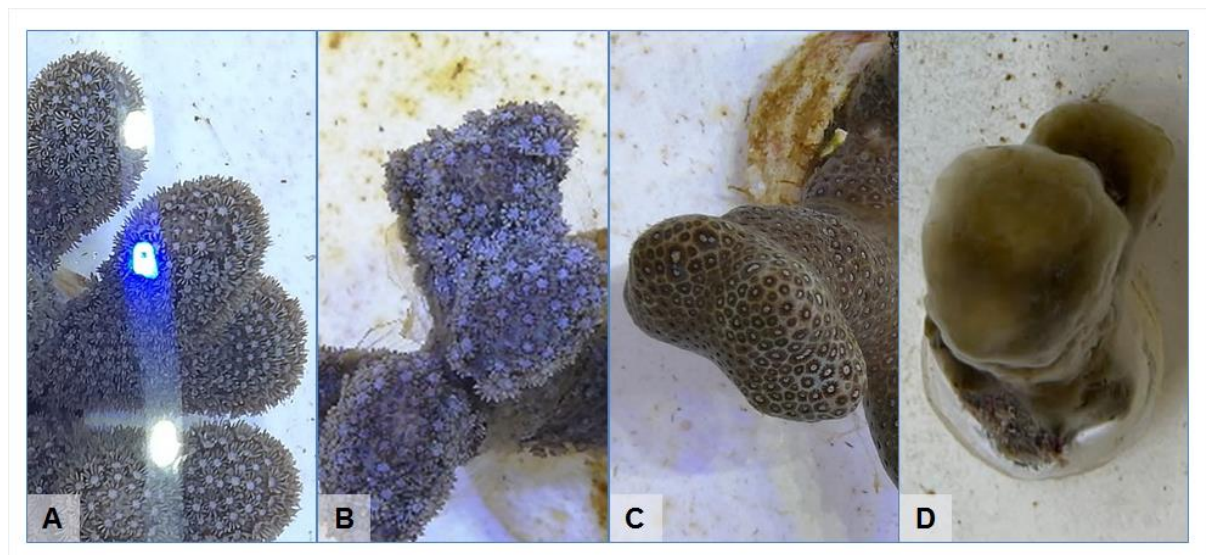


Figura 6. Manifestaciones del estrés en los fragmentos de coral. A) Fragmento de coral en buen estado. B) Retracción parcial de los pólipos. C) Retracción total de los pólipos y oscurecimiento en el color. D) Aparición de mucus alrededor del fragmento.

El crecimiento periódico de algas sobre las galletas, alrededor de los fragmentos y en la superficie de las canaletas, se contuvo con el lavado y cepillado riguroso (Figura 7). Dichas algas provienen de medio natural, las cuales son difíciles de erradicar. Aunque se presentaron anomalías que afectaron los fragmentos de coral, se cuenta con el 100% de supervivencia al finalizar el periodo de seguimiento. No se presentaron signos de blanqueamiento, a pesar del estrés generado por las ocurrencias presentados.

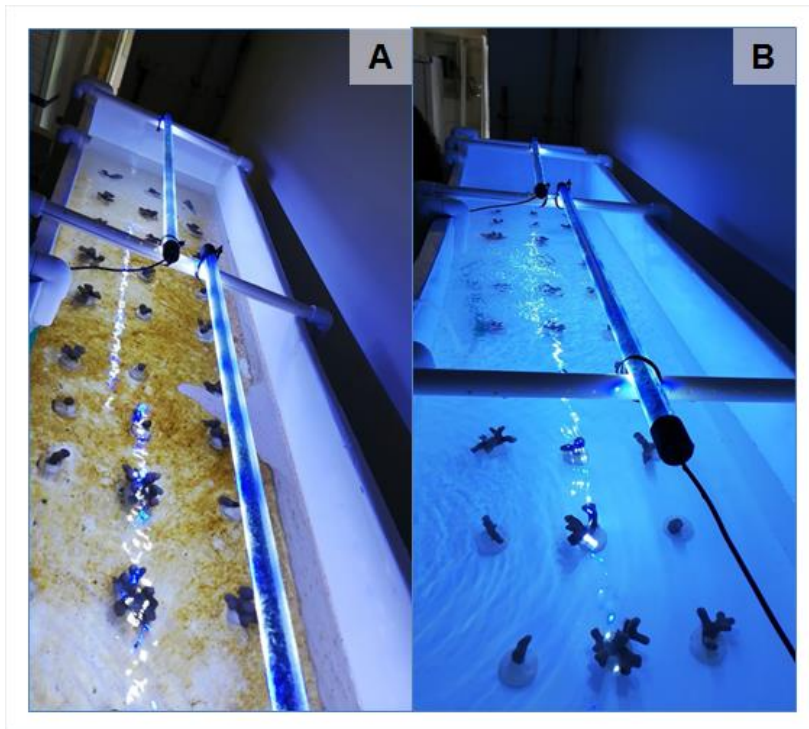


Figura 7. Limpieza de canaletas. A) Canaleta con los fragmentos de coral, con presencia de algas. B) Canaleta luego del proceso de cepillado y lavado.

DISCUSIÓN

En primera instancia, las condiciones ambientales y el material biológico comparado entre los dos sitios muestreados evidencia que existen condiciones similares entre sí, las cuales podrían favorecer la similitud de las comunidades microbianas para los parches del coral *Madracis auretenra*. Sin embargo, la influencia constante de fuentes de contaminación antropogénica y los reportes de un ambiente inadecuado para el desarrollo óptimo de los corales (Mejía, 2001), además de la mayor frecuencia de signos de deterioro observada en Inca Inca, permite atribuir características resilientes al parche que allí se encuentra, ya que se ha encontrado ejemplares cerca de zonas urbanas con adaptaciones que les permiten sobrevivir allí, suficiencia otorgada a su relación simbiótica con su microbioma (Doering *et al.* 2021).

La detección y análisis de las comunidades microbianas permite identificar y cuantificar sus integrantes, así como su actividad metabólica y su asociación a sus nichos específicos, que a su vez proporciona la inferencia de la salud del coral y el entorno que lo rodea. Ya que dichas comunidades proporcionan la adaptación del coral en respuesta al cambio ambiental (Ziegler *et al.*, 2017; Calixto *et al.*, 2020). La caracterización de las comunidades microbianas por medio de la extracción de ADN total es una herramienta para lograr ese fin, ya que es ampliamente usado como lienzo para la amplificación por PCR del gen 16S ARNr, usado en la construcción de bases genómicas y su posterior caracterización.

La comprobación de la integridad del ADN en las muestras proveniente de las épocas seca y lluviosa 2022 y seca 2023, indica una relación contraria entre la integridad del ADN y el tiempo transcurrido. Por lo que se recomienda evitar el paso del tiempo para el análisis de las muestras después de la recolecta, mitigando la degradación del ADN, esencial para el éxito en la obtención de datos genéticos posteriores (Velázquez *et al.*, 2014). Por otro lado, se conjetura que se obtiene ADN total en condiciones óptimas en la época seca, sin embargo, esta afirmación es prematura ya que hacen falta estudios sobre la época lluviosa que argumenten a favor o en contra esta aseveración. Se recalca la presencia de incongruencias al momento de compararlos los resultados de los dos métodos usados para el análisis de las muestras (electroforesis en gel y cuantificación por NanoDrop), donde la presencia de ADN en uno es apreciable, mientras que el otro no se encontraba rastro de ADN. Esto puede deberse a errores metodológicos en la toma de los datos.

Finalmente, el establecimiento de un vivero de fragmentos de coral y la estabilización de variables fisicoquímicas, hace posible el estudio de las comunidades microbianas y su asociación con los corales. Y da lugar para la realización de experimentos que permitan comprender el comportamiento de los microbiomas frente a condiciones adversas, atenuar la dificultad de replicar micronichos y efectuar técnicas de análisis del tejido coralino en asociación con estos microorganismos (Bourne & Munn, 2005). Recalcando una observación continua, manteniendo protocolos y estándares rigurosos, simulando condiciones óptimas del ambiente natural (Robles *et al.*, 2021). Ya que como se registró, los cambio en algunas variables, como la temperatura, pueden afectar significativamente la calidad de los fragmentos, y eventualmente, comprometer la investigación que se lleve a cabo.

CONCLUSIONES

Este estudio logró comparar dos sitios de muestreo, siendo antagonistas entre sí respecto a la incidencia de factores antropogénicos. Y al mismo tiempo, permitió conocer de primera mano el proceso que hay detrás del análisis de las comunidades bacterianas, desde un ámbito netamente científico, como lo es el conocimiento acerca de la extracción de ADN total para la creación de colecciones genómicas, hasta la responsabilidad que implica este proceso, como lo es el cuidado de especímenes que serán la base del futuro próximo. Si bien, los resultados obtenidos en el presente trabajo son resultados muy puntuales, es útil para ser la base de estudios posteriores. Se recomienda realizar estudios de mayor envergadura para dar el siguiente paso, que es conocer en su totalidad un microbioma coralino, y lo que implica esto en la influencia en la toma de decisiones para la conservación de los corales

BIBLIOGRAFÍA

- Barott, K. L., Rodriguez, B., Janouškovec, J., Marhaver, K. L., Smith, J. E., Keeling, P., y Rohwer, F. L. 2011. Microbial diversity associated with four functional groups of benthic reef algae and the reef-building coral *Montastraea annularis*. *Environmental microbiology*, 13(5), 1192-1204.
- Borneman, E. 2008. Introduction to the husbandry of corals in aquariums: A review. *Public Aquar. Husb. Ser.*, 2, 3-14.
- Bourne, D. G., y Munn, C. B. 2005. Diversity of bacteria associated with the coral *Pocillopora damicornis* from the Great Barrier Reef. *Environmental microbiology*, 7(8), 1162-1174.
- Calixto, R., Portz, L., Manzolli, R., Oliveira, L., Suarez, J., Acevedo, T. y Schorr, C. 2020. Evaluación espaciotemporal de los efectos de estresores ambientales sobre la

microbiota coralina y la salud de los arrecifes coralinos del caribe colombiano. Corporación Universidad de la Costa.

- Doering, T., Wall, M., Putchim, L., Rattanawongwan, T., Schroeder, R., Hentschel, U. y Roik, A. 2021. Towards enhancing coral heat tolerance: a "microbiome transplantation" treatment using inoculations of homogenized coral tissues. *Microbiome*, 9(1), 102 p.
- Forsman, Z., Rinkevich, B., y Hunter, C. 2006. Investigating fragment size for culturing reef-building corals (*Porites lobata* and *P. compressa*) in ex situ nurseries. *Aquaculture*, 261(1), 89-97.
- Gardner, T., Côté, I., Gill, J., Grant, A., y Watkinson, A. 2003. Long-term region-wide declines in Caribbean corals. *science*, 301(5635), 958-960.
- Garren, M., y Azam, F. 2010. New method for counting bacteria associated with coral mucus. *Applied and environmental microbiology*, 76(18), 6128-6133.
- Herrera, C. 2022. Búsqueda preliminar de candidatos a microorganismos benéficos para corales a partir del mucus y tejido de *Madracis auretenra* (Scleractinia: Pocilloporidae). Tesis de grado Biología marina. Universidad Jorge Tadeo Lozano. Facultad de Ciencias Naturales e Ingeniería. Santafé de Bogotá. 56 p.
- Kimes, N. E., van Nostrand, J. D., Weil, E., Zhou, J., y Morris, P. J. 2010. Microbial functional structure of *Montastraea faveolata*, an important Caribbean reef-building coral, differs between healthy and yellow-band diseased colonies. *Environmental microbiology*, 12(2), 541-556.
- Lee, S. T., Davy, S. K., Tang, S. L., y Kench, P. S. 2016. Mucus sugar content shapes the bacterial community structure in thermally stressed *Acropora muricata*. *Frontiers in microbiology*, 7, 371.
- Lirman, D., y Schopmeyer, S. 2016. Ecological solutions to reef degradation: optimizing coral reef restoration in the Caribbean and Western Atlantic. *PeerJ*, 4, e2597.
- López, I., Flórez, L., y Quan-Young, L. 2020. Influencia de la herbivoría sobre la interacción alga-coral en un arrecife coralino de bahía Capurganá, Caribe colombiano. *Revista de Biología Tropical*, 68(3), 729-742.
- McDevitt, J. M., Baum, J. K., Garren, M., y Vega, R. L. 2017. Responses of coral-associated bacterial communities to local and global stressors. *Front. Mar. Sci.* 4:262. doi: 10.3389/fmars.2017.00262.
- Mejia, N. 2001. Efecto e incidencia de las interacciones alga – coral en comunidades coralinas de dos bahías de la regio de Santa Marta (Caribe colombiano) con distinto grado de influencia antropogénica. Tesis de grado Biología marina. Universidad Jorge Tadeo Lozano. Facultad de Ciencias Naturales e Ingeniería. Santafé de Bogotá. 188 p.
- Ocampo, H., Rodríguez, F. A., y Becerril, A. 2021. Más allá del cambio climático: Implicaciones de la contaminación marina por agroquímicos sobre las interacciones simbióticas y el éxito ecológico de los corales. *E-CUCBA*, (15), 1–9. <https://doi.org/10.32870/e-cucba.v0i15.174>
- Ramos, A., García, U., De Los Santos, C., y Aguirre, M. 2018. Metagenómica marina: un enfoque al descubrimiento de nuevos biosurfactantes para su posible aplicación ambiental. En R. Zamora (Ed), *Avances y perspectivas de la biotecnología en la península de Yucatán*. 208-226.

- Reshef, L., Koren, O., Loya, Y., Zilber, I., y Rosenberg, E. 2006. The Coral Probiotic Hypothesis. *Environ Microbiol*, 8(12), 2068-2073.
- Ritchie, K. B., y Smith, G. W. 2004. Microbial communities of coral surface mucopolysaccharide layers. In *Coral Health and Disease*. New York: Springer-Verlag, 259-263.
- Robles, A., Reyes, H., y Cáceres, C. 2021. Crecimiento y supervivencia de corales durante la fase inicial de cultivo en La Paz, Baja California Sur, México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 92(4), 7.
- Rodríguez, R., Báez, D., Valcárcel, A., Evangelista, D., Bello De Lillo, Y., y Matos, J. 2022. Importancia de los viveros de coral y su impacto socioeconómico. *AULA Revista de Humanidades y Ciencias Sociales*, 68(1), 78-91
- Smith, S. et al. 2018. Coral-associated bacteria demonstrate phylosymbiosis and cophylogeny. *Nat Commun* 9, 4921. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07275-x>
- Teplitski, M., y Ritchie, K. 2009. How feasible is the biological control of coral diseases?. *Trends in ecology & evolution*, 24(7), 378-385.
- Valenzuela, F., Casillas, R., Villalpando, E., y Vargas, F. 2015. El gen ARNr 16S en el estudio de comunidades microbianas marinas. *Ciencias marinas*, 41(4), 297-313.
- Van Oppen, M. J. H., y Blackall, L. L. 2019. Coral microbiome dynamics, functions and design in a changing world. *Nature Reviews Microbiology*. doi:10.1038/s41579-019-0223-4
- Vega, J., Rodríguez, A., Reyes, M., y Navas, R. 2008. Formaciones coralinas del área de Santa Marta: estado y patrones de distribución espacial de la comunidad bentónica. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras-INVEMAR*, 37(2), 87-105.
- Velázquez, L., Martínez, M., y Romero, A. 2014. Extracción y purificación de ADN. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*, 1.
- Villamizar, E. 2021. Impactos de los derrames de petróleo sobre los arrecifes coralinos y sus bienes y servicios ecosistémicos. *Boletín de la Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales*, LXXXI(1), 45-52.
- Weber, L., DeForce, E., y Aprill, A. 2017. Optimization of DNA extraction for advancing coral microbiota investigations. *Microbiome*, 5, 1-14.
- Westmacott, S., Teleki, K., Wells, S., y West, J. 2000. Manejo de arrecifes de coral blanqueados o severamente dañados VII. (G. Frago, Trad.) Cambridge: UICN.
- Wild, C., Niggli, W., Naumann, M., y Haas, A. F. 2010. Organic matter release by Red Sea coral reef organisms—potential effects on microbial activity and in situ O₂ availability. *Marine Ecology Progress Series*, 411, 61-71.
- Zambrano, S., y Villalpando, M. 2020. Plan para el estudio de la epizootiología de corales: guía para la evaluación, seguimiento y manejo preventivo de enfermedades y blanqueamiento de coral en la República Dominicana.
- Ziegler, M., Séneca, F., Yum, L. et al. 2017. La dinámica de la comunidad bacteriana está vinculada a los patrones de tolerancia al calor de los corales. *Nat Commun* 8 , 14213. <https://doi.org/10.1038/ncomms14213>

ANEXOS

Anexo 1. Análisis PERMANOVA utilizado para comparar la similitud entre los dos sitios muestreados en base de las variables fisicoquímicas obtenidas.

	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>Pseudo-F</i>	<i>P(perm)</i>	<i>U perms</i>
Sitio	1	0,060627	0,060627	41,533	0,097	10
<i>Residual</i>	4	0,0058389	0,0014597			
<i>Total</i>	5	0,066466				

Anexo 2. Estimación de cobertura de los parches de *M. auretenra* en los dos sitios de muestreo.

Componente	Chengue			Inca Inca		
	Promedio (%)	Desviación estándar	Error estándar	Promedio (%)	Desviación estándar	Error estándar
<i>M. auretenra</i>	87,67	8,78	5,07	84,44	12,74	7,36
Abiótico	5,22	2,80	1,62	8,33	3,28	1,89
Coral duro	3,00	3,72	2,15	-	-	-
Coral blando	1,67	1,42	0,82	-	-	-
Algas filamentosas/ cianobacterias	0,94	1,64	0,94	4,94	6,27	3,62
Algas costrosas coralinas	0,78	1,21	0,70	1,06	1,69	0,97
Esponjas	0,61	0,35	0,20	1,22	1,58	0,91
<i>Millepora spp.</i>	0,11	0,19	0,11	-	-	-
Macroalgas carnosas	-	-	-	-	-	-

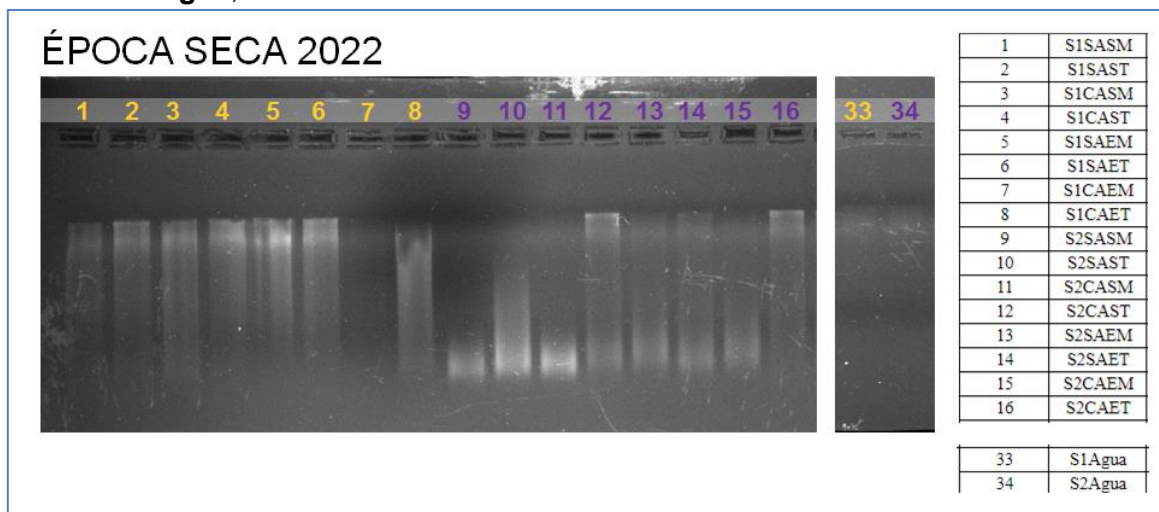
Anexo 3. Estimación de frecuencia de interacción de los parches de *M. auretenra* con otros componentes arrecifales, en los dos sitios de muestreo.

Componente	Chengue			Inca Inca		
	Promedio (%)	Desviación estándar	Error estándar	Promedio (%)	Desviación estándar	Error estándar
Sin contacto	87,27	16,28	2,10	85,00	18,57	2,40
Con esponjas	4,33	10,02	1,29	7,07	12,04	1,55
Con coral blando	2,47	11,62	1,50	0,27	2,07	0,27
Con otro invertebrado	2,07	3,17	0,41	1,20	2,58	0,33
Con coral duro	2,07	5,39	0,70	-	-	-
Con algas costrosas coralinas	0,87	3,46	0,45	1,67	5,67	0,73
Con <i>Millepora spp.</i>	0,60	3,28	0,42	-	-	-
Con algas filamentosas/ cianobacterias	0,33	1,34	0,17	4,80	9,88	1,27
Con macroalgas carnosas	-	-	-	-	-	-

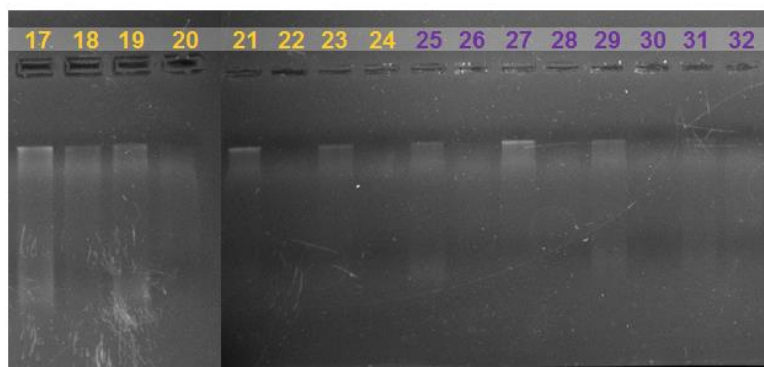
Anexo 4. Estimación del estado de salud de los parches de *M. auretenra* en los dos sitios de muestreo.

Condición	Chengue	Inca Inca
Volcamiento	43,33	75,00
Mordeduras	30,00	21,67
Mortalidad parcial	20,00	35,00
Palidez	6,67	45,00
Sedimentación	5,00	16,67
Blanqueamiento	3,33	38,33

Anexo 5. Fotografía de la electroforesis en gel de la extracción del ADN total de las muestras recolectadas en las diferentes épocas climáticas efectuadas. Número de color amarillo=**Chengue**, número de color morado=**Inca Inca**.



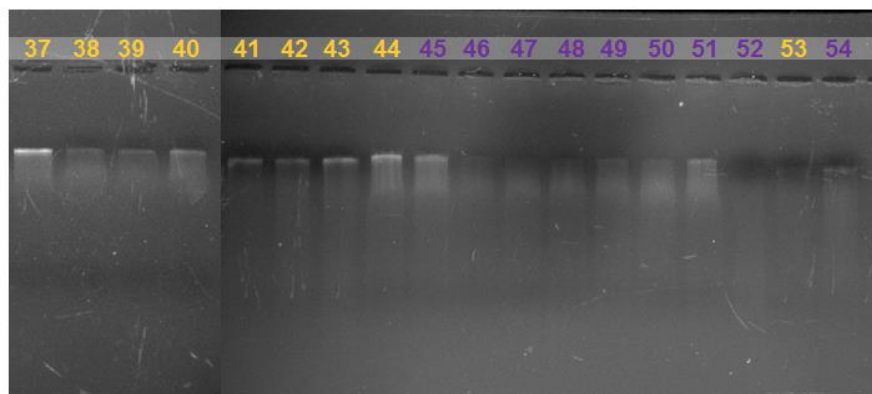
ÉPOCA LLUVIOSA 2022



17	S1SASMLI
18	S1SASTLI
19	S1CASMLI
20	S1CASTLI
21	S1SAEMLI
22	S1SAETLI
23	S1CAEMLI
24	S1CAETLI
25	S2SASMLI
26	S2SASTLI
27	S2CASMLI
28	S2CASTLI
29	S2SAEMLI
30	S2SAETLI
31	S2CAEMLI
32	S2CAETLI

35	S1AguaLI
36	S2AguaLI

ÉPOCA SECA 2023



37	SISASM
38	SISAST
39	SICASM
40	SICAST
41	SISAEM
42	SISAET
43	SICAEM
44	SICAET
45	SIISASM
46	SIISAST
47	SIICASM
48	SIICAST
49	SIISAEM
50	SIISAET
51	SIICAEM
52	SIICAET
53	SIAgua
54	SIIAgua

Anexo 6. Registro periódico del monitoreo del estado del vivero de fragmentos de coral durante el periodo de aclimatación.

Fecha	Hora	T (°C)	S (ppt)	pH	NO ₃ ⁻ (mg/L)	PO ₄ ³⁻ (mg/L)	KH (mEq/L)	# Frag
28/04/23	18:00	27,5	38,4	7,99	0	0	2,5	0
29/04/23	11:00	25,5	37,8	-	-	-	-	-
29/04/23	14:26	26,6	34,9	-	-	-	-	36
30/04/23	11:21	25,4	35,2	-	-	-	-	36
30/04/23	14:20	26	35,6	-	-	-	-	36
01/05/23	8:31	24,8	35,9	-	-	-	-	36
01/05/23	15:18	26,6	35,9	-	-	-	-	36
02/05/23	8:07	24,6	36,3	-	-	-	-	36
02/05/23	15:17	27	36,7	-	-	-	-	36
03/05/23	10:01	25,2	36,3	8,02	0	0	2,5	36
03/05/23	16:01	27,5	36,6	-	-	-	-	36
04/05/23	9:54	26,1	35,9	-	-	-	-	36
04/05/23	14:51	26,9	36	-	-	-	-	36

05/05/23	9:06	25,5	36,2	-	-	-	-	36
05/05/23	15:08	26,8	36,3	-	-	-	-	36
06/05/23	10:56	25,7	36,8	-	-	-	-	36
06/05/23	14:48	27,2	36,3	-	-	-	-	36
07/05/23	10:41	25,3	36,4	-	-	-	-	36
07/05/23	15:11	27,3	35,6	-	-	-	-	36
08/05/23	7:05	27,5	35,7	-	-	-	-	36
08/05/23	17:30	27,3	35,5	-	-	-	-	36
09/05/23	9:30	25,7	35,9	-	-	-	-	36
09/05/23	16:50	26,8	35,7	-	-	-	-	36
10/05/23	7:10	25,8	35,9	-	-	-	-	36
10/05/23	17:58	26	35,82	-	-	-	-	36
11/05/23	6:40	24,6	36,7	-	-	-	-	36
11/05/23	16:32	27,1	35,2	-	-	-	-	36
12/05/23	8:04	25,1	36	8,02	0	0,25	2,5	36
12/05/23	18:22	25,5	36,2	-	-	-	-	36
13/05/23	10:30	23,6	36,5	-	-	-	-	36
13/05/23	16:21	23,9	36,8	-	-	-	-	36
14/05/23	9:35	23	35,7	-	-	-	-	36
14/05/23	15:12	23,9	35,8	-	-	-	-	36
15/05/23	8:02	23,2	36,1	-	-	-	-	36
15/05/23	15:48	24,8	36,2	-	-	-	-	36
16/05/23	10:22	25,7	36,6	-	-	-	-	36
16/05/23	15:35	26,5	36,3	-	-	-	-	36
17/05/23	8:27	25,5	36,7	-	-	-	-	36
17/05/23	14:23	26,6	36,5	8,24	5	0,25	2,1	36
18/05/23	10:08	26,2	35,2	-	-	-	-	36
18/05/23	15:33	27,3	35,4	-	-	-	-	36
19/05/23	8:50	26	35,8	-	-	-	-	36
19/05/23	16:58	27,9	35,9	-	-	-	-	36
20/05/23	8:42	25,9	36,1	-	-	-	-	36
20/05/23	15:51	27,1	36,3	-	-	-	-	36
21/05/23	9:01	26,2	36,4	-	-	-	-	36
21/05/23	15:16	26,3	36,6	-	-	-	-	36
22/05/23	8:28	25,8	35,8	-	-	-	-	36
22/05/23	16:20	26,8	36	-	-	-	-	36
23/05/23	9:25	25,1	36	8,26	5	0,25	2,5	36
23/05/23	16:39	25,8	36,2	-	-	-	-	36