



TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE
LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

“Análisis de comunidades bacterianas en muestras de agua: puesta a punto de un protocolo *in-house* de secuenciación masiva de amplicones del gen ribosomal 16S”

ELIANA NERVI FAGGIANI

Orientador: Dra. Claudia Piccini
Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE).

Co-orientador: José Sotelo Silveira, Departamento de Genómica, IIBCE

Departamento de Microbiología, IIBCE
Febrero 2020

Índice

Acrónimos	4
Resumen.....	4
Introducción	6
Ecosistemas acuáticos y floraciones de cianobacterias tóxicas	6
Interacciones entre cianobacterias y la comunidad bacteriana heterótrofa.....	9
Caracterización de comunidades microbianas en agua.....	11
Aplicaciones de secuenciación masiva en estudios de ecología microbiana acuática	12
Antecedentes específicos y justificación.....	17
Objetivo general.....	20
Objetivos específicos.....	20
Actividades.....	20
Metodología.....	21
Muestreo.....	21
Extracción de ADN genómico de muestras de agua	22
Estrategia de amplificación del gen ADNr 16S por PCR	22
Análisis de resultados de secuenciación en Ion Torrent.....	26
Resultados.....	32
Extracción de ADN genómico de muestras de agua	32
Amplificación por PCR del gen ADNr 16S.....	32
Análisis comparativo de la secuenciación masiva del ADNr 16S en muestras con y sin barcode	34
Estructura de las comunidades bacterianas del gradiente Salto-Punta del Este.....	43
Diversidad Alfa en el gradiente Salto-Punta del Este.....	44
Diversidad beta en el gradiente Salto-Punta del Este.....	48
Estudio de las comunidades en presencia/ausencia de una floración de cianobacterias tóxicas	52
Correlación con variables ambientales	53
Discusión	55
Extracción de ADN, puesta a punto de la amplificación del gen ADNr 16S y secuenciación masiva utilizando primers con y sin barcode a partir de muestras de agua.....	55
Análisis comparativo de la comunidad microbiana en muestras con y sin barcode.	57
Análisis de la comunidad bacteriana en muestras del gradiente Río-Estuario-Océano	60
Conclusiones	65

Agradecimientos	65 <u>6</u>
Referencias.....	66 <u>7</u>
Anexo	76 <u>5</u>

Acrónimos

OTU - Unidad Taxonómica Operacional

NGS - Next Generation Sequencing

bcPCR - PCR utilizando primers con barcode

emPCR – PCR en emulsión utilizando micro-esferas

FAN – Floraciones Algales Nocivas

SIMPER – Análisis de similitud porcentual

NMDS - Escalamiento multidimensional no métrico

BSA - Seroalbúmina Bovina

PCoA – Análisis de Componentes Principales

AIC - Criterio de información de Akaike

SADs - Distribuciones de Abundancias de las Especies

RESUMEN

La intensificación en el uso del agua ha llevado a la pérdida de calidad de este recurso dando lugar a serios problemas ambientales, de salud y económicos en todo el mundo. A causa de la eutrofización ocurren episodios de floración potencialmente tóxicas en cuerpos de agua dulce y estuarios. Por lo tanto, es relevante estudiar el efecto de cambios espaciotemporales en las comunidades bacterianas y su correlación con factores ambientales físicos y químicos. La secuenciación masiva constituye una herramienta muy utilizada para el estudio de muestras ambientales, aunque esto representa muchas veces un desafío. En los últimos años la secuenciación que emplea *primers* con secuencias *barcodes* ha sido ampliamente utilizada dada sus ventajas en costo y tiempo frente a la preparación de librerías o ligación de barcodes a posteriori. Escasos estudios han evaluado ambas estrategias y/o considerado el posible efecto del agregado estas secuencias en los resultados. Por lo tanto, conocer el costo-beneficio del uso de *barcodes* resulta relevante. El objetivo de este estudio fue conocer la diversidad bacteriana en muestras de agua en el gradiente ambiental río Uruguay-Río de la Plata utilizando 8 muestras tomadas en la costa durante marzo 2013-2014, a partir de la puesta punto de una metodología basada en secuenciación masiva de Ion Torrent PGM del gen ARNr 16S. Se ensayaron ambas estrategias de secuenciación en 3 muestras de extremos del gradiente. Se identificó un sesgo de los *primers* con *barcode* hacia un bajo número de OTUs que fueron más abundantes en las muestras que utilizaron *primers* con secuencias *barcode*. Además, solo la mitad de la riqueza obtenida fue congruente cuándo se utilizaron ambas estrategias para una misma muestra. Por otro lado, se caracterizó la diversidad microbiana de muestras de agua tomadas en el gradiente estuarino (río, estuario, zona externa del estuario) utilizando la secuenciación con *primers* sin *barcode*. La comunidad de todo el gradiente compartió menos del 1% de las OTUs. La comunidad bacteriana pareció seguir el patrón del gradiente salino y de temperatura, pudiendo estas actuar como un filtro ambiental, aunque por baja representatividad no se obtuvo una correlación significativa entre el agrupamiento de OTUs de los sitios y estas variables. La presencia de cianobacterias podría actuar favoreciendo a la colonización de especies raras que ocupan nichos especializados dada su interacción con la comunidad heterótrofa. Finalmente, en este primer acercamiento, este trabajo no recomienda el uso de *barcodes* para el estudio de comunidades en muestras de agua.

INTRODUCCIÓN

Ecosistemas acuáticos y floraciones de cianobacterias tóxicas

El agua es un recurso natural imprescindible para todos los seres vivos, por lo que su pérdida da lugar a problemas de salud, económicos y ambientales en todo el mundo. La contaminación de estuarios ocurre, entre otras causas, debido a flujos derivados de aguas residuales no tratadas o inadecuadamente tratadas (Chalar, 2006; Schreiber *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 1999). La presencia de potenciales agentes de enfermedades en el agua (bacterias, virus y protozoarios) es una de las mayores preocupaciones en cuanto a asuntos de calidad de agua en todo el mundo (Eiler & Bertilsson, 2004; Malham *et al.*, 2014).

La estructura de la comunidad bacteriana nativa de los cuerpos de agua tiene una gran importancia, ya que constituye un elemento clave para la mineralización de la materia orgánica y la circulación de nutrientes en ambientes acuáticos (Kaevska *et al.*, 2016). Dentro de la misma se encuentran las cianobacterias, microorganismos procariontes fotosintéticos que habitan el agua en La Tierra desde hace 3500 millones de años. Las cianobacterias forman parte del fitoplancton y son ubicuas en la naturaleza, habitando nichos ecológicos diversos como desiertos, aguas termales y ambientes helados (Rastogi *et al.*, 2015). Son un grupo diverso que incluye niveles de organización biológica unicelular, colonial y filamentosos siendo el último nivel el que cuenta con mayor número de especies en el plancton. Por esta razón, existen especies de cianobacterias en un amplio rango de tamaños, desde especies de 0,5 μm como por ejemplo *Prochlorococcus spp.* hasta otras que forman colonias macroscópicas de varios milímetros de diámetro como *Microcystis spp.* (UNESCO, 2009). Además, son organismos con una alta plasticidad fisiológica, lo que los convierte en competidores eficaces del plancton. Tienen una alta afinidad por la asimilación de nutrientes esenciales como el nitrógeno (N) y el fósforo (P), la cual es mayor a la de otros organismos fotosintéticos. Por lo tanto, en condiciones limitantes de nitrógeno y fósforo pueden competir con otros organismos del fitoplancton. Asimismo, dada su alta asimilación nutritiva las cianobacterias tienen una importante capacidad de almacenamiento de fósforo (Üveges *et al.*, 2012).

En los últimos tiempos ha ocurrido un cambio en la matriz productiva a nivel mundial, lo cual repercute en cambios en el uso del suelo debidos a un incremento acelerado de la extensión dedicada a monocultivos y el aumento en la ganadería intensiva de engorde a corral (*feedlots*), entre otros. Esto ha incrementado el ingreso de N, P y diferentes compuestos contaminantes a los cursos de agua. En particular, el N y el P son responsables de la eutrofización o enriquecimiento de nutrientes en los ecosistemas acuáticos (Weber, 1907). Este fenómeno ocurre debido al uso excesivo de fosfato soluble y nitrógeno como fertilizantes, y es agravado por prácticas tales como exponer el suelo desnudo a las precipitaciones, ya que ocurren procesos de lixiviación y escorrentías pluviales, ocasionado que una porción sustancial de dichos nutrientes llegue a los cursos de agua (Kato *et al.*, 2009). Otra fuente importante son también las aguas residuales municipales no tratadas y efluentes industriales provenientes de industrias de procesamiento de alimentos tales como mataderos, o de extracción de minerales, las cuales pueden ser importantes emisoras, en particular de fosfatos. A estas causas de la eutrofización deben sumarse las modificaciones físicas del ambiente como el represamiento, la canalización y la desaparición de la vegetación ribereña, que cambian el régimen hidrológico y re-estructuran el ecosistema (Graham *et al.*, 2009).

En aguas eutrofizadas, ocurre un aumento de la densidad de fitoplancton, lo cual conduce a una alta turbidez y baja disponibilidad de luz y oxígeno en el agua. El crecimiento de las cianobacterias se ve favorecido en estas condiciones, ya que poseen adaptaciones que le permiten una eficiente utilización de la luz (desplazamiento en la columna de agua) y captación de nutrientes (Graham et al., 2009). Como consecuencia, ocurren episodios de crecimiento explosivo de determinadas especies de cianobacterias en cortos periodos de tiempo, fenómeno denominado floración (Kruk et al., 2015; Martínez de la Escalera et al., 2017a). En la figura 1 se esquematizan los factores claves para la ocurrencia de floraciones, como el impacto antropogénico, la eutrofización, el aumento de luz y temperatura debido al calentamiento global y otros factores bióticos y abióticos incidentes (Rastogi et al., 2015).

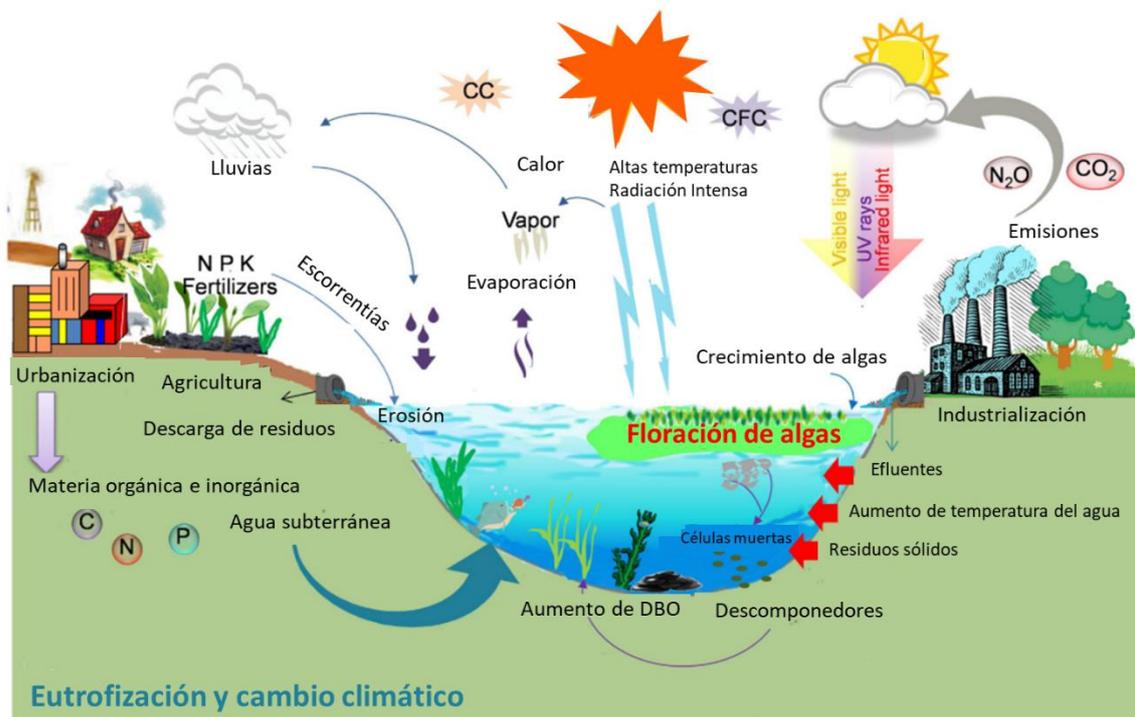


Figura 1. Factores claves para la ocurrencia de floraciones de cianobacterias. Adaptado desde Rastogi et al., (2015). CC:Cambio Climático, CFC:Clorofluorocarbonos, DBO:Demanda Biológica de Oxígeno.

La alta concentración de materia orgánica, principalmente componentes ricos en nitratos y fósforo pueden por lo tanto ser utilizados rápidamente por las cianobacterias para crecer de manera explosiva. Sin embargo, la capacidad de algunas cianobacterias para fijar el N atmosférico les otorga una ventaja competitiva en ambientes acuáticos dónde la relación de N con respecto al P es baja y la disponibilidad de N es limitante para el crecimiento del fitoplancton. Existe una tendencia de los lagos más eutróficos a presentar estas condiciones, siendo una de las razones por la cual las cianobacterias tienden a dominar el fitoplancton de los mismos. Así, las legislaciones que regulan el ingreso de nutrientes al agua y las recomendaciones a los administradores de fertilizantes se han centrado en la reducción del uso de P debido a su ingreso a los cuerpos de agua por fuentes difusas (escorrentías) (Aubriot, 2018; Dolman et al., 2012).

La incidencia creciente de floraciones es de gran preocupación actual en Uruguay y el mundo, ya que no solamente alteran la calidad del agua, modificando el color, olor y el sabor de la

misma, sino que también afectan a la biodiversidad. Además, las cianobacterias tienen la capacidad de producir metabolitos que son tóxicos para los animales y el ser humano (cianotoxinas) (Chorus & Bartram, 2003; Ferrão-Filho & Kozlowsky-Suzuki, 2011; Kruk et al., 2015). Cada especie de cianobacteria puede producir más de un tipo de cianotoxina y su producción varía con las condiciones ambientales, además del estado fisiológico de las células, entre otros factores (Kruk et al., 2015; Claudia Piccini et al., 2011). Han sido clasificadas en: hepatotoxinas, neurotoxinas y dermatotoxinas considerando los síntomas que producen en humanos y otros vertebrados. Diversas especies de cianobacterias planctónicas de los Órdenes: *Chroococcales*, *Oscillatoriales* y *Nostocales*, producen floraciones potencialmente tóxicas en cuerpos de agua de todo el mundo (UNESCO, 2009).

Entre las especies de cianobacterias que forman floraciones más comúnmente encontradas en Uruguay se encuentran las pertenecientes al género *Microcystis* (Orden *Chroococcales*). *Microcystis spp.* forma densas floraciones y puede producir microcistinas (Martínez De La Escalera et al., 2015). Las microcistinas son cianotoxinas producidas por una gran variedad de géneros (*Planktothrix*, *Oscillatoria*, *Anabaena*, *Nostoc*, *Anabaenopsis*, *Aphanocapsa*), siendo la hepatotoxina que aparece más frecuentemente en floraciones. Estas toxinas generan necrosis hepática en pocas horas o días cuando son administradas en dosis letales, mientras que a dosis bajas el efecto es crónico y acumulativo (Chorus & Bartram, 2003; Martínez De La Escalera et al., 2015; UNESCO, 2009).

No existe aún consenso sobre las causas que estimulan la producción de toxinas, aunque la mayoría de las cianotoxinas se han descrito como metabolitos secundarios. Esto significa que no son utilizadas por las cianobacterias en su metabolismo primario, almacenándose intracelularmente (Holland & Kinnear, 2013). Se ha descrito que la producción de toxinas estaría relacionada con factores ambientales como temperatura, luz, nutrientes, salinidad, CO₂ y pH, o que podrían ser moléculas de comunicación química con otros organismos (Chorus & Bartram, 2003; Martínez de la Escalera et al., 2017a). Actualmente, en nuestro país existe una capacidad restringida de detectar cianotoxinas y la detección de la presencia de cianobacterias se realiza mediante microscopía, la cual insuere un tiempo considerable y requiere de personal altamente capacitado en taxonomía. Además, la aparición de determinadas especies problema no es condición suficiente para la presencia de toxinas en el agua y la detección en base a características ambientales es difícil (Codd et al., 2005).

Las cianobacterias pertenecientes a los géneros *Cylindrospermopsis* y *Microcystis* se han detectado con creciente frecuencia en diversos sistemas acuáticos de nuestro país, especialmente de agua dulce, donde desarrollan floraciones potencialmente tóxicas (Kruk et al., 2015). Esto constituye un problema para la potabilización del agua, ya que algunas de estas floraciones se han detectado en cursos de agua utilizados por el ente autónomo Obras Sanitarias del Estado (OSE) para suministro de agua potable (Río Santa Lucía y la Laguna Blanca) (Kruk et al., 2013).

Muchas metodologías de detección de cianobacterias tóxicas se basan en los *clusters* de genes principales codificantes para las toxinas, como es el caso del *cluster mcy* (Martínez de la Escalera et al., 2017b). El desarrollo de métodos de detección rápidos, sensibles y accesibles o modelos

de predicción resulta imprescindible para entender y prevenir los efectos negativos de las floraciones.

Interacciones entre cianobacterias y la comunidad bacteriana heterótrofa

La diversidad bacteriana en el agua está relacionada con la presencia de floraciones de cianobacterias y existen también marcadas diferencias entre comunidades microbianas marinas, estuarinas y de agua dulce (Berg et al., 2009; Eiler & Bertilsson, 2004). Las algas, bacterias heterótrofas y arqueas son los principales productores y descomponedores respectivamente, siendo los pilares estructurales del ecosistema. La mayoría de los tipos de interacciones entre cianobacterias y bacterias en la zona planctónica son escasamente estudiadas, debido a la dificultad de aislar cultivos axénicos de cianobacterias y mantenerlos, debido a la importancia de la asociación natural y que su fisiología y metabolismo son diferentes en condiciones aisladas (Beliaev et al., 2014; Ramanan et al., 2016).

Se ha reportado que en ambientes acuáticos ocurren importantes interacciones en base al intercambio de nutrientes y metabolitos, y alimentación cruzada (*cross-feeding*). La fijación de carbono orgánico mediante la fotosíntesis por parte de las cianobacterias puede provocar una respuesta quimiotáctica que da lugar a asociaciones con otros microorganismos. Dichas respuestas varían dependiendo al origen y cantidad de los compuestos involucrados, los cuales pueden ser intermediarios fotosintéticos por ejemplo glicolato, osmolitos, ácidos grasos y polímeros extracelulares o productos de la lisis celular como azúcares, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Beliaev et al., 2014).

También se ha reportado la biodegradación de cianotoxinas por parte de organismos del gupo Betaproteobacteria, y mayormente por Alfaproteobacterias del género *Sphingomonas* (Berg, 2009) en cultivos de *M. aeruginosa* (Briand et al., 2016). Otro tipo de interacciones consiste en que, en una floración de *M. aeruginosa*, las bacterias pueden adherirse directamente al exopolisacárido (EPS) de la matriz extracelular (formado por glucosa, fructuosa, xilosa, galactosa y/ rhamnosa, dependiente de especie) de las cianobacterias o permanecer asociadas a la floración, pero no adheridas. Esta asociación podría brindar protección mecánica a las bacterias heterótrofas (Berg et al., 2009). Se ha descrito también que, con el aumento en la concentración de cianobacterias en una floración, aumenta también la biomasa de bacterias circundantes, y la comunidad heterótrofa cambia. Este fenómeno en conjunto con secreciones del polisacárido extracelular induce a la formación de colonias en *M. aeruginosa*. Diferentes comportamientos de agregación de *M. aeruginosa* en distintas fases de crecimiento se han relacionado positiva o negativamente con la comunidad bacteriana heterotrófica asociada durante las diversas fases de crecimiento (Shen et al., 2011).

Algunas cianobacterias son capaces de fijar nitrógeno de la atmósfera, por lo que lo convierten de manera indirecta en formas accesibles a otros microorganismos de la comunidad (Berg et al., 2009). Ha sido reportado que las comunidades bacterianas asociadas a cepas formadoras de *heterocystos* cultivadas en deficiencia de nitrógeno (*Aphanizomenon–Dolichospermum*) presentaron diferencias significativas en la composición y la habilidad de utilizar diversas fuentes de carbono, en comparación a aquellas asociadas a cepas no formadoras de *heterocystos* (*Planktothrix–Microcystis*) (Zhu et al., 2016). Además, Meyer et al (2013) reportaron que las comunidades bacterianas asociadas a EPS tienen una baja abundancia de *Actinobacteria*, pero

mostraron diferencias significativas en los niveles de OTUs (*Unidad Taxonómica Operacional*). Esto sugiere una fuerte influencia del metabolismo de la cianobacteria y el medio en la comunidad bacteriana circundante; y es muy importante, teniendo en cuenta la ocurrencia de floraciones con presencia de más de una especie de cianobacteria, las cuales difieren en su EPS.

Se ha visto entonces que la presencia de bacterias circundantes varía según el género que forma la floración en un mismo cuerpo de agua, y que, por ejemplo, el filo Proteobacteria es dominante en presencia de una floración de *Microcystis* o de *Anabaena* en agua dulce. Además, se observó que la clase β -Proteobacteria fue más abundante en las fracciones asociadas directamente a la floración, probablemente por su alta eficiencia en la degradación de materia orgánica. Inversamente, se observó que el filo Actinobacteria se encontraba ausente en ambas fracciones estudiadas (Louati et al., 2015).

Los géneros *Prochlorococcus* y *Synechococcus* que habitan aguas oceánicas interactúan con grupos de bacterias heterótrofas, siendo fundamentales para el ciclo del carbono marino y otros nutrientes. Se ha reportado el intercambio específico de metabolitos durante el co-cultivo de una cepa de *Shewanella* sp. y cianobacterias del género *Synechococcus* en respuesta al estrés oxidativo mediante transcriptómica. Se observó la co-localización durante el co-cultivo, y que, en dichas condiciones, los niveles de transcripción de genes implicados en el estrés oxidativo disminuyeron en la cepa de *Shewanella* sp., al igual que las vías de eliminación de compuestos reactivos del oxígeno (ROS). Es decir que algunos fotoautótrofos podrían proporcionar protección a la comunidad bacteriana contra el estrés oxidativo (Beliaev et al., 2014). Otros estudios realizados para el género *Prochlorococcus* plantean que son las bacterias heterótrofas quienes actúan disminuyendo el estrés oxidativo en co-cultivo (Morris et al., 2002).

En cuanto a la comunidad heterótrofa, se ha descrito la presencia de bacterias potencialmente patógenas relacionadas a las floraciones. Por ejemplo, asociaciones con el género *Aeromonas*, *Vibrio* (Berg, 2009), *Acinetobacter* y *Pseudomonas* (Ward & Cohan, 2005). Si bien varios estudios de los riesgos asociados a las floraciones de cianobacterias se han enfocado en las cianotoxinas, muchos de los problemas de salud humana detectados con efectos dermatológicos o gastrointestinales podrían ser causados por bacterias heterótrofas asociadas a una floración.

Debido a lo anteriormente mencionado, existe la necesidad de desarrollar herramientas que por un lado, contemplen los mecanismos ecológicos que controlan el funcionamiento de las comunidades, y que a su vez permitan la detección de las cientos de especies de fitoplancton que pueden ocurrir simultáneamente (UNESCO, 2009). Estudios basados en secuenciación masiva del gen para el ARNr 16S de muestras de playas del Río de la Plata mostraron que la contaminación antropogénica del agua y del sedimento induce cambios en la comunidad bacteriana heterótrofa que pueden ser detectados por esta metodología (Piccini & García-Alonso, 2015).

Caracterización de comunidades microbianas en agua

Para estudiar y entender a la comunidad microbiana en una muestra de agua deben responderse asuntos claves como a)- que tipo de microorganismos están presentes, b)- cuán abundantes son, y cómo sus actividades repercuten en el ambiente y en otros organismos, incluyendo posibles efectos en la salud humana; c)- cómo influencia el ambiente en la estructura y función de los microorganismos presentes (Tilman, 2001). Existen numerosas técnicas utilizadas para la detección, cuantificación y caracterización de comunidades microbianas en muestras de agua para el monitoreo de la calidad de la misma (Figura 2). A pesar de su utilidad, muchas de estas técnicas tienen limitaciones y sólo muestran una proporción relativamente pequeña del total de la diversidad de las muestras de agua (menor al 1%) (Riesenfeld et al., 2004). A pesar de las limitaciones mencionadas, las metodologías dependientes de cultivo son el requisito regulador actual utilizado para el monitoreo rutinario del agua en empresas y laboratorios analíticos, incluida la detección de contaminación fecal.

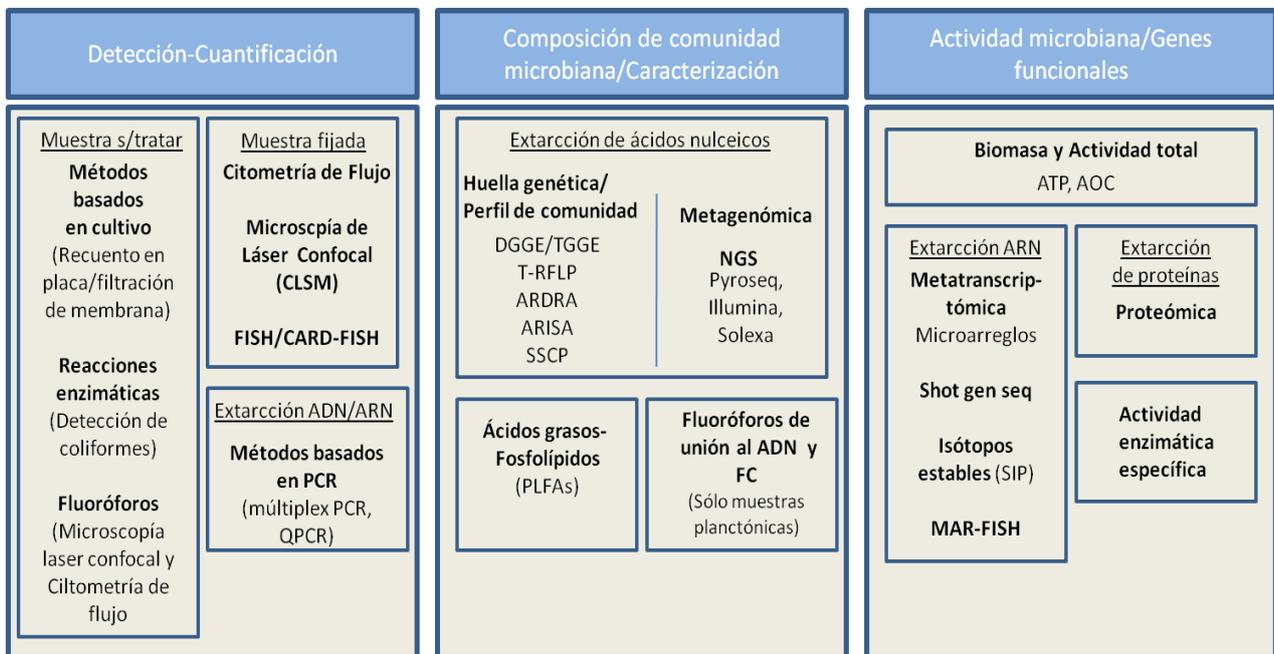


Figura 2. Diferentes técnicas disponibles para caracterizar las comunidades microbianas en sistemas de distribución de agua potable. ATP= Adenosín Trifosfato, AOC= Carbono Orgánico Asimilable. Adaptado desde Douterelo et al., (2014).

Recientemente, los enfoques moleculares han superado estas limitaciones, permitiendo obtener una imagen más detallada de la comunidad microbiana en un tiempo y espacio dado. Por lo tanto, un estudio en mayor profundidad abalado por las metodologías tradicionales permitiría entender cambios en la comunidad de manera más específica. Las técnicas genómicas recientes como la secuenciación masiva de última generación (NGS - *Next Generation Sequencing*) han aumentado el conocimiento de las comunidades bacterianas y constituyen potentes herramientas para el monitoreo de patógenos ambientales en el agua (Alvarenga et al., 2017; Shokralla et al., 2012). El monitoreo activo y eficaz no sólo sirve de base para la vigilancia, sino que también es útil para la rápida identificación y trazabilidad de las fuentes de contaminación, haciendo posible la prevención y el tratamiento eficaz de enfermedades (Malham et al., 2014).

Algunos microorganismos presentes en el agua, generalmente asociados a sedimentos y flóculos (Malham et al., 2014) son causantes de toxicidad o patologías severas en humanos y animales. Por esta razón, el monitoreo de cepas bacterianas resulta fundamental para lograr la detección temprana, el control y el manejo de fuentes de contaminación. Posibles vías de transmisión de enfermedades incluyen el uso directo de las aguas superficiales (actividades recreativas), o la ingestión de alimentos del mar o alimentos crudos regados con aguas contaminadas (Schreiber et al., 2015; Wu et al., 1999).

El estudio de la ecología microbiana, particularmente en plantas potabilizadoras, se basa tradicionalmente en la toma de muestras de agua y el subsiguiente cultivo de microorganismos, de manera de estudiar la comunidad presente (Douterelo et al., 2014a). Sin embargo, cultivar bacterias patógenas es una tarea laboriosa, ya que requiere el enriquecimiento y el crecimiento en medio selectivo con el objetivo de separar uno o un conjunto de cepas o especies específicas del contexto bacteriano existente en la muestra (Handelsman, 2004). Además, muchas bacterias, incluyendo importantes patógenos humanos, responden al estrés ambiental generando formas que son viables, pero no cultivables (VPNC). En algunos casos, como en *Helicobacter pylori* y *Vibrio cholerae*, la formación de VPNC hace imposible su detección en cultivos. Entre los patógenos que entran en estado VPNC se encuentran *Campylobacter spp.*, *Escherichia coli* (incluyendo cepas enterohemorrágicas, EHEC), *Francisella tularensis*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *M. tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, varias cepas de *Salmonella spp.* y *Shigella spp.*, así como numerosas cepas de *Vibrio spp.* (Oliver, 2010).

Los patógenos bacterianos son responsables de más del 50% de las enfermedades infecciosas emergentes, mientras que los patógenos virales son los siguientes más comunes (Malham et al., 2014). Las enfermedades transmitidas por el uso del agua causan en el mundo más de 2,2 millones de muertes por año y gran número de casos día a día de enfermedades gastrointestinales y sistémicas. Por lo tanto, constituyen una preocupación importante de la salud pública en todo el mundo, no sólo por la morbilidad y la mortalidad que causan, sino por el alto costo que representa su prevención y tratamiento. Como se mencionó anteriormente, estas enfermedades están directamente relacionadas con el deterioro ambiental y la contaminación y eutrofización de los cursos de agua (Ramírez-Castillo et al., 2015).

Aplicaciones de secuenciación masiva en estudios de ecología microbiana acuática

En los últimos años, el empleo de técnicas de secuenciación masiva ha sido fundamental para el estudio de comunidades en ecología microbiana, posibilitando explorar con mayor precisión la riqueza de especies, la abundancia y el total de la diversidad en variados ecosistemas. A diferencia de otras técnicas, la secuenciación masiva permite la detección de miembros de una comunidad presentes en muy baja abundancia (Xue et al., 2018). Esto resulta clave considerando que por ejemplo, aquellos organismos muy poco abundantes son frecuentemente los principales responsables de procesos centrales en el ciclo de nutrientes en los sistemas acuáticos (Bertoglio, 2016). La secuenciación de próxima generación (NGS, *next generation*

sequencing) refiere a las tecnologías de secuenciación de ADN de alto rendimiento han evolucionado a partir de la secuenciación Sanger, permitiendo que millones o miles de millones de hebras de ADN pueden secuenciarse en paralelo, dando un mayor rendimiento y minimizando la necesidad de los métodos de clonación que requiere la secuenciación del tipo Sanger (Tremblay et al., 2015). Además, avances en las técnicas de secuenciación han permitido alta profundidad y amplitud, surgiendo la secuenciación múltiple o multiplex como una estrategia popular para la secuenciación en paralelo de un número de muestras diferentes (Berry et al., 2011). Estas tecnologías de alto rendimiento han facilitado avances importantes en nuestra comprensión de la ecología microbiana (Kemp & Aller, 2004; Langille et al., 2013).

La tecnología de secuenciación masiva Ion Torrent PGM (Personal Genome Machine) funciona mediante la utilización de un material semiconductor capaz de transformar el cambio local de pH generado por la liberación del protón cuando la ADN polimerasa adiciona un nucleótido en la replicación del ADN, en una señal eléctrica dirigida al procesador. El primer paso para utilizar dicha tecnología es generar una biblioteca de fragmentos de ADN flanqueados por adaptadores específicos y secuencias código de barras o *barcodes* (Life Technologies, 2012). Un identificador único y específico de cada muestra o "*barcode*", permite la secuenciación múltiple de varias muestras, para identificar el origen de las secuencias una vez que las mismas son secuenciadas, y permitir su ordenación mediante la detección de esta secuencia en el meta-análisis (procesamiento *downstream*).

Generalmente son agregadas durante los pasos de construcción de librería previo a la secuenciación a través de pasos de ligación. Sin embargo, recientemente se han reportado estudios que utilizan *primers* ligados a dichas secuencias adaptadoras durante la reacción de PCR utilizando la muestra de estudio como molde (bcPCR), de manera de ingresar dichos productos a el procesamiento previo a la secuenciación sin la necesidad de construir librerías (Claesson et al., 2009; Milani et al., 2013). Por lo tanto, la construcción de librerías se puede hacer ligando los adaptadores a los productos de PCR durante la construcción de la librería o agregando las secuencias del adaptador durante la PCR mediante el diseño de *primers* con las secuencias del adaptador en el extremo 5' (Figura 3). Por ejemplo, durante la secuenciación unidireccional, uno de los dos *primers* tendrá la region adaptadora A seguida del extremo proximal de la región *target* (*Primer forward*) y el otro el adaptador P1 en el extremo distal de la misma (*Primer reverse*).

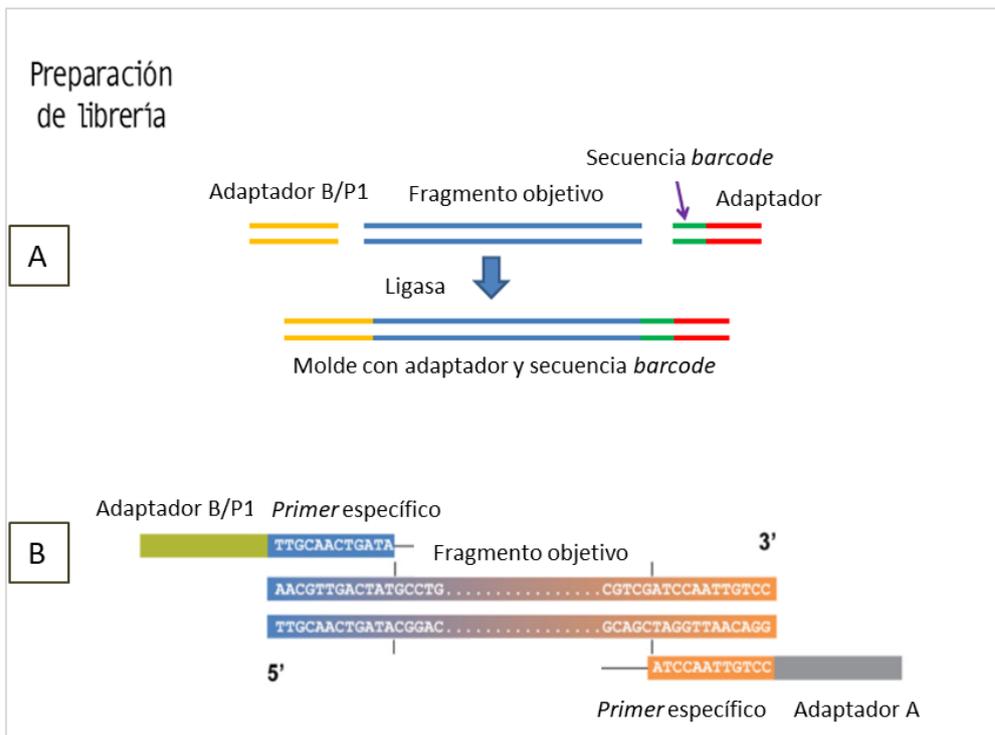


Figura 3. Representación esquemática de la generación de bibliotecas de amplicones en Ion Torrent PGM. Plantillas resultantes para la secuenciación unidireccional mediante la selección apropiada de cebadores y la amplificación específica del ADN *target* mediante la ligación de adaptadores y secuencias *barcode* (A) o mediante el uso de cebadores con adaptadores y *barcode* durante la amplificación (B). Adaptado desde *Life Technologies*, (2012).

Dichos fragmentos son mezclados con micro-esferas o *Ion Sphere Particles* (ISPs) para dar lugar a un PCR en emulsión. Se calcula una proporción específica de manera que un solo fragmento se une a cada micro-esfera y este se replique *in situ* logrando la preparación del molde (Figura 4). Las micro-esferas tienen secuencias específicas para la unión del primer fragmento y de otros generados durante la PCR en emulsión. Una vez esto, cada esfera estará cubierta de copias del amplicón inicial unidas a ella mediante secuencias adaptadoras. Las esferas se incuban con ADN polimerasa y se colocan en un micro-chip, de manera que cada esfera sea depositada en uno de los pocillos del mismo. Una vez allí, se realiza la secuenciación por síntesis dentro de cada pocillo del chip. A medida que ocurre la reacción de amplificación y el material semiconductor recibe la señal de cambio de pH cuándo ocurre la polimerización, emitiendo una señal eléctrica al procesador (Figura 4). Una vez que se generan los datos en el secuenciador, dicho conjunto de datos obtenidos es procesado mediante métodos computacionales para su análisis (*Life Technologies*, 2012).

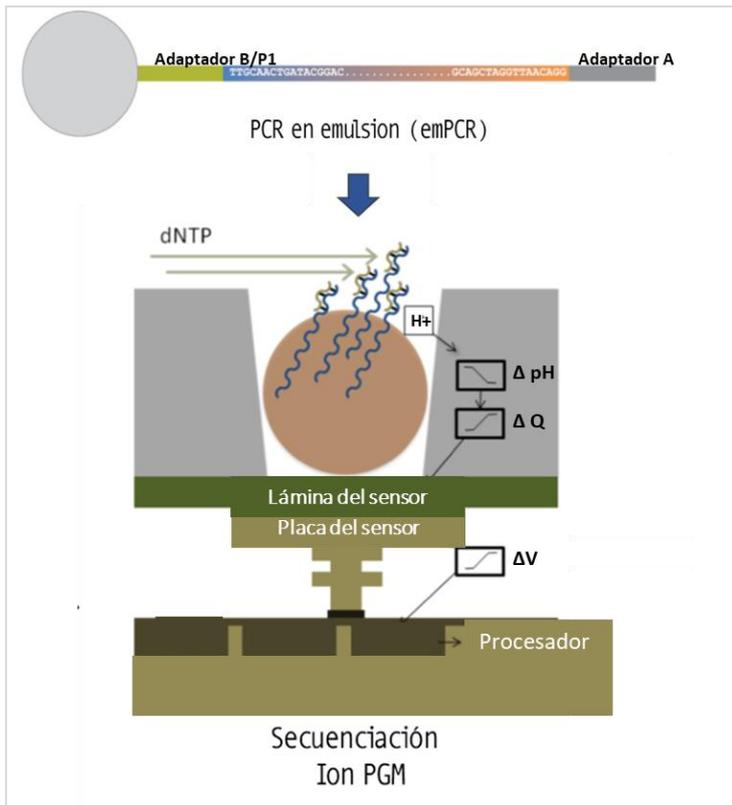


Figura 4. Representación esquemática de la amplificación por PCR en emulsión (arriba) y secuenciación en el chip semiconductor (abajo) en Ion Torrent PGM. Los fragmentos de la biblioteca se incuban con micropartículas esféricas PCR en emulsión (emPCR). Luego, dichas partículas se aplican al chip correspondiente y se depositan en los pocillos del mismo mediante una breve etapa de centrifugación. Finalmente, el chip se coloca en el equipo Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) para que ocurra la secuenciación por síntesis. Adaptado desde *Life Technologies*, (2012).

Durante el estudio de comunidades microbianas mediante secuenciación masiva, luego del análisis bioinformático, cada secuencia se corresponderá con una *Operational Taxonomic Unit* (OTU), unidad de categorización de microorganismos en base a la similitud de secuencia. Así, por ejemplo, el análisis de amplicones de 16S puede resultar en millones de *reads* y estas corresponderse a miles de OTUs (Nguyen et al., 2015).

Complejas comunidades de microorganismos están presentes en casi todos los ambientes, incluidos aquellos que están estrechamente asociados a humanos, animales y plantas (Yarza et al., 2014). El análisis genómico de las mismas se ha convertido en una herramienta importante para entender la evolución y biodiversidad funcional y ecológica en muestras complejas. Estas tecnologías son más rápidas y evitan la necesidad de cultivar y/o aislar organismos en muestras ambientales típicas como suelo, agua, sedimentos o contenido intestinal (Shokralla et al., 2012). Estas tecnologías también presentan una serie de limitaciones como el manejo del elevado volumen de datos generado la necesidad de infraestructura computacional adecuada y la ausencia de bases de datos y recursos *-ómicos* (López de Heredia, 2016). Sin embargo, la amplificación por PCR del gen codificante para la subunidad pequeña de ARN ribosomal o ARNr 16S produce varios cientos de miles de nuevas secuencias al año y ha revelado una gran diversidad previamente oculta (Yarza et al., 2014).

En cuanto al análisis de comunidades bacterianas en muestras de agua ambientales, se han reportado estudios mediante secuenciación masiva en plantas potabilizadoras de agua (Douterelo et al., 2014b; Perrin et al., 2019) en aguas residuales (Hu et al., 2012) así como también en el mar y estuarios (Wang et al., 2017). Esto ha permitido conocer las comunidades microbianas en un tiempo y espacio determinado, Sin embargo, escasos estudios se han centrado en cambios espaciotemporales de las comunidades bacterianas y su correlación con factores físicos y químicos del medio ambiente (Kaevska et al., 2016)

Si bien la secuenciación del gen codificante para el ARNr 16S es un método popular para al análisis de comunidades microbianas, los protocolos que se utilizan varían considerablemente según los *primers* utilizados para la amplificación, secuenciación o la tecnología de secuenciación, la calidad del filtrado y el agrupamiento o *clustering* (Tremblay et al., 2015). Además, la precisión de los resultados obtenidos depende del método de extracción de ADN utilizado, las condiciones en las que se guarda la muestra problema, la selección del *primer* y las condiciones de PCR (Laursen et al., 2017). Como fue mencionado anteriormente, la secuenciación 16S puede ser realizada ya sea ligando secuencias adaptadoras y de *barcode* a los amplicones obtenidos realizando la PCR con *primers* convencionales (Meyer et al., 2008), o de manera más simple, mediante el uso de oligonucleótidos de mayor tamaño que además de los *primers* convencionales hacia el extremo 3' incluyen secuencias *barcode* (Berry et al., 2011; Binladen et al., 2007; Kennedy et al., 2014). En cuanto al desarrollo de esta técnica, la PCR con *barcodes* asume de manera implícita que el adaptador y la secuencia de nucleótidos del *barcode* adyacentes al *primer* específico de la secuencia blanco no interactúa con la misma de manera, promoviendo una amplificación selectiva (Berry et al., 2011). Algunos estudios plantean que modificar el *primer* agregando estas secuencias además podrían contribuir a un menor sesgo en la secuenciación de microARNs (transcriptomas) (Alon et al., 2011; Kennedy et al., 2014).

Debido a que el presente estudio involucra la generación de una tecnología de estudio y detección de comunidades microbianas, esto no se tomará como premisa, sino que se realizarán pruebas para el estudio de la comunidad presente en muestras ambientales mediante ambos métodos. Por un lado, la secuenciación de muestras amplificadas con *primers* convencionales y por otro de muestras amplificadas con *primers* unidos a etiquetas o barcodes.

Antecedentes específicos y justificación

Debido a la intensificación del uso de actividades que afectan la calidad del agua, es imperiosa la necesidad de alcanzar buenas condiciones ecológicas en los cursos de agua, para su uso saludable y sustentable. Si bien la eutrofización (que trae como consecuencia floraciones tóxicas) y la contaminación con sustancias como pesticidas, metales pesados e hidrocarburos, causan cambios en la estructura comunitaria de las bacterias heterótrofas, estos cambios son poco conocidos. También son desconocidos los efectos combinados de la eutrofización y la contaminación, que constituyen un riesgo potencial al que nuestros ecosistemas acuáticos más importantes y explotados están cada día más expuestos.

Los estuarios son áreas dinámicas de alta productividad en la transición entre un río y el ambiente marino. Junto con las zonas costeras son fuente de procesamiento de grandes cantidades del agua, la cual se mueve a través de una cuenca. Son áreas que soportan recursos vitales, siendo hábitat de fuentes de alimento para el consumo humano (peces, bivalvos), áreas de turismo, recreación, entre otros servicios ecosistémicos. Debido a esto, ocurre el vertido constante de sólidos y líquidos contaminantes al estuario, desde aguas residuales y fuentes difusas como escorrentías urbanas y agrícolas. Esto representa históricamente una gran preocupación tanto a nivel ecológico como económico (Malham et al., 2014; Pandey et al., 2014). Estudios previos identificaron marcadas diferencias en la abundancia y a la composición de las comunidades bacterianas a lo largo del gradiente de salinidad, encontrándose una mayor diversidad microbiana en la zona media del estuario (zona frontal) (Alonso et al., 2010). Es ampliamente discutido en ecología microbiana, si la distribución de las comunidades se ajusta a patrones biogeográficos como los que explican la distribución de las comunidades macroscópicas. Por otro lado, si bien las bacterias poseen ciertos atributos fisiológicos y morfológicos que les otorgan altas tasas de evolución y dispersión, algunos autores sugieren que su gran capacidad de dispersión y colonización de diversos ambientes estaría condicionada únicamente por el filtro ambiental (Bertoglio, 2016). En los ecosistemas acuáticos por ejemplo, está bien documentado que existen diferencias en la composición de las comunidades bacterianas a nivel de clase dados por la salinidad del agua y su temperatura (Andersson et al., 2010; Eiler et al., 2014). Según lo reportado por Alonso et al., (2010) se han visto diferencias en la dominancia de ciertas clases según la zona del estuario, por ejemplo las *Alfaproteobacterias* dominan la zona de mayor salinidad, las *Betaproteobacterias* en las zonas con menor salinidad (agua dulce), y las *Flavobacterias* se han observado asociadas a las zonas de máxima turbidez en estuarios.

En el marco del proyecto “Herramientas para el monitoreo de floraciones de cianobacterias nocivas” o Proyecto FAN (ANII LATU 2012-2014) dirigido por las Dras. Claudia Piccini y Carla Kurk (Kruk et al., 2015), estudio el estuario del Río de la Plata con el objetivo de analizar aquellas variables ambientales bióticas y abióticas del gradiente estuarino en presencia y ausencia de floraciones de cianobacterias tóxicas durante un año. Se reportó la dinámica de las poblaciones de productores primarios en general y de las poblaciones tóxicas de los mismos en particular (Figura 5) (Martínez de la Escalera et al., 2014, 2017b).

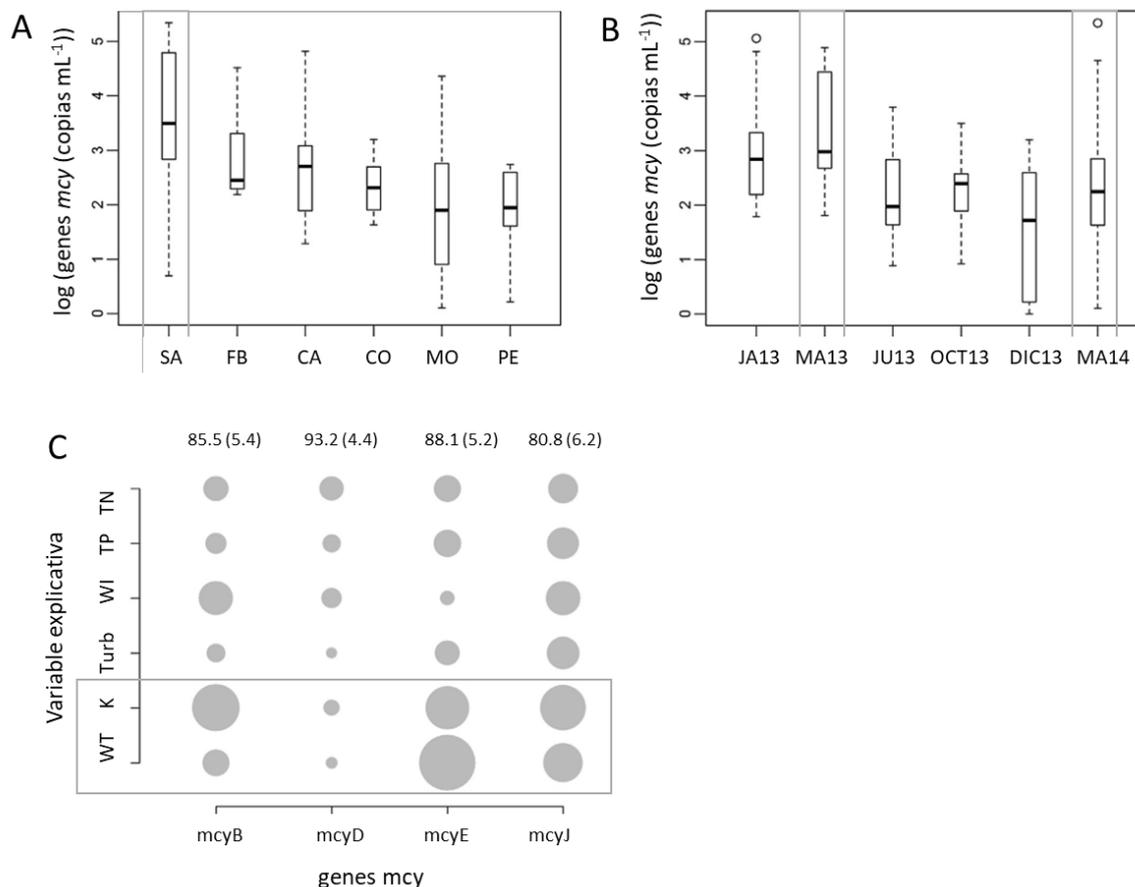


Figura 5. Antecedentes A. Número de células tóxicas de *Microcystis spp./mL* (evaluado por qPCR de genes involucrados en la síntesis de microcistinas) para distintos sitios de muestreo en el año 2013 (SA=Salto Grande, FB=Frías Bentos, CA=Carmelo, CO=Colonia, MO=Montevideo, PE=Punta del Este). B. en muestras de Marzo (MA) 2014 (14) y 2013 (13) JA13=Enero 2013, JU=Julio 2013, OCT=Octubre, DIC=Diciembre. C. Variables explicativas de la presencia de células tóxicas de *Microcystis spp* (WT=Temperatura del agua, K=Salinidad, Tur=Turbidez, WI=Intensidad de viento, TN=Nitrógeno total, TP= Fósforo total). Adaptado desde Martínez de la Escalera et al., (2017a).

Esta propuesta se enmarca un proyecto de mayor escala titulado “Generación de un método basado en secuenciación masiva para detectar microorganismos nocivos en muestras de agua” (FMV_1_2014_1_104673), el cual se encuentra en marcha dirigido por el Dr. José Sotelo con la colaboración de la Dra. Claudia Piccini, el Dr. Andrés Iriarte y el Dr. Pablo Zunino en el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE). Dicho proyecto tiene como objetivo el desarrollo de una herramienta basada en secuenciación masiva y bioinformática, que permita el estudio de la comunidad bacteriana mediante secuenciación de ARNr 16S en muestras ambientales de agua, así como la presencia de islas de patogenicidad y toxicidad típicas de dichos grupos.

En los últimos años la secuenciación utilizando *barcodes* ha sido ampliamente utilizada, ya que ofrece ventajas de costo y tiempo (Kennedy et al., 2014). Sin embargo, es de nuestro interés evaluar los resultados obtenidos en comparación con los mismos *primers* sin estas secuencias adaptadoras, de manera de seleccionar una estrategia a ser utilizada para secuenciación del ADNr 16S en las muestras de agua. Una vez obtenidos los datos, es posible realizar estudios de diversidad de las comunidades microbianas presentes. Dichos estudios se realizarán en base a

la implementación de técnicas de secuenciación masiva en muestras del gradiente Río Uruguay – Río de la Plata.

A partir de lo mencionado anteriormente, establecemos dos hipótesis principales y sus predicciones:

1. la introducción de secuencias *barcode* en los *primers* empleados para amplificar el gen del ARNr 16S interfiere con la reacción en cadena de la polimerasa, aumentando o disminuyendo la eficiencia de amplificación de determinadas secuencias. Esto genera un sesgo en los productos obtenidos que se reflejará en la estructura comunitaria obtenida.

2. dado que el gradiente ambiental estudiado (río Uruguay-Río de la Plata) involucra grandes variaciones de conductividad (empleada aquí como proxy de salinidad) y de temperatura, éstas son las principales variables que estructuran a las comunidades bacterianas en dicho gradiente.

OBJETIVO GENERAL

Conocer la diversidad bacteriana en muestras de agua en el gradiente ambiental río Uruguay-Río de la Plata a partir de la puesta punto de una metodología basada en secuenciación de amplicones del gen ARNr 16S y usando la tecnología *Ion Torrent PGM (Life Technologies)* (Independiente de kits comerciales).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar si el empleo de *primers* con *barcodes* es adecuado para amplificar por PCR el gen del ARNr 16S y estudiar la estructura comunitaria de las bacterias acuáticas.
2. Estudiar la diversidad de comunidades del gradiente estuarino y obtener una aproximación del estudio de estas en relación con las variables ambientales que muestran mayor cambio a lo largo del gradiente ambiental.

ACTIVIDADES

1. Obtener ADN genómico de muestras de agua tomadas en campañas de muestreo realizadas durante el período marzo 2013 y marzo 2014.
2. Amplificar y secuenciar la región V4 del gen codificante para el ARNr 16S bacteriano mediante PCR a partir del ADN obtenido, utilizando *primers* con y sin *barcodes*.
3. Secuenciar los productos de amplificación mediante la tecnología *Ion Torrent PGM (Life Technologies)* y comparar los resultados obtenidos de utilizar ambos tipos de *primers*.
4. A partir de los resultados obtenidos en 3, seleccionar la mejor estrategia de amplificación para evaluar la estructura de la comunidad bacteriana en el río Uruguay y en el Río de la Plata.
5. Analizar a partir de la base de datos obtenida la estructura de las comunidades bacterianas en el contexto ambiental del gradiente agua dulce-estuario.

En la figura 6 se presentan los tres pasos claves en los que se desarrolla el presente estudio.

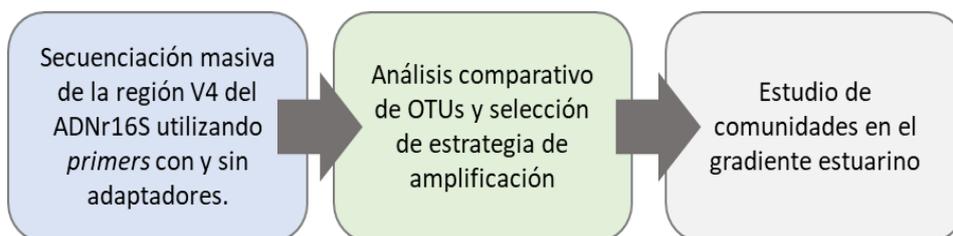


Figura 6. Diagrama de flujo de trabajo.

Metodología

Muestreo

En este trabajo se utilizaron 8 muestras del río Uruguay y del Río de la Plata obtenidas en el marco del proyecto FAN (Kruk et al., 2015) durante el mes de marzo de los años 2013 y 2014 en puntos localizados en Salto Grande, Fray Bentos, Carmelo, Colonia, Montevideo y Punta del Este.

Dentro del pool de muestras disponibles, se seleccionaron aquellas tomadas en estaciones de muestreo en costa (CO) (Figura 7). Se cuenta con información en dichos sitios recabada por de distintas variables ambientales tales como: intensidad del viento (ms^{-1}), intensidad de la luz medida con fotorradiómetro ($\mu\text{mol fotón m}^2 \text{seg}^{-1}$), temperatura del aire ($^{\circ}\text{C}$) y profundidad de la columna de agua (m) medida con ecosonda. También se registraron en superficie y fondo la temperatura ($^{\circ}\text{C}$), conductividad (mScm^{-1}), oxígeno disuelto (OD, mgL^{-1}), turbidez (NTU) y salinidad del agua. Además, se utilizó información acerca del registro visual de la presencia o ausencia de floraciones, definidas como manchas verdes, y la presencia de colonias de cianobacterias en un volumen de 20 L de agua superficial observado en un recipiente de color blanco. Se determinó además la concentración de nutrientes (NH_4^+ , nitrógeno total, fósforo total (PT)), alcalinidad (silicatos), y biovolumen total de cianobacterias (mm^3/L) (Kruk et al., 2015; Martínez de la Escalera et al., 2017a).



Figura 7. Mapa de los sectores del Río Uruguay y del Río de la Plata cuyas muestras correspondientes al mes de marzo se analizarán en este proyecto.

Es importante resaltar que se seleccionó el mes de marzo ya que fue cuando se registró la presencia de una floración de cianobacterias de la especie *Microcystis aeruginosa* en el embalse de la represa de Salto Grande (Kruk et al., 2015). Esto nos permitió estudiar la influencia de la floración de cianobacterias en la diversidad de la comunidad heterótrofa. Se incluyeron dos muestras del mes de marzo del año 2014, (MAR14SACO y MAR14PECO), ya que correspondían

a los extremos del gradiente, pero en ausencia de floración en ese año. El ADN genómico correspondiente a estas últimas fue provisto por la Dra. Gabriela Martínez De La Escalera.

Extracción de ADN genómico de muestras de agua

Se realizó la extracción de ADN genómico de las muestras de agua tomadas a lo largo del gradiente estuarino durante el mes de marzo en el año 2013 y parte del 2014, en estaciones de costa (Tabla 1). Se partió de filtros de membrana de celulosa de 0.2 μm de tamaño de poro, a través de los cuales habían sido filtrados entre 250-300 mL de agua de muestra. Los filtros se encontraban almacenados en placas de Petri estériles a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. La extracción se llevó a cabo utilizando un método físico puesto a punto y descrito por Gabriela Martínez de la Escalera et al., (2017a). Se colocó medio filtro dentro de un tubo de lisis al cual se agregó buffer de extracción (Tris-HCl 100 mM (pH 8.0), EDTA 100 mM (pH 8.0), Na-P 100 mM (pH 8.0), NaCl 1.5 M, 1% Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB)). A continuación, se colocaron los tubos dentro del homogeneizador Fast-Prep (MP Biomedicals) durante 40 segundos. Luego, se centrifugaron a 12000g durante 1 minuto, y se transfirió el sobrenadante a tubos estériles. A continuación, se realizó una extracción utilizando cloroformo y alcohol isoamílico (24:1), mezclando y extrayendo la fase acuosa a nuevos tubos estériles. Dicho paso se repitió dos veces. Finalmente se realizó un paso de precipitación del ADN utilizando isopropanol, homogeneizando moderadamente e incubando los tubos a temperatura ambiente durante 24 horas. Se centrifugaron los tubos a 25.000 g durante 1 hora. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con etanol al 70%. Los pellets fueron secados a temperatura ambiente durante 30 minutos y se re-suspendidos en agua desionizada. El ADN obtenido fue cuantificado por espectrofotometría a 260 nm en Nanodrop (Thermo-Fisher). La concentración de ADN de cada muestra fue estandarizada a aproximadamente 25 ng/ μL , mediante el secado de las muestras en el Speedvac (Thermo-Fisher) (Martínez de la Escalera et al., 2017a).

Tabla 1. Sitios de referencia y coordenadas correspondientes de las estaciones muestreadas.

Localidad	Codigo de muestra	Mes	Sitio de referencia	Latitud	Longitud	Distancia a Costa (km)	Profundidad (m)
Carmelo	MARCACO	Marzo 2013	Entre Punta Piedras y muelle	34°00'	58°23'	2,4	6,5
Punta del Este	MAR14PECO	Marzo 2014	Playa Mansa	31° 11'	57°52'	0,1	14,0
	MARPECO	Marzo 2013					
Salto (RU)	MAR14SACO	Marzo 2014	Brazo Itapebí	34°55'	54°58'	0,5	7,0
	MARSACO	Marzo 2013					
Colonia	MARCOCO	Marzo 2013	Ensenada de la Colonia	34°27'	57°51'	0,01	2,0
Montevideo	MARMOCO	Marzo 2013	Playa Pocitos	34°55'	56°08'	0,03	2,3
Fray Bentos	MARFRAYCO	Marzo 2013	Al S de la PNN	33°10'	58°21'	0,02	1,5

Estrategia de amplificación del gen ADNr 16S por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

Se utilizó una estrategia de amplificación que incluyó el uso de *primers* con y sin *barcode* para el análisis de la comunidad de tres muestras seleccionadas. Dichas muestras se seleccionaron en base a su lugar de origen, correspondiendo a los extremos del gradiente. De esta manera se contemplaron las condiciones ambientales extremas, una muestra de río, en presencia y ausencia de floración (MARSACO y MAR14SACO respectivamente) y una muestra de la zona externa del estuario (MARPECO). Se evaluó por un lado el uso de *primers* con *barcode* seguido de la secuenciación en Ion Torrent, y por otro lado *primers* sin estas secuencias, incluyendo previo a la secuenciación un paso de ligación de secuencias *barcode* y adaptadores (construcción de librería). El flujo de trabajo realizado para el procesamiento de las muestras y el análisis comparativo de la comunidad microbiana mediante secuenciación masiva se ilustra en la figura 8.

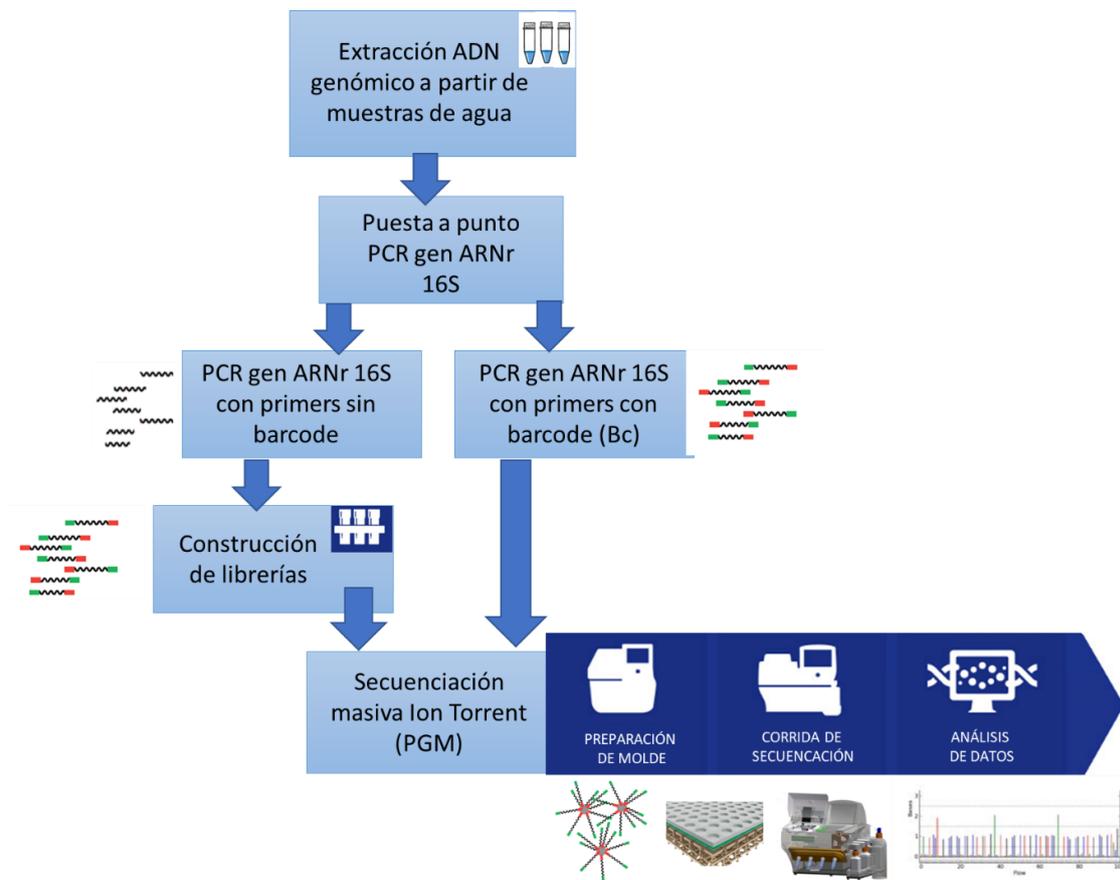


Figura 8. Flujo de trabajo para el ingreso de los productos de amplificación al secuenciador Ion Torrent PGM.

Se amplificó por PCR la región V4 del gen codificante para el ARNr 16S (Figura 9), utilizando dos pares de *primers* específicos universales (520F,802R), uno de los cuales contiene secuencias identificadoras o *barcodes* y secuencias adaptadoras ya incorporadas (520Fbc, 802Rbc) (Milani et al., 2013) (Tabla 2). Los mismos fueron gentilmente cedidos por Jorge Wenzel y Claudia Etchebehere (comunicación personal).

Tabla 2. *Primers* utilizados en este trabajo para la amplificación de la región V4 del ADNr 16S.

Nombre	Secuencia adaptadora	Key	Tag barcode Codigo de barras	Secuencia GAT	Secuencia del primer (5'-3')	Ref.
520Fbc	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	TGAGCGGAAC	GAT	AYTGGGYDTAAAGNG	Milani <i>et al</i> 2013, Claesson <i>et al</i> 2009
802Rbc	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT				TACNVGGGTATCTAATCC	
520F	-	-	-	-	AYTGGGYDTAAAGNG	RDP database, http://pyro.cme.msu.edu /pyro/help.jsp
802R					TACNVGGGTATCTAATCC	

Debido a que dichos *primers* fueron reportados en un estudio que no fue realizado en una matriz acuática, los mismos fueron testeados en la base de datos de RNA Silva utilizando la herramienta TestPrime (<https://www.arb-silva.de/search/testprime>), permitiendo 0 bases en discrepancia o *mismatches*. Hasta el momento dichos *primers* se encuentran reportados para el análisis de microbiota intestinal y fecal de humano (Claesson *et al.*, 2009; Milani *et al.*, 2013). Sin embargo, utilizando la base de datos de SILVA alinearon con el 88.7% de las bacterias y un 13.7% de las archaeas reportadas. De esta manera los *primers* se consideraron aptos.

Se ensayaron diversas preparaciones para PCR (*mix*) tanto comerciales como no comerciales, así como también distintas temperaturas de *annealing* y ciclados que permitieran la amplificación del fragmento deseado utilizando ambos pares de *primers*. El mejor el protocolo de PCR empleado fue el que utilizó una mix puesta a punto previamente en el laboratorio para muestras ambientales y el mismo se utilizó para los *primers* 520F, 802R y 520Fbc, 802Rbc (*Primers* 10 µM, 1 µL cada uno, Buffer Taq 2,5 µL, Taq 5U/ µL (Invitrogen) 0.2 µL, MgCl₂ 1.75 µL, dNTPs 10 Mm 0,5 µL, BSA 30 mM 0.5 µL (0,6 mM finales), ADN molde 10-50 ng 2 µL, H₂O a completar 50 µL). Se amplificó por triplicado en un volumen de 50 µL el ADN genómico extraído de las muestras correspondientes al mes de marzo, MARSACO, MAR14SACO y MARPECO, MARFRACO, MARCACO, MARCOCO, MARMOCO, MAR14PECO utilizando los *primers* con y sin barcode para evaluar el posible sesgo presentado por el uso de *barcodes* (Tabla 3). El ciclado consistió en una etapa inicial de desnaturalización 95°C 5 min, seguida de 30 ciclos de 94°C 30 s, 50°C 30 s y 72°C 30 s y una extensión final 72°C, 7 min. Los productos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,8%, buffer TBE, y se visualizaon a través de la tinción con el agente intercalante *GelRed* (Biotium). A continuación, se enviaron a secuenciar solamente las muestras especificadas en la Tabla 3.

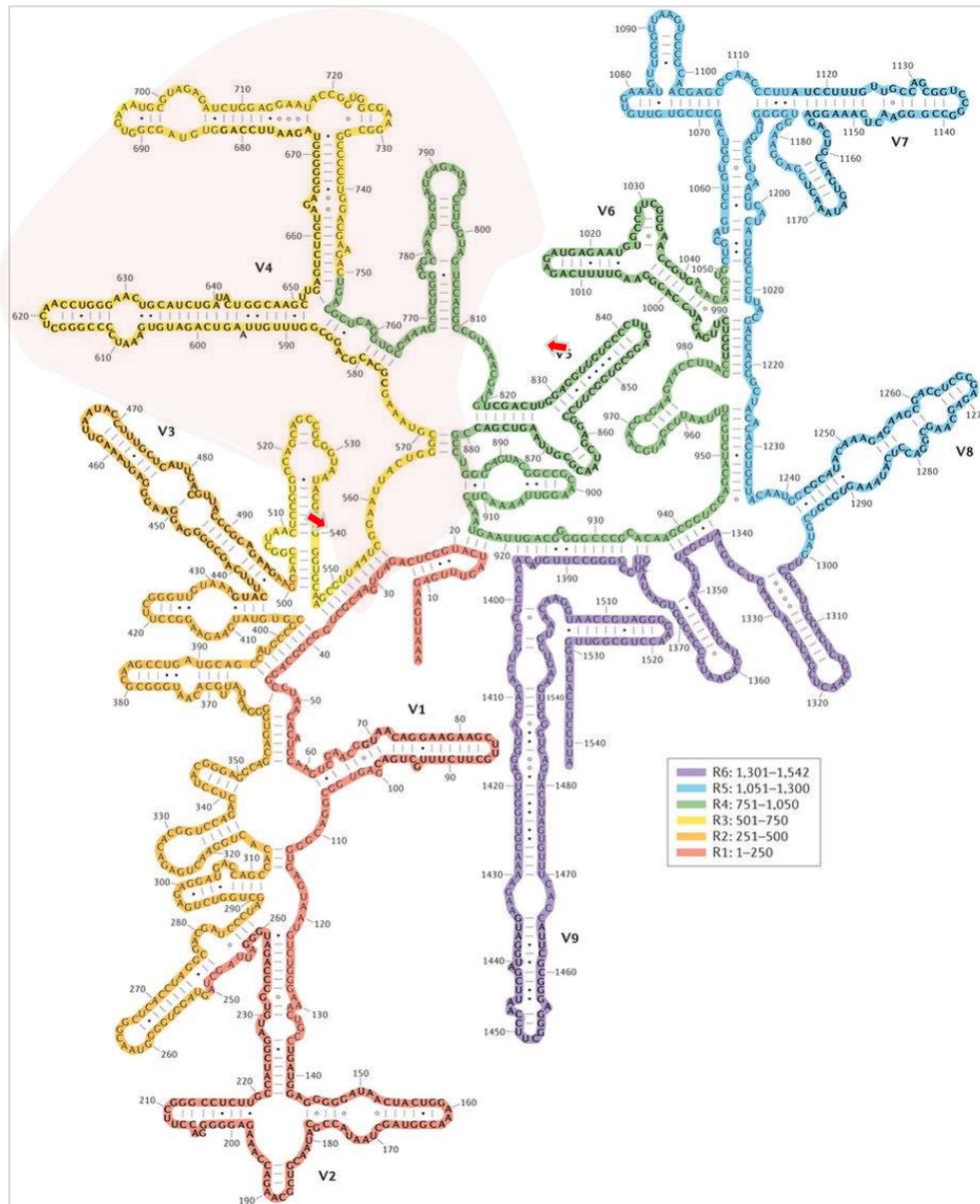


Figura 9. Esquema de la estructura secundaria del ARN 16S de *Escherichia coli* y clasificado en 6 fragmentos R de aproximadamente 250 nucleótidos designados de acuerdo a las regiones V. R1 incluyendo las regiones V1 y V2; R2 la región V3; R3 la región V4; R4 las regiones V5 y V6; R5 las regiones V7 y V8 y R6 la región V9 (Yarza et al., 2014). Las flechas señalan la posición de los primers utilizados.

Tabla 3. Primers empleados para amplificar la región V4 del ADNr 16S y muestras secuenciadas.

Código de muestra	Amplificada con primers sin barcode	Amplificada con primers con barcode	Secuenciada	
	520F, 802R (A)	520Fbc, 802Rbc (B)		
MAR14PECO	X	X	A	B
MARPECO	X	X	A	B
MAR14SACO	X	X	A	B
MARSACO	X	X	A	
MARFRACO	X	X	A	
MARCACO	X	X	A	
MARCOCO	X	X	A	
MARMOCO	X	X	A	

Procesamiento de muestras previo a la secuenciación

Todos los productos de PCR obtenidos se purificaron utilizando el kit AMPure™ (Ion AmpliSeq Library Kit 2.0) y cuantificaron utilizando Qubit™ 2.0 (ThermoFisher). El kit fue recomendado por Zimmerman and Fuscoe, 1991, y elimina dímeros de *primers* y productos remanentes de la PCR utilizando partículas paramagnéticas que unen al ADN reversiblemente a una matriz de PEG (Poli-eliten-glicol) y sal (Life Technologies, 2012). Los productos obtenidos utilizando los *primers* 520Fbc, 802Rbc se cargaron directamente al chip Ion 318™ con previo enriquecimiento de las esferas (PCR en emulsión). Los productos obtenidos utilizando los *primers* 520F, 802R se utilizaron para la construcción de librerías. Se ligaron a las secuencias adaptadoras y *barcode* específicas para la secuenciación mediante el protocolo descrito para la construcción de librerías de Ion Torrent y puesto a punto por Rafael Fort (comunicación personal) en el Servicio de Secuenciación del IIBCE. Una vez lograda la amplificación de las muestras de agua ambientales, estas fueron secuenciadas utilizando Ion Torrent PGM.

Análisis de resultados de secuenciación en Ion Torrent

Análisis de secuencias crudas, obtención de OTUs (*OTU picking*) y asignación de taxonomía.

Se realizó la secuenciación en la plataforma de secuenciación Ion Torrent PGM (Life Technology) del IIBCE, seguido por el análisis de los resultados según se indica en la figura 10. Dicho análisis se realizó con el objetivo de comparar 1- La comunidad bacteriana obtenida utilizando *primers* con *barcodes* y sin ellos, 2- La comunidad bacteriana presente en el gradiente de estudio y en presencia y ausencia de floración.

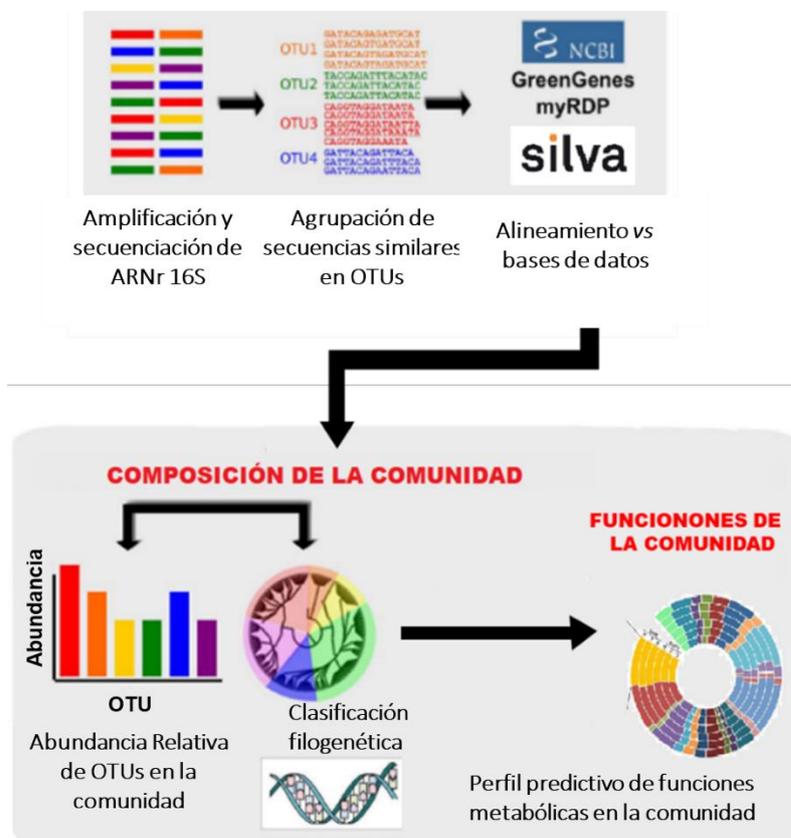


Figura 10. Esquema de flujo de trabajo para el análisis de secuencias crudas, OTU picking, asignación de taxonomía y estudios de funcionalidad en muestras ambientales.

Se procedió al análisis de acuerdo al diagrama de flujo mostrado en la figura 11. Los *reads* obtenidas de la secuenciación de las muestras se guardaron en un archivo FASTA (.fna) los cuales fueron procesados mediante el uso de pipelines de programa QIIME 2.0 (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) (Caporaso et al., 2010). Se convirtió el archivo a Fastq (*quality score file*, el cual contiene un *score* para cada base de cada secuencia), se realizó el de-multiplexado (asignación de cada lectura a una muestra según su *barcode*) y se eliminaron los *primers* y secuencias barcode de los extremos de cada secuencia, secuencias de baja calidad o ambiguas, con errores y/o carencia de la secuencia barcode, *primers* y adaptadores, en base a un score de calidad ≥ 25 y una longitud de 200-300 pb (*Quality filtering, trimming tool*, http://qiime.org/scripts/split_libraries.html). Se realizó la detección y filtración de secuencias quimeras utilizando el programa VSEARCH y la base de datos de referencia UCHIME (<https://docs.qiime2.org/2017.12/plugins/available/vsearch>), junto con la base de datos de secuencias de ARN 16S Silva con taxones definidos según un 97% de identidad de secuencia (SILVA_123.1_SSURef_Nr97_tax, <https://www.arb-silva.de>). Stackebrandt & Goebel, 1994 reportaron que un 97% de similitud de las secuencias 16S corresponde aproximadamente al valor de re-asociación del ADN de un 70%, siendo aceptado como definición de especies bacterianas por Wayne et al.,(1987).

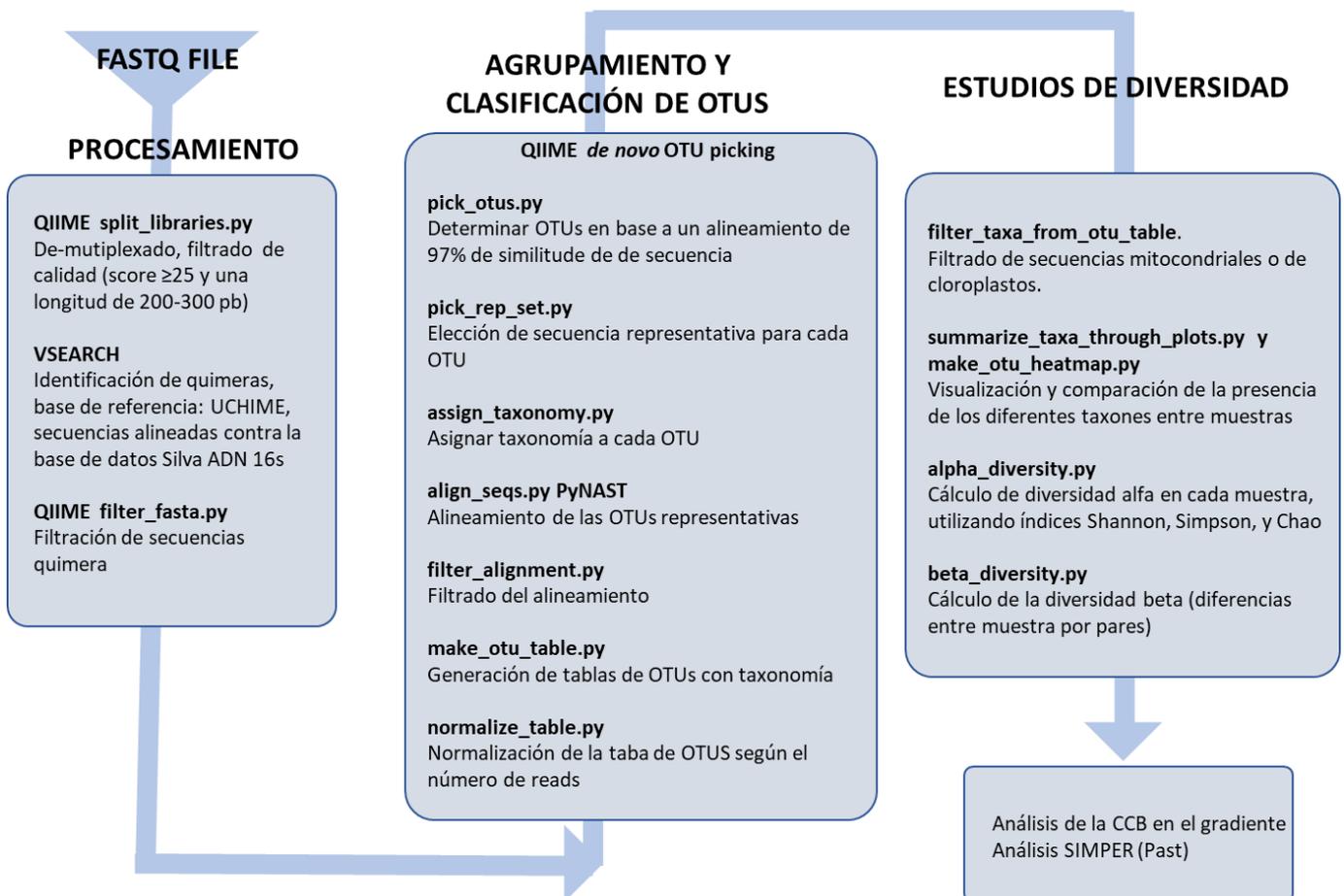


Figura 11. Diagrama de procesamiento, clasificación y estudio de diversidad a partir de secuencias crudas. CCB: Composición de la Comunidad Bacteriana.

Para la definición de las unidades taxonómicas operativas u OTUs se generaron grupos o *clusters* con todas aquellas secuencias cuya identidad fuera mayor al 97%. Se tomó la secuencia representativa de cada OTU (consenso) y se les asignó la taxonomía utilizando la base de datos de ARN 16S SILVA (<https://www.arb-silva.de>). Se eliminaron las secuencias *singletons* (secuencias que aparecen una sola vez en todo el *pool* de muestras). También se eliminaron las secuencias que alinearon con ARN 16S de organelos (mitocondrias y cloroplastos). Una vez asignada la taxonomía, se realizó el alineamiento de todas las OTUs representativas de manera de inferir la filogenia utilizando PyNASt (Python Nearest Alignment Space Termination) (Caporaso et al., 2009), la cual se utilizó en pasos posteriores. Luego se filtró el alineamiento para remover *gaps* utilizando QIIME *Lane mask* (Caporaso et al., 2010) y mediante la asignación de taxonomía y el mapa de OTUs se creó una tabla conteniendo la abundancia de cada OTU en cada una de las muestras, en conjunto con la taxonomía para cada OTU (Tabla de OTUs en formato BIOM) (`pick_de_novo_otus.py`).

Se obtuvo un resumen de dicha tabla (`biom summarize-table`) y se graficaron los resultados de taxonomía asignada para cada muestra a distintos niveles (`summarize_taxa_through_plots.py`).

Estudio de la estructura comunitaria

Se realizó la rarefacción de la tabla de OTUs obtenida de manera de computar la riqueza para cada muestra. Se obtuvieron los gráficos de rarefacción (`multiple_rarefactions.py`) y se analizó la diversidad alfa definida como la riqueza de especies de una comunidad particular considerada como homogénea (Thukral, 2017). Asimismo, se realizaron gráficos de rarefacción utilizando la función `make_rarefaction_plots.py`. El número de OTUs observadas fue calculado a partir de los mismos con el objetivo de obtener información acerca de la riqueza a medida que aumenta el número de secuencias obtenido, el índice de Diversidad Filogenética (PD *whole tree*, Anexo 1) para poder determinar la distancia en el árbol filogenético de esas especies. La herramienta FastTree se utilizó para la obtención de árboles, utilizando máxima verosimilitud (Price et al., 2010). El índice de Diversidad Filogenética permite determinar cuán diversa es la muestra en términos de distancia entre las OTUs asignadas (dispersión filogenética). También se realizó la rarefacción mediante el cálculo de la diversidad de Chao (`alpha_diversity.py`, Anexo 1), el cual al realizar una ponderación para las OTUs que se encuentran en *doubletons*, le da peso a aquellas OTUs con baja representación en la comunidad (Schnell & Safi, 2016). Un mínimo de 10 secuencias fue seleccionado por muestra y un máximo equivalente al cociente entre la mediana y el número de secuencias totales, con 20 conteos intermedios.

Para realizar análisis comparativos de la diversidad en muestras amplificadas con y sin barcode, las muestras se normalizaron a la suma de OTUs individualmente, de manera de analizar el posible sesgo entre ellas, considerando una misma muestra amplificada mediante los dos métodos. Se aplicó un análisis SIMPER en Past v3, utilizando la distancia de Bray-Curtis (Anexo 1) (Clarke, 1993) para identificar el porcentaje de contribución de cada OTU a la diferencia entre una muestra amplificada con *primers* y sin *barcode*.

Por otro lado, el análisis de las muestras del gradiente se realizó normalizando a la suma de todas las OTUs del gradiente. Para realizar análisis comparativos, determinar las OTUs representativas del gradiente agua dulce-estuario y realizar diagramas de Venn se utilizaron las funciones de QIIME `shared_phylotypes.py`, `collapse_samples.py`,

filter_taxa_from_otu_table.py, compute_core_microbiome.py y el paquete VennDiagram en RStudio. Se calcularon índices de diversidad de Shannon, Simpson y de riqueza de Chao.1 utilizando el Past 3.20 (Hammer et al., 2001) y analizados con RStudio (paquete ggplot2). Se realizaron gráficos de abundancia relativa de OTUs agrupadas a distintos niveles taxonómicos, tomando en cuenta abundancias mayores al 0,05% (Bertoglio, 2012) en GraphPad Prism 6.

Para estudiar diferencias en la composición de la comunidad bacteriana entre sitios y determinar así la contribución de las abundancias relativas de OTUs a distintos niveles de agrupación, se llevaron a cabo análisis multivariados. Se realizó un análisis de componentes principales PCA (distancia euclidiana) con la abundancia relativa de las OTUs en cada muestra. Dichos análisis se graficaron en 2 dimensiones tomando en cuenta los componentes más explicativos de la varianza en RStudio (funciones prcomp y biplot). Los datos utilizados fueron escalados mediante una matriz de correlación. También se aplicó un análisis SIMPER para identificar el porcentaje de contribución de cada OTU específicamente a las diferencias entre la comunidad de un sitio en ausencia y presencia de floración de cianobacterias.

Para comparar la diversidad se usaron los perfiles de diversidad o entropías (diversidad) de Renyi (Renyi, 1961), a través del uso de índices de diversidad uniparamétricos (Legendre & Legendre, 2000) en RStudio (Vegan), con el objetivo de realizar una comparación escalable de la diversidad de las comunidades. Permite un enfoque combinado que resume riqueza de especies, equitatividad y dominancia además de ser un método gráfico para la exploración de patrones de diversidad (Ec 10) en donde q es el número de especie, p_i es la frecuencia relativa de cada especie i y α es aleatorio.

Ec 10.
$$H_{\alpha} = \frac{1}{1-\alpha} \log \sum_{i=1}^q p_i^{\alpha}$$

Permite obtener curvas de diversidades máximas, media y mínima en función de la entropía y la aleatoriedad dado que el parámetro alfa (α) que puede tomar valores 0, 1 y 2 o infinito. A cada una de las entropías le corresponde un número de diversidad o número de Hill (Legendre & Legendre, 2000). De acuerdo con los valores de α la fórmula da lugar a tres entropías (Ec 11, 12 y 13)

Ec 11. $H_0 = \log q$ (riqueza)

Ec 12. $H_1 = -\sum_{i=1}^q \log p_i = H$ (Índice de Shannon)

Ec 13. $H_2 = -\log \sum p_i^2$ (inverso del índice de Simpson)

De acuerdo con las ecuaciones mencionadas, la diversidad de orden cero ($\alpha = 0$) es insensible a las abundancias de las especies y, por lo tanto, el valor obtenido será equivalente a la riqueza de especies. La diversidad de orden 1, ($\alpha = 1$), todas las especies son incluidas con un peso exactamente proporcional a su abundancia en la comunidad (diversidad de Shannon) Cabe destacar que α puede tomar cualquier valor ya que es continuo. Por tanto, valores de α menores a 1 serán insensibles a la presencia de especies raras, y valores mayores que 1 considerarán más

a las especies comunes, como la diversidad de orden 2 ($\alpha = 1$). Mediante estos fundamentos y a través de las curvas obtenidas, es posible realizar una comparación entre dos comunidades.

Diversidad Beta

Se analizó la diversidad beta realizando la comparación de la comunidad microbiana entre los sitios muestreados en base a su composición (Pierre Legendre et al., 2005). Para dicho análisis se realizó un agrupamiento de los sitios dada su localización geográfica y ecosistémica. Se estudió el agrupamiento *-clustering* - jerárquico utilizando la función `pvclust` y la métrica no filogenética de Bray-Curtis (Bray & Curtis, 1957) (Paquete `vegan`, RStudio) (`beta_diversity_through_plots.py` workflow). La distancia de Bray-Curtis entre un par de muestras, se define realizando una comparación entre la frecuencia característica de cada OTU en las muestras (Anexo 1). La significancia del *clustering* fue estudiada mediante ANOSIM (Análisis de Similitud, Anexo 1) con muestras normalizadas al total de las OTUs en Past v3 (Clarke, 1993) para determinar estadísticamente las diferencias encontradas.

Otros estudios de la distancia o disimilitud entre sitios se realizaron mediante las métricas UniFrac ponderado y no ponderado (Lozupone et al., 2010). UniFrac permite calcular las diferencias cualitativas (no ponderado) y cuantitativas (ponderado) entre las muestras en base a sus relaciones filogenéticas. Para ello, se utilizó la matriz de distancias filogenéticas y los resultados se visualizaron mediante un análisis de coordenadas principales (PCoA) en donde se eligieron aquellas coordenadas que tenían un mayor peso en la distribución de las muestras. Incorporar una métrica de diversidad de este tipo permitió obtener información complementaria, como una forma de relacionar la distancia filogenética en un árbol filogenético con las diferencias que pueden existir entre la comunidad microbiana de cada uno de los componentes del árbol. En otras palabras, UniFrac comprueba si los linajes filogenéticos entre las muestras son significativamente diferentes (Lozupone et al., 2010).

Además, se analizaron las abundancias de rango o *rank abundance* (Diagrama de Whittaker) de cada sitio utilizando el paquete `vegan` (RStudio). La abundancia ranqueada constituye una herramienta cualitativa de describir la manera en la que cada individuo se distribuyen entre las especies (OTUs asignadas). A diferencia de los índices diversidad, permite visualizar la riqueza de especies (OTUs asignadas) y el grado de igualdad de la distribución de la abundancia de las especies (equitatividad) (Whittaker, 1965). Se ordenaron jerárquicamente a las OTUs presentes en cada muestra y se obtuvieron las curvas de rango-abundancia (A la especie más abundante se asignó el rango 1, la segunda más abundante es la 2 y así sucesivamente). Los rangos obtenidos fueron graficados en función de las abundancias relativas para cada OTU en escala logarítmica. La distribución de las especies se evaluó considerando el tipo de curva a la que se ajustó el gráfico y su pendiente.

Se realizó un ajuste de las curvas de rango de abundancia a modelos paramétricos. Esto permitió describir la estructura de las comunidades en términos de la relación entre abundancia relativa de cada OTU y su valor de importancia (ranking en una escala logarítmica). Se probaron dos modelos clásicos de distribuciones de abundancia de especies (SAD, por su sigla en inglés) (Matthews & Whittaker, 2015) muy utilizados (Anexo 1), el modelo *lognormal* (distribución

logarítmica de Poisson) y Zipf o distribución de Pareto. Los ajustes de los datos a dichos modelos se realizaron en RStudio. Vegan 2.4- 4, función Radfit (Oksanen, 2017). La selección del mejor modelo se llevó a cabo mediante el Criterio de Información de Akaike (AIC, por sus siglas en inglés), el cual realiza una comparación de los modelos seleccionados considerando su ajuste y complejidad. Este criterio es recomendado por Matthews & Whittaker,(2015) y Baldrige, Harris, Xiao, & White, 2016 para este tipo de análisis, tomando valores mínimos cuándo el modelo tiene un mayor ajuste. Al mismo tiempo, la pendiente de la curva obtenida otorga información complementaria ya que una pendiente pronunciada indica una baja equitatividad, y una pendiente baja da la pauta de una comunidad equitativa.

Finalmente, se utilizó un escalamiento multidimensional no métrico (nMDS, *Non-Metric Multidimensional Scaling*) y se analizó la relación de las variables ambientales medidas al momento del muestreo utilizando el programa Primer7. Se realizó una ordenación directa con las variables explicativas, seguida de un *test* de permutación para observar que variables se asociaban significativamente con la ordenación. Mediante los gráficos del análisis nMDS se representó la posición de los sitios (comunidades, utilizando la abundancia relativa de las OTUs o los índices de diversidad de cada sitio) en un espacio multidimensional utilizando la distancia de Bray-Curtis y 2 dimensiones. Los vectores de ordenación indicaron la dirección e intensidad de correlación de las variables, obteniéndose el valor del coeficiente de correlación de Pearson.

RESULTADOS

Extracción de ADN genómico de muestras de agua

El ADN se extrajo a partir de las muestras de agua tomadas en el mes de marzo de los sitios Colonia, Punta del Este y Salto. El ADN de las muestras MARFRACO, MARMOCO y MARCACO fue proporcionado por la Dra. Gabriela Martínez de la Escalera (comunicación personal). En el anexo 3 se muestran las concentraciones de ADN genómico obtenidas, el volumen de agua filtrado para cada muestra y los resultados de los índices utilizados para evaluar la calidad del ADN obtenido. En la mayoría de los casos se observó un índice de 260/280 cercano al valor óptimo de 2 (Desjardins & Conklin, 2010). Esto no ocurrió para el índice 260/230, ya que en todas las muestras fue bajo. Se verificó la presencia de una sola banda de ADN genómico y su calidad (ausencia de bandas de degradación) mediante electroforesis (resultado no mostrado). Una vez obtenidos los ADN genómicos de las 8 muestras a procesar, se prosiguió a poner a punto la metodología de amplificación del ADNr 16S utilizando los *primers* 520F, 802R y 520Fbc, 802Rbc.

Amplificación por PCR del gen ADNr 16S

Se amplificaron las muestras MARSACO, MAR14SACO y MARPECO utilizando *primers* sin *barcode*, se obtuvieron bandas intensas en todos los casos y se estimó una concentración aproximada de 300 ng/ μ L al momento de observar el gel, mediante la intensidad de las bandas y utilizando como referencia el marcador de peso molecular. Por otro lado, para los resultados de la amplificación con *barcode*, no se observó banda sembrando 5 μ L y tiñendo con Gelred (Biotium) en el gel de agarosa 1% (Figura 12).

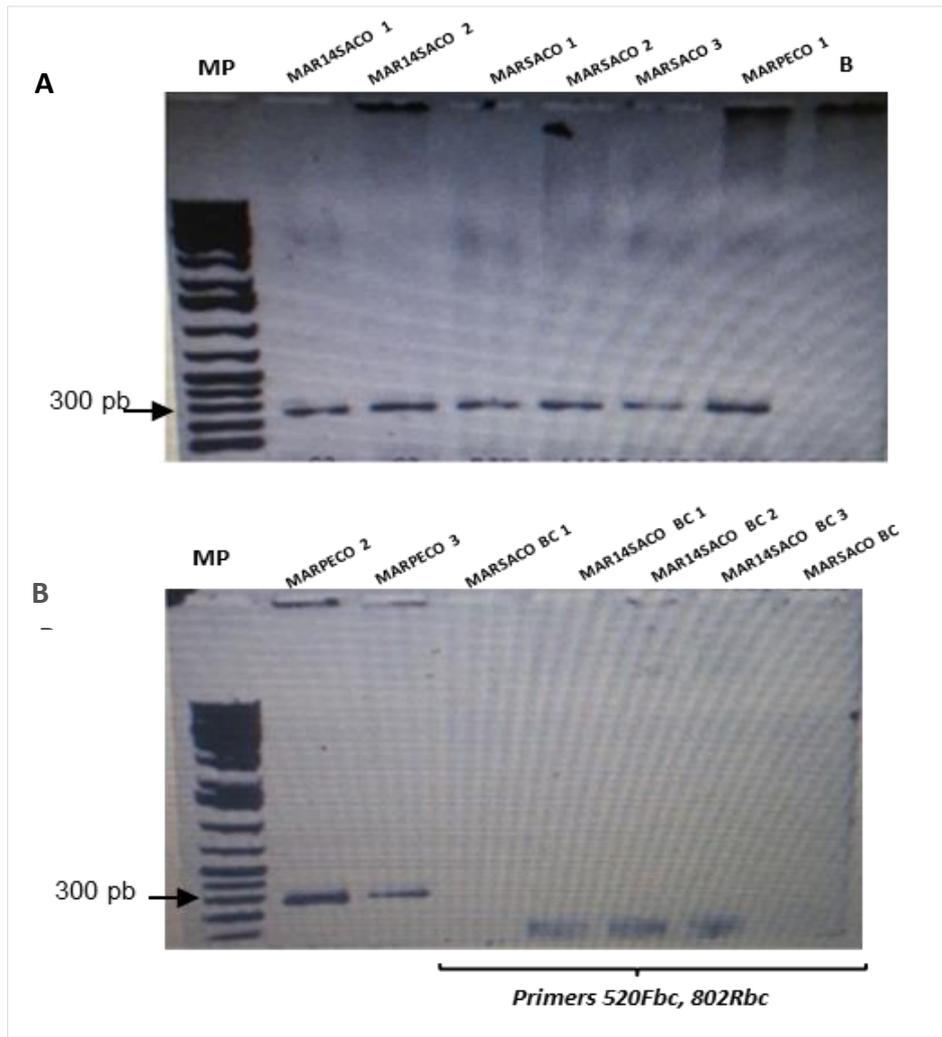


Figura 12. Amplificación por triplicado de muestras MAR14SACO, MARSACO y MARPECO con *primers* 520F y 802R (A y B) y MARSACO, MAR14SACO con los *primers* 520Fbc y 802Rbc (B, con barcode). Resultados no mostrados para la muestra MARPECO con los *primers* 520F y 802R. Para las muestras MAR14SACO con *primers* 520F y 802R y MARSACO con 520Fbc y 802Rbc se muestran solo duplicados. MP-Marcador de peso molecular 1Kb Plus (Thermo-Fisher), B-blanco

Por otro lado, se obtuvo el producto esperado también para las muestras MARMOCO y MARCOCO (Río de la Plata), MARFRACO y MARCACO (Río Uruguay) y MAR14PECO (Zona externa del estuario) con *primers* con y sin *barcode* (Figura 13). La amplificación mejoró notablemente luego del agregado de BSA en las muestras MAR14PECO, MARCACO, MARCOCO para las que se obtuvo una menor concentración de producto de PCR (Anexo 5). Durante la puesta a punto de la metodología se evaluó el agregado de BSA a la reacción de PCR y se observó que para el caso de las muestras MAR14PECO, MARCACO y MARCOCO se obtuvo una banda más intensa en comparación a la *mix* sin BSA (Anexo 5). Se amplificaron todas las muestras agregando BSA en la *mix* de PCR (resultados no mostrados).

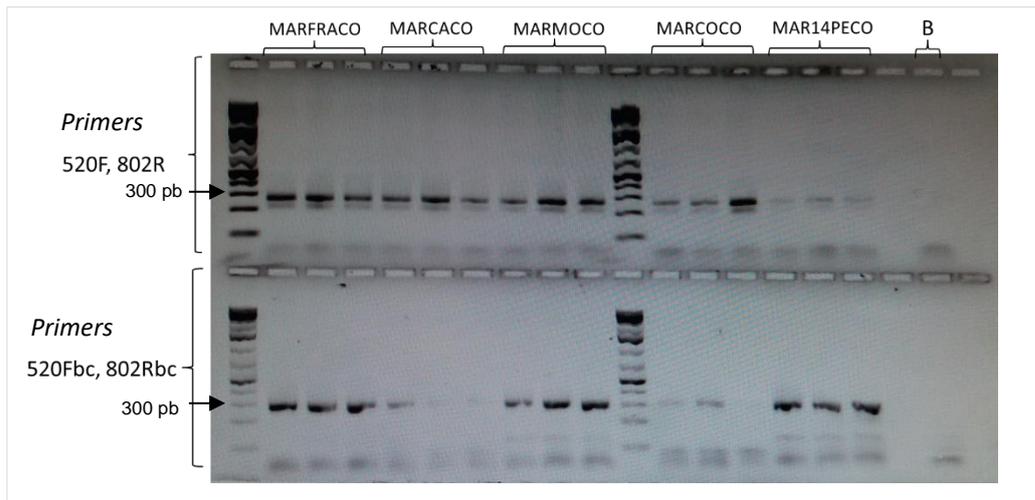


Figura 13. Amplificación sin BSA por triplicado de muestras MARFRACO, MARCACO, MARMOCO, MARCOCO, MAR14PECO con los *primers* 520F y 802R y 520Fbc y 802Rbc. MP-Marcador de peso molecular 1Kb Plus (Thermo-Fisher), B-blanco.

La cantidad de producto de PCR obtenida para todas las muestras fue suficiente para la preparación del molde o *template* de secuenciación en el equipo Ion Torrent. Como se mencionó anteriormente, se enviaron a secuenciar solamente las muestras MARSACO, MAR14SACO y MARPECO amplificadas utilizando *primers* con y sin *barcode*, seleccionadas por ser extremos del gradiente ambiental y presentar las condiciones más diferentes entre sí. Las demás muestras se secuenciaron utilizando *primers* sin *barcode*.

Análisis comparativo de la secuenciación masiva del ADNr 16S en muestras con y sin barcode

a) Número de reads

Se realizó con éxito la secuenciación de las muestras MARSACO (presencia de floración), MAR14SACO y MARPECO, con y sin *barcodes*, de manera de evaluar a las comunidades obtenidas y el posible sesgo introducido. Se obtuvieron un total de 1802230 *reads*, de los cuales se filtraron 35071 secuencias quimeras (1,9%), obteniendo un total de 1767159 *reads*. Luego de realizar los pasos de alineamiento para la generación de las OTUs y el alineamiento contra la base de datos se obtuvo un total de 1611030 *reads* (Figura 14).

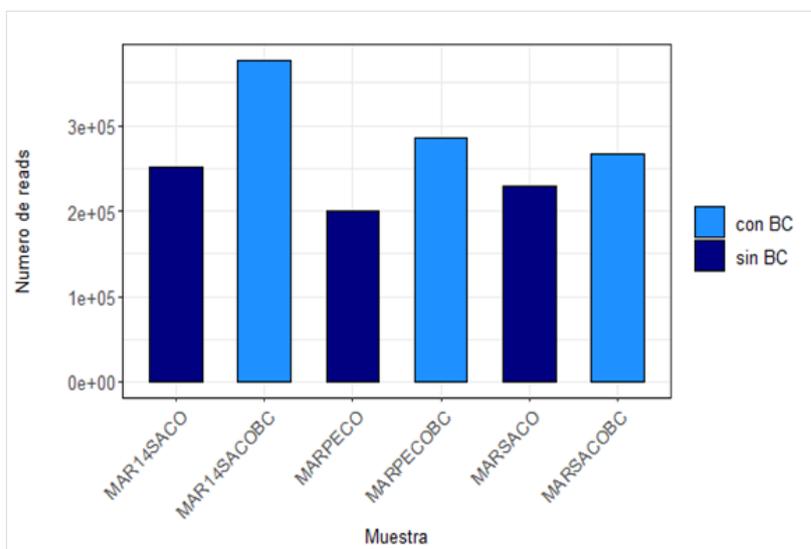


Figura 14. Número de *reads* obtenidos para la secuenciación de muestras con y sin *barcode*

De acuerdo con los resultados obtenidos, se obtuvieron más *reads* en las muestras amplificadas con *barcode* en las 3 muestras analizadas (Figura 14). Una vez obtenida la tabla de OTUs, se analizó la diversidad alfa para las muestras estudiadas. Debido a que muchas perturbaciones afectan a este parámetro, resumir y comparar ecologías a través de la diversidad alfa resulta una estrategia ubicua para analizar estudios de comunidades de ecología microbiana y fue utilizada como un primer enfoque hacia el análisis de las diferencias entre las muestras amplificadas con y sin *barcode*.

b) Diversidad Alfa

En primer lugar, se realizaron las curvas de rarefacción utilizando muestreo al azar dentro de cada muestra (Figura 15). De esta manera, se logró contrastar la diversidad en las muestras de manera equitativa, independientemente de diferencias en tamaños de cada muestra. La condición óptima para estas curvas es la terminación asintótica, lo que significa que no hay diversidad adicional al obtener más secuencias.

En el caso de las curvas mostradas en A, se alcanzó un estado en el que a medida que aumenta el número de OTUs, la distancia filogenética entre ellas no aumenta, observándose una curva asintótica. Para las curvas en C, es posible establecer que el índice de riqueza de especies de Chao.1 varía moderadamente a medida que aumenta el número de OTUs, aunque con una tendencia asintótica menos pronunciada. Este índice de riqueza se basa en el concepto de que las especies raras proporcionan más información sobre el número de especies faltantes y por lo tanto es sensible a ellas, siendo particularmente importante para identificar conjuntos de datos sesgados. Por otra parte, la curva de rarefacción en B no alcanza una tendencia asintótica clara. Sin embargo, al observar la curva de rarefacción en A y en C y su significancia, es posible inferir que mediante el método utilizado se logró captar la diversidad de las muestras adecuadamente dada la profundidad de secuenciación utilizada.

Es posible observar que el mayor número de OTUs fue obtenido para la muestra MARSACO. Además, en todos los casos este número es mayor o similar en las muestras sin *barcode*, al compararlas con las muestras con *barcode*. Las curvas de diversidad filogenética presentan un

patrón similar y las OTUs obtenidas en las muestras sin barcode presentan un mayor índice de diversidad filogenético. Para el índice de Chao.1, las muestras sin barcode presentan siempre un valor más elevado, captando más especies raras que las con barcode.

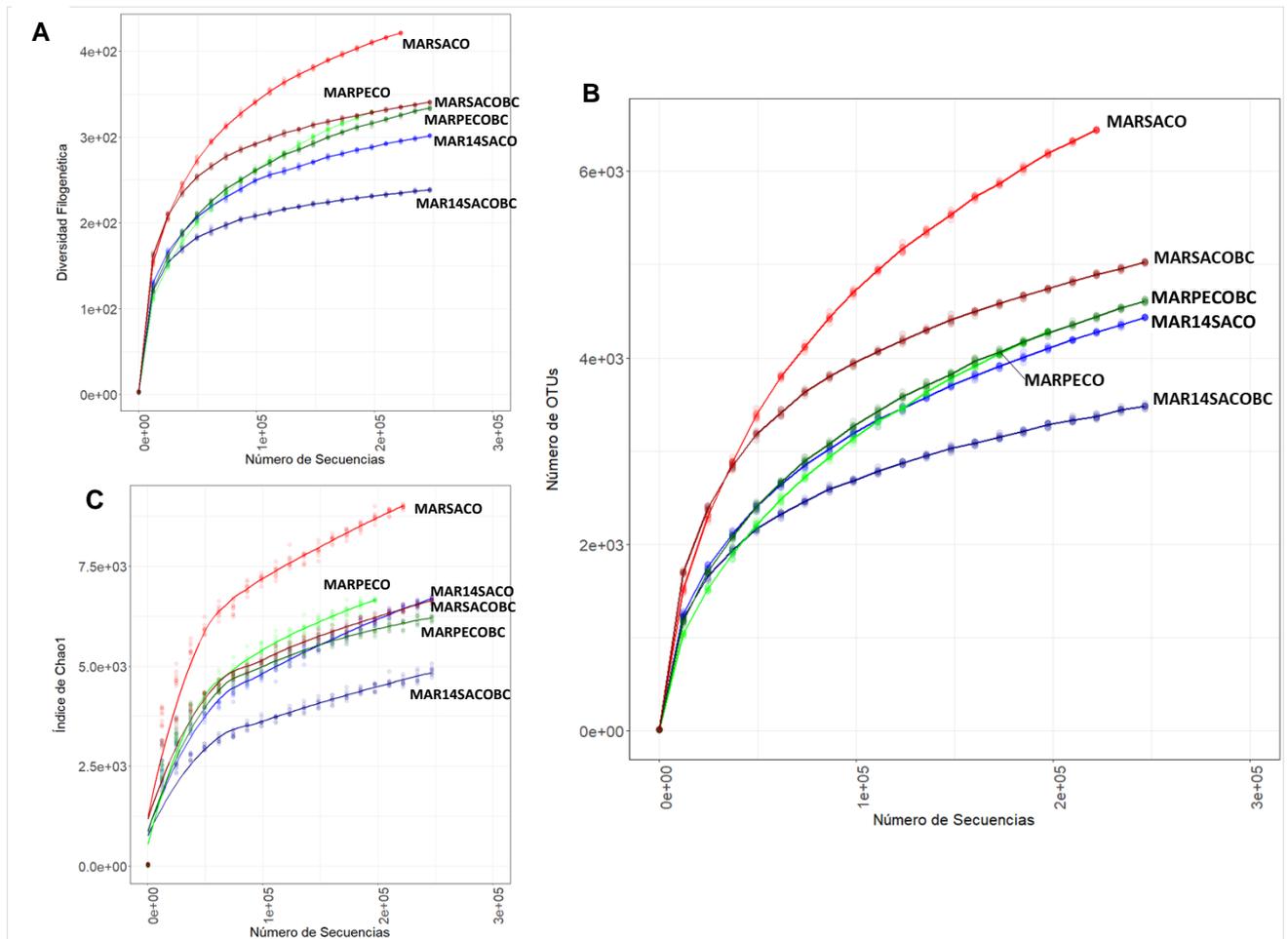


Figura 15. Gráficos de Rarefacción de muestras MARSACO, MARSACOBC, MAR14SACO, MAR14SACOBC, MARPECO y MARPECOBC. A. Rarefacción mediante cálculo de Índice de diversidad filogenética, B. Rarefacción por número de OTUs, C. Rarefacción mediante cálculo de Índice de riqueza de Chao1.

El análisis complementario de la diversidad alfa de las muestras se observa en la figura 16, mediante el cálculo de descriptores de la comunidad: índice de diversidad de Shannon, índice de diversidad de Simpson, riqueza de Chao1, Índice de Dominancia de Simpson, riqueza y abundancia (Anexo 1).

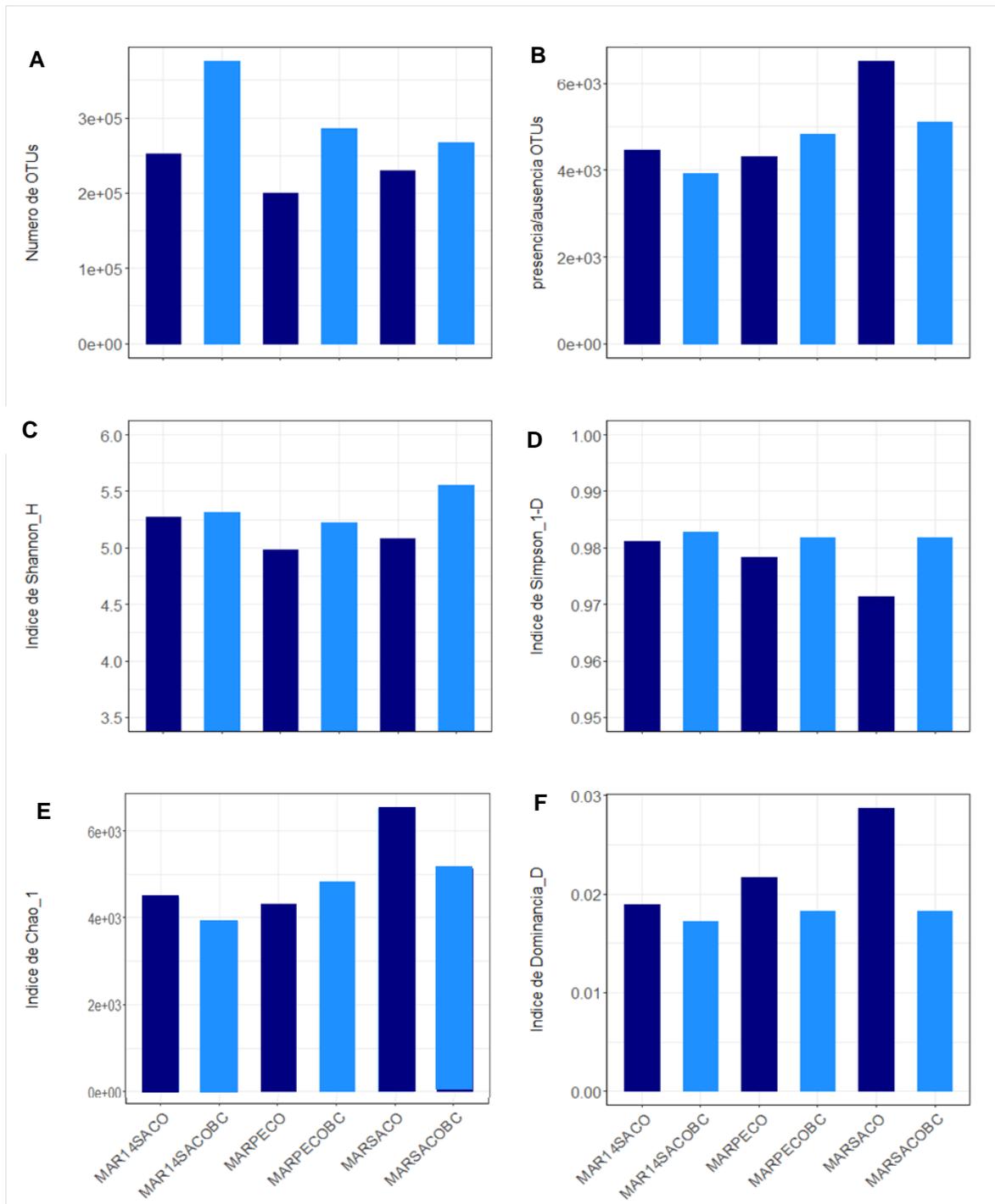


Figura 16. Parámetros descriptivos de la comunidad en muestras MAR14SACO, MARSACO Y MARPECO amplificadas con *primers* con barcode (azul) y sin barcode (celeste). A. Riqueza, B. Abundancia, C. Índice de diversidad de Shannon, D. Índice de diversidad de Simpson, E. Índice de riqueza de Chao1, F. Índice de Dominancia de Simpson (D).

A continuación, en la figura 17 se muestra un resumen de los indicadores de diversidad de Shannon y riqueza de Chao1. Es posible observar la distribución de las muestras en cuanto a su riqueza y equitatividad y a la presencia de especies raras, respectivamente. Se observa un corrimiento hacia la derecha (mayor riqueza de Chao1) de las muestras amplificadas con *primers* sin barcode con respecto a la misma muestra con *barcode*. Al mismo tiempo, las muestras amplificadas con *barcode* presentan un corrimiento hacia arriba con respecto a las sin *barcode* (mayor diversidad de Shannon). Considerando lo anteriormente mencionado, las muestras

amplificadas con *primers* con *barcode* presentan menos riqueza, pero mayor diversidad (mayor equitatividad) que las muestras amplificadas con *primers* sin *barcode*. Estas últimas presentan una mayor riqueza de especies (presencia de especies con baja representación o raras), y por lo tanto menor equitatividad.

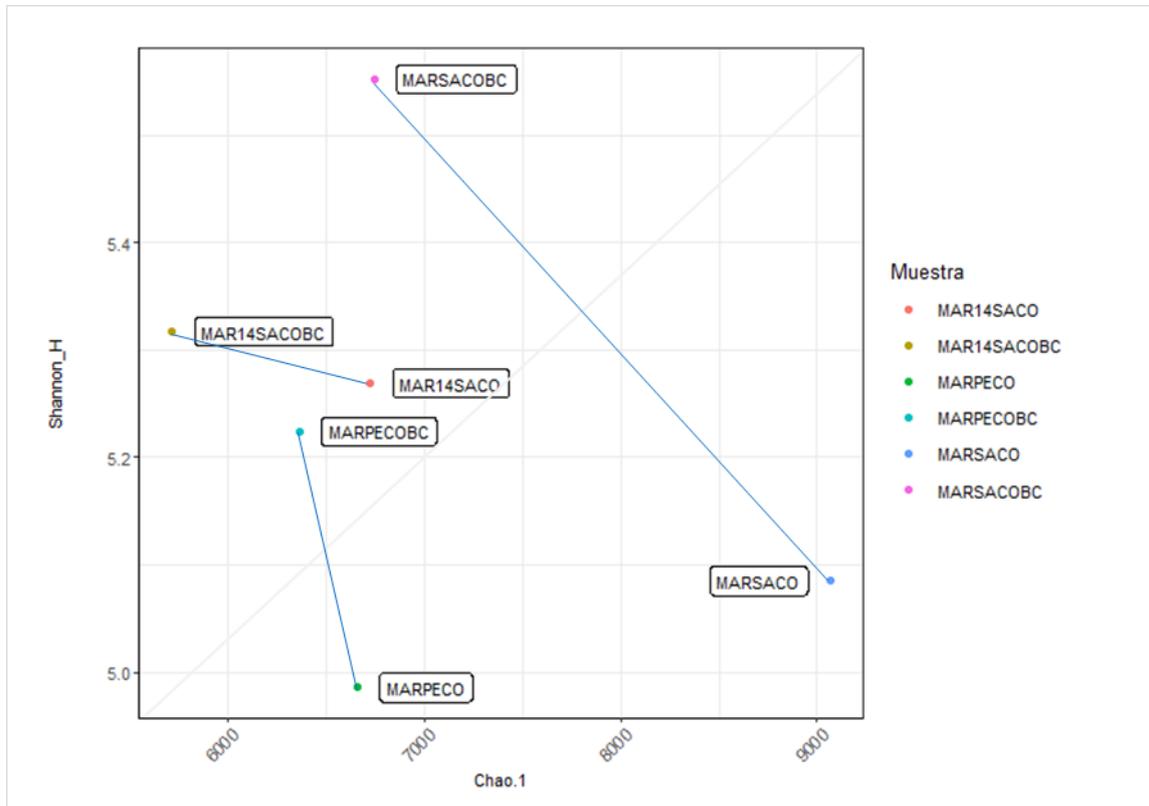


Figura 17. Índice de diversidad de Shannon vs riqueza de Chao1 para las tres muestras obtenidas mediante las dos estrategias de estudio. La línea en azul es trazada para observar las diferencias entre la misma muestra amplificada con y sin *barcode*

Se observaron un total de 34566 OTUs en todas las muestras analizadas, de las cuales se estudió su distribución en las muestras con y sin *barcode*. En la figura 18 se observa el total de OTUs para cada muestra (MARPECO, MARSACO y MAR14SACO) y cuantas comparten entre sí la misma muestra amplificada utilizando las dos estrategias. Se observa que el número de OTUs

compartidas corresponde a un 51%, 41% y 40% en MARPECO, MAR14SACO y MARSACO respectivamente.



Figura 18. Diagramas de Venn representando el número de OTUs en las tres muestras obtenidas mediante las dos estrategias de estudio.

En suma, las muestras amplificadas utilizando *primers* con *barcode* dieron lugar a una menor riqueza, por lo que se recuperó un menor número de OTUs, además de que solo alrededor de un 50% de las mismas son correlativas con la misma muestra amplificadas con *primers* sin *barcode*. Por lo tanto, a priori y considerando las muestras analizadas, es posible establecer que las secuencias *barcode* de los *primers* otorgarían un sesgo hacia las especies más abundantes.

c) Composición de la estructura comunitaria en las muestras con y sin *barcode*

Con el objetivo de estudiar la similitud de las muestras en base a la composición de la comunidad microbiana observada mediante el uso del *barcode* y sin él, se realizó en primer lugar un *clustering* jerárquico (iterativo), utilizando la distancia de Bray-Curtis (Figura 19). Los resultados del agrupamiento muestran dos grupos de mayor jerarquía. Uno de los grupos se corresponde con muestras de Salto Grande (ambientes dulceacuícolas), y el otro con muestras de Punta del Este (mayor salinidad). Las diferencias entre la comunidad microbiana de estos grupos se estudiarán en la sección siguiente. A partir de este resultado es posible establecer que, si bien se observan diferencias entre las OTUs obtenidas utilizando ambas estrategias, al comparar la heterogeneidad de la estructura comunitaria en la región, las diferencias entre los sitios son mayores, que entre las muestras con y sin *barcode*. En otras palabras, si bien el *barcode* podría presentar un sesgo hacia las OTUs más abundantes o representadas, las diferencias entre las comunidades obtenidas con y sin *barcode* tienen menor peso que las diferencias entre las comunidades en cada sitio del gradiente estuarino. Es así que las muestras se separan entre sitios, agrupándolas en dos *clusters* principales, río (MARSACO) y zona externa del estuario

(MARPECO). Y en cada *cluster* se agrupa la misma muestra con y sin barcode. Sin embargo, el análisis ANOSIM reveló que si bien este agrupamiento global establece que los sitios en cada grupo son similares entre sí y diferentes a los sitios en otros grupos ($R=0.86$), el mismo no fue significativo ($p=0.067$).

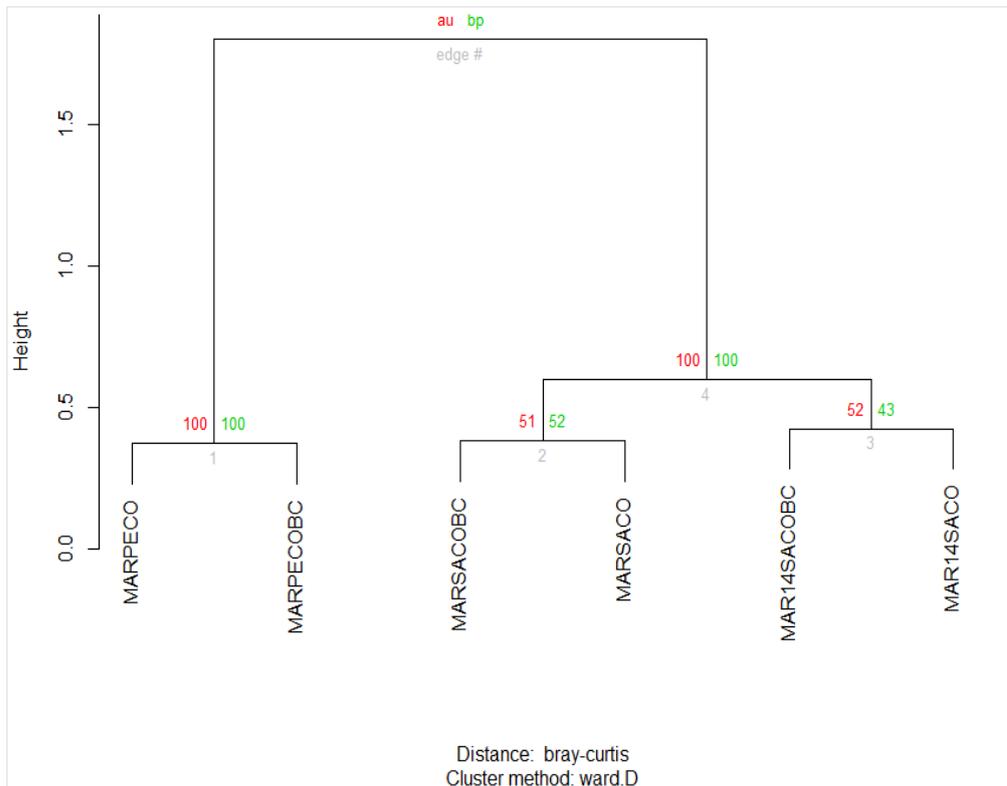


Figura 19. Dendrograma de análisis mediante clustring jerárquico utilizando la distancia de Bray-Curtis. Bootstrap $n=1000$, en RStudio. AU: % valor de re-muestreo bootstrap multiescala, BP: % valor de re-muestreo bootstrap normal. En el eje vertical se observa el valor de la distancia de Bray-Curtis.

Por otra parte, utilizando la métrica UniFrac, se observó un ordenamiento similar (PCoA en tres dimensiones) (Figura 20). Se observa que, de la misma manera que el agrupamiento mediante la distancia de Bray-Curtis, las muestras se ordenan con el eje que explica la mayor variabilidad según al sitio al que pertenecen (ambiente), siendo mayores esas diferencias que las obtenidas mediante la amplificación con y sin barcode. Sin embargo, el análisis revela diferencias en otros de los ejes explicativos, siendo las muestras MARSACO con y sin barcode las que más se diferencian en la composición considerando la distancia filogenética de las OTUs en el árbol. En el análisis UniFrac ponderado, el cual considera las abundancias relativas, estas diferencias son menores en MAR14SACO y MARSACO, aunque mayores en MARPECO.

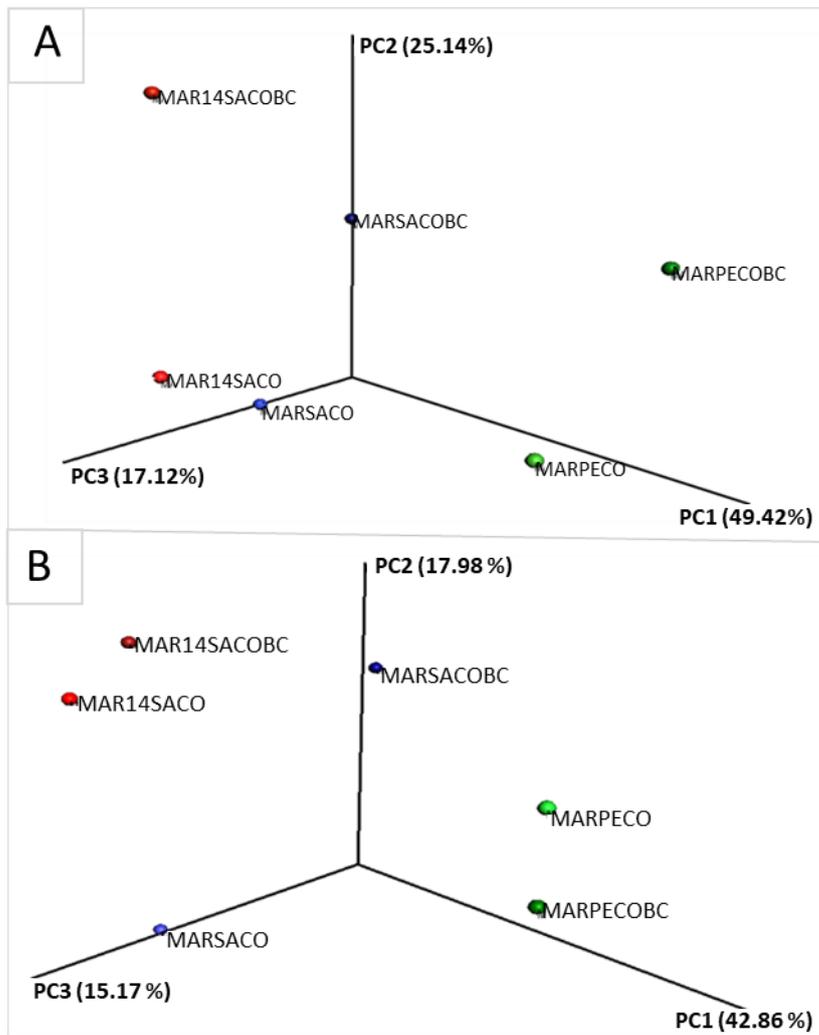


Figura 20. Resultados de PCoA, (UniFrac,QIIME), para las muestras MARSACO, MAR14SACO y MARPECO con y sin *barcode*. A- Ponderado. Las distancias de UniFrac se calcularon utilizando el árbol filogenético de máxima verosimilitud y la abundancia de cada taxón. B-No ponderado. Los valores numéricos entre paréntesis junto a los nombres de los ejes muestran el porcentaje de variabilidad que puede explicarse por la ubicación a lo largo de cada eje.

De acuerdo con lo mostrado anteriormente, es posible observar que al secuenciar muestras del gradiente, el *primer* con *barcode* logra captar la diversidad de manera que una misma muestra amplificada con y sin *barcode* presenta mayor similitud que con otras muestras del gradiente, aunque esto no es estadísticamente significativo. Sin embargo, utilizando el análisis de la métrica UniFrac, se observa que existen diferencias menos marcadas, aunque presentes en las muestras de un mismo sitio amplificadas con *primers* con y sin *barcode*. Estas diferencias estarían relacionadas con la composición de OTUs y sus abundancias relativas considerando el árbol filogenético en el que se ordenan. Partiendo de la base de que el agregado de secuencias *barcode* altera la secuencia del primer, es posible identificar aquellas OTUs responsables de esas diferencias en cada sitio.

En el sitio MARSACO se obtuvo un porcentaje medio de disimilitud de 31%. En la Figura 21 se observan las 9 OTUs que dieron cuenta al menos la mitad de la disimilitud entre las comunidades observadas.

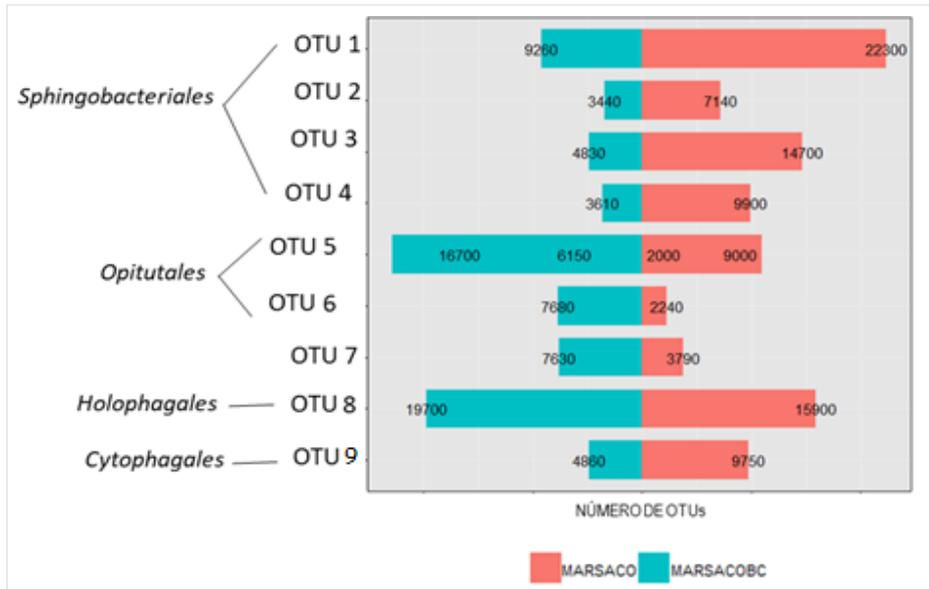


Figura 21. Análisis SIMPER de muestras MARSACO y MARSACOBC. OTUs: 1.Sphingobacteriales_NS11-12_marinegroup_ub, 2.Sphingobacteriales_env.OPS17_ub, 3.Sphingobacteriales_Chitinophagaceae_Dinghuibacter_ub, 4.Sphingobacteriales_Chitinophagaceae_Sediminibacterium_ub, 5.1-5.2.Opitutales_Opitutaceae_Opitus_ub, 6.Opitutae vadinHA64_ub, 7-8.Holophagales_Holophagaceae_marinegroup_ub, 9.Cytophagales_Cytophagaceae_ub= bacteria no cultivable

Por otro lado, para la muestra MAR14SACO, se obtuvo un porcentaje medio de disimilitud de 38%. Considerando la contribución acumulada de cada OTU, las abundancias de 10 OTUS fueron clave para observar dichas diferencias entre muestras. (Figura 22).

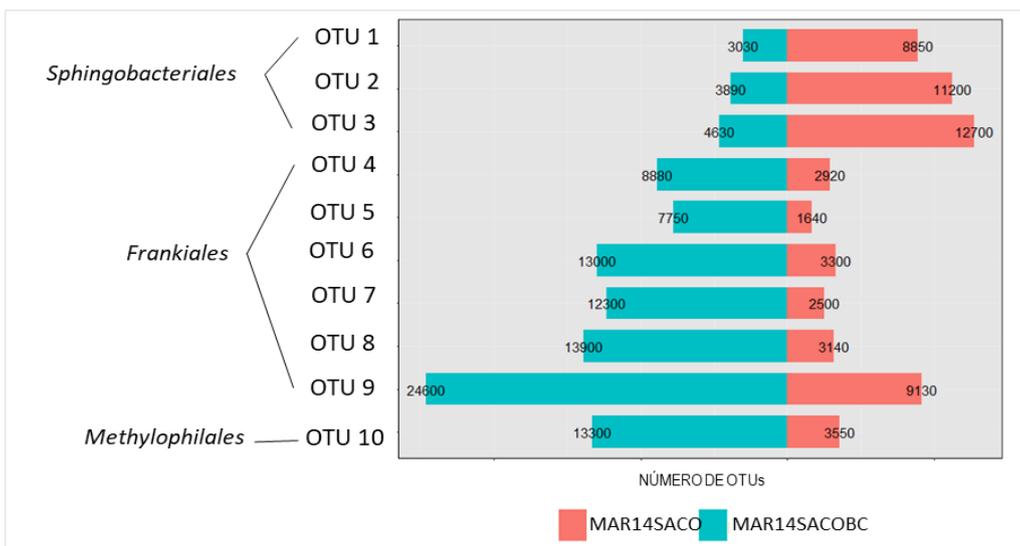


Figura 22. Análisis SIMPER de muestras MAR14SACO y MAR14SACOB. OTUs: 1. Sphingobacteriales_Chitinophagaceae_Dinghuibacter, 2.Sphingobacteriales_Chitinophagaceae_Sediminibacterium, 3. Sphingobacteriales_NS11-12 marine group_ub, 4-9.Frankiales_Sporichthyaceae_hgcl clade, 10.Methylophilales_Methylophilaceae_Candidatus Methylophilus. ub=Bacteria no cultivable.

Por otro lado, para la muestra MARPECO, se obtuvo un porcentaje medio de disimilitud de 35%. Las abundancias de 8 OTUS fueron clave para observar dicha diferencia entre muestras (Figura 23).

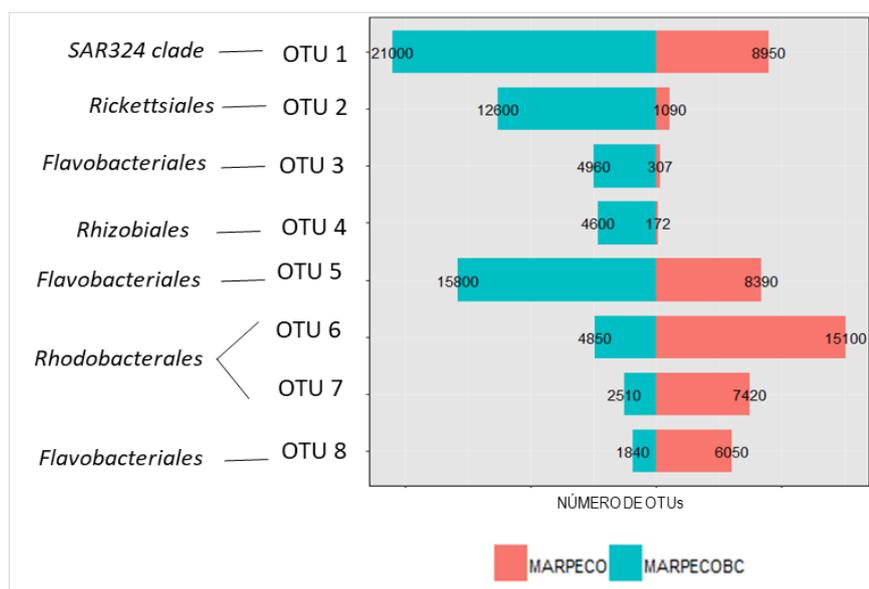


Figura 23. Análisis SIMPER de muestras MARPECO y MARPECOBC. OTUs: 1.SAR324 clade(Marine group B)_uncultured bacterium, 2.Rickettsiales_SAR116 clade_ub, 3.Flavobacteriales_Flavobacteriaceae_uncultured_Rhizobiales_Rhodobiaceae_Rhodobium, 4.Flavobacteriales_Flavobacteriaceae_NS5marinegroup_unculturedbacterium, 5.Rhodobacterales_Rhodobacteraceae_uncultured_uncultured_Rhodobacteraceae_ub,6-7.Rhodobacterales_Rhodobacteraceae_uncultured_ub,8.Flavobacteriales_Flavobacteriaceae_NS4 marine group. ub=Bacteria no cultivable

Determinadas OTUs resultaron representadas diferencialmente en comparación con la muestra sin *barcode* y fueron asignadas a Órdenes que resultaron particularmente abundantes de la comunidad de MARSACO (Río Uruguay) y en MARPECO (Zona externa del estuario, Océano Atlántico). A partir de los resultados presentados, se deduce que existe una mayor abundancia de determinadas OTUs en las muestras amplificadas con *barcode* (Figura 21,22 y 23), y que dichas OTUs fueron abundantes en todas las muestras.

Es posible establecer que los *primers* con *barcode* introducen un sesgo debido a la presencia de secuencias añadidas, con efectos sobre los taxones de Sphingobacteriales, Opitutales, Holophagales, Rhodobiacteriales y Flavobacteriales. Además, en la estructura comunitaria observada, de manera que, si bien comparte alrededor de un 50% de las OTUs, aquellas más representadas se ven enriquecidas. Por tanto, es posible que haya habido pérdidas en la recuperación de especies raras, es decir a una pérdida de la riqueza observada. En base a lo anteriormente mencionado, se procedió a continuación a estudiar la comunidad del gradiente utilizando *primers* sin *barcode*.

Estructura de las comunidades bacterianas del gradiente Salto-Punta del Este.

Se obtuvieron un total de 1.103.857 *reads* en la secuenciación de las muestras tomadas en el gradiente durante el mes de marzo en el 2013. Luego de evaluar la calidad de éstos, 36.538

fueron eliminados por tener un tamaño menor a 200 pb. Además, el porcentaje de secuencias quiméricas fue de aproximadamente un 3%, por lo que el número final de secuencias de trabajo luego de los pasos de filtrado fue de 839.296 *reads* (Anexo 7).

Una vez realizado el procesamiento previo, se realizó la asignación de las OTUs, obteniéndose un total de 38950 OTUs en todo el gradiente, de las cuales 340 son comunes a los sitios en río, estuario y la zona externa (*core microbiota*) (Figura 24).

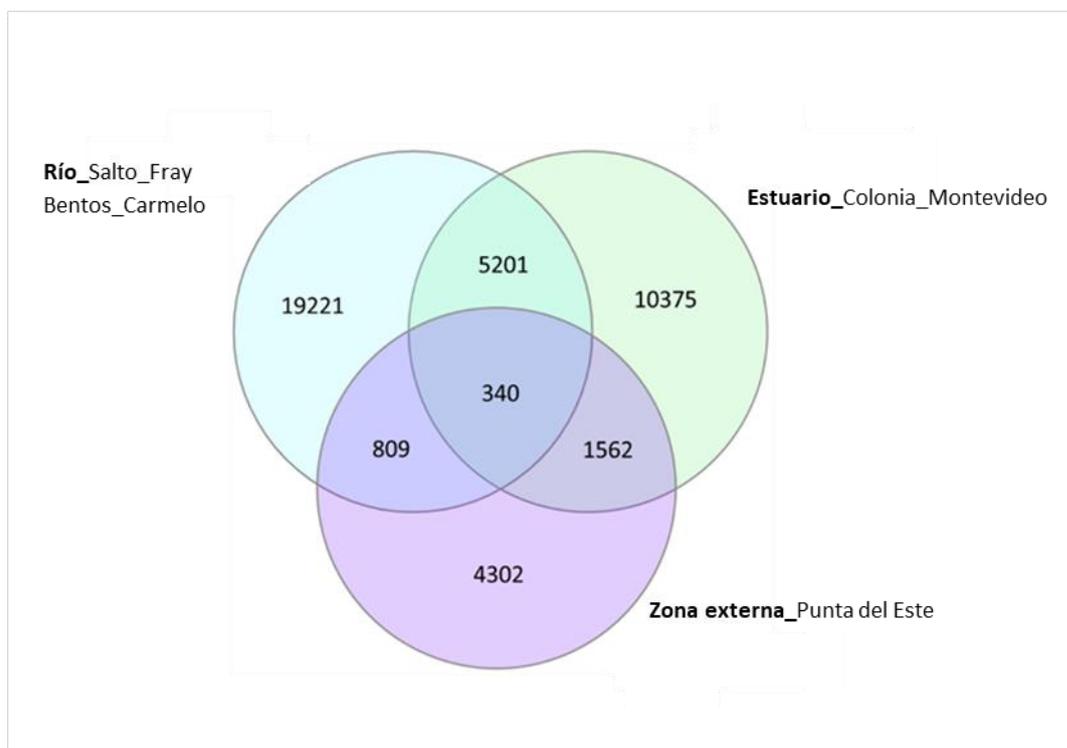


Figura 24. Diagramas de Venn representando el número de OTUs compartidos en los sitios del gradiente.

Considerando el número de OTUs compartidas entre muestras del gradiente, 173 de ellas correspondieron al filo Proteobacteria, clase Actinoabacteria y perteneciente al clado SAR11 (representando un 50%). También estuvieron mayormente representados el filo Bacteroidetes (clase Sphingobacteriia y clase Holophagae (grupos marinos)).

Diversidad Alfa en el gradiente Salto-Punta del Este

Se realizaron las curvas de para cada muestra (Figura 25), con el objetivo de comparar y analizar la diversidad obtenida en los sitios de muestreo. Comparando las curvas obtenidas para los índices calculados, la curva de número de OTUs no presenta una tendencia asintótica. Sin embargo, para los índices de Chao1 y diversidad filogenética en las muestras MARPECO y MARSACO se observa una tendencia asintótica. En base a esto, los resultados de las curvas de rarefacción obtenidas mostraron que fue posible captar la comunidad microbiana presente en los sitios de estudio. Al comparar las curvas de rarefacción entre sitios vemos que el mayor

número de OTUs fue obtenido para la muestra MARCACO, y que la muestra MARFRACO es la que posee más OTUs observadas a un menor número de secuencias analizadas.

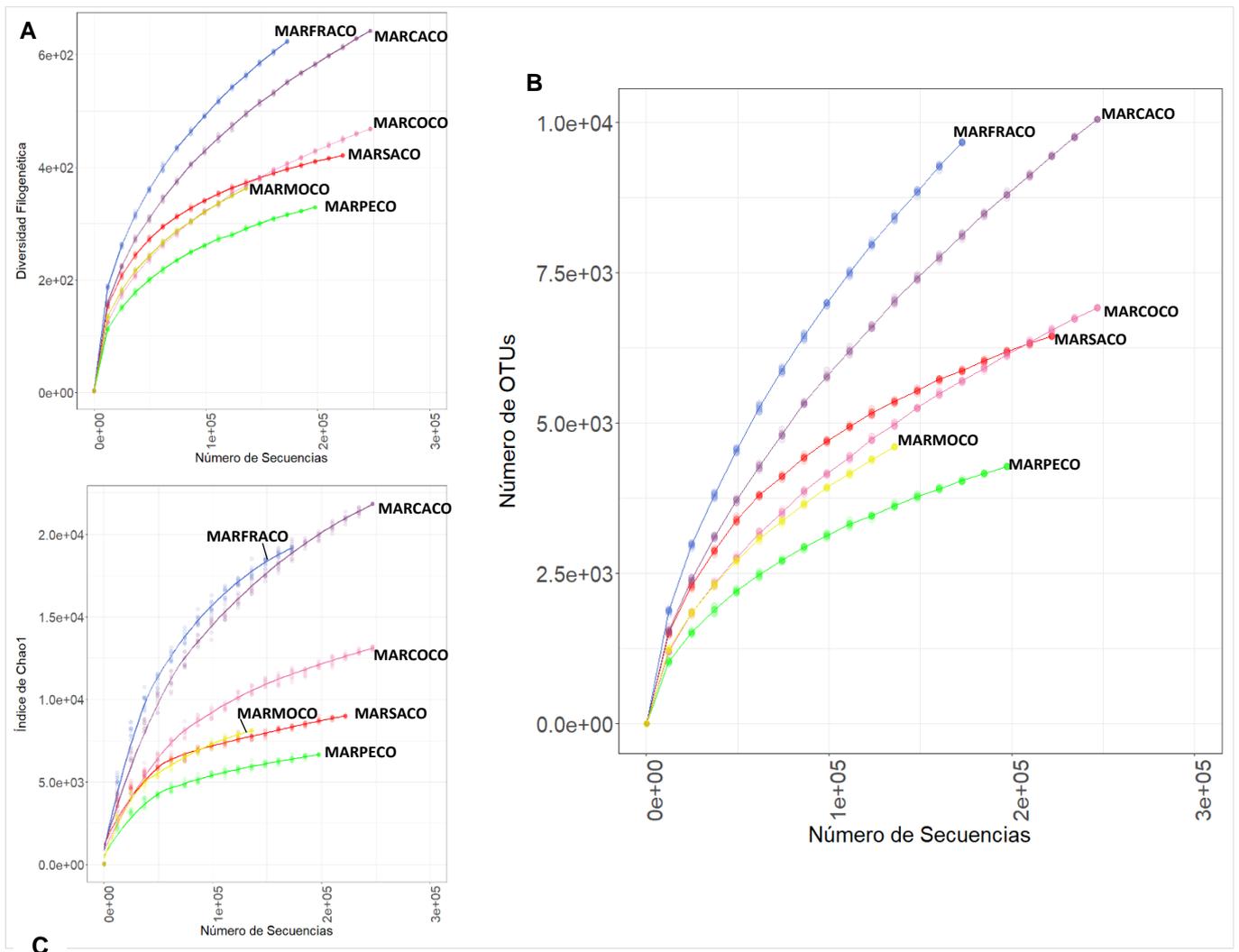


Figura 25. Gráficos de Rarefacción de muestras del gradiente: MARSACO, MARFRACO, MARCACO, MARCOCO, MARMOCO, MARPECO.

El análisis complementario de la diversidad alfa se realizó mediante el cálculo de descriptores de la comunidad (Figura 26): índice de diversidad de Shannon, índice de diversidad de Simpson, riqueza de Chao1, Índice de Dominancia de Simpson, riqueza y abundancia (Anexo 1). Es posible observar que el Río posee una mayor riqueza y diversidad que la zona de mezclado y el extremo del estuario. En particular, para la zona de MARSACO, la riqueza es menor, existe una mayor dominancia de OTUs y se observan menos OTUs raras. Hacia el estuario, la riqueza y diversidad disminuyen.

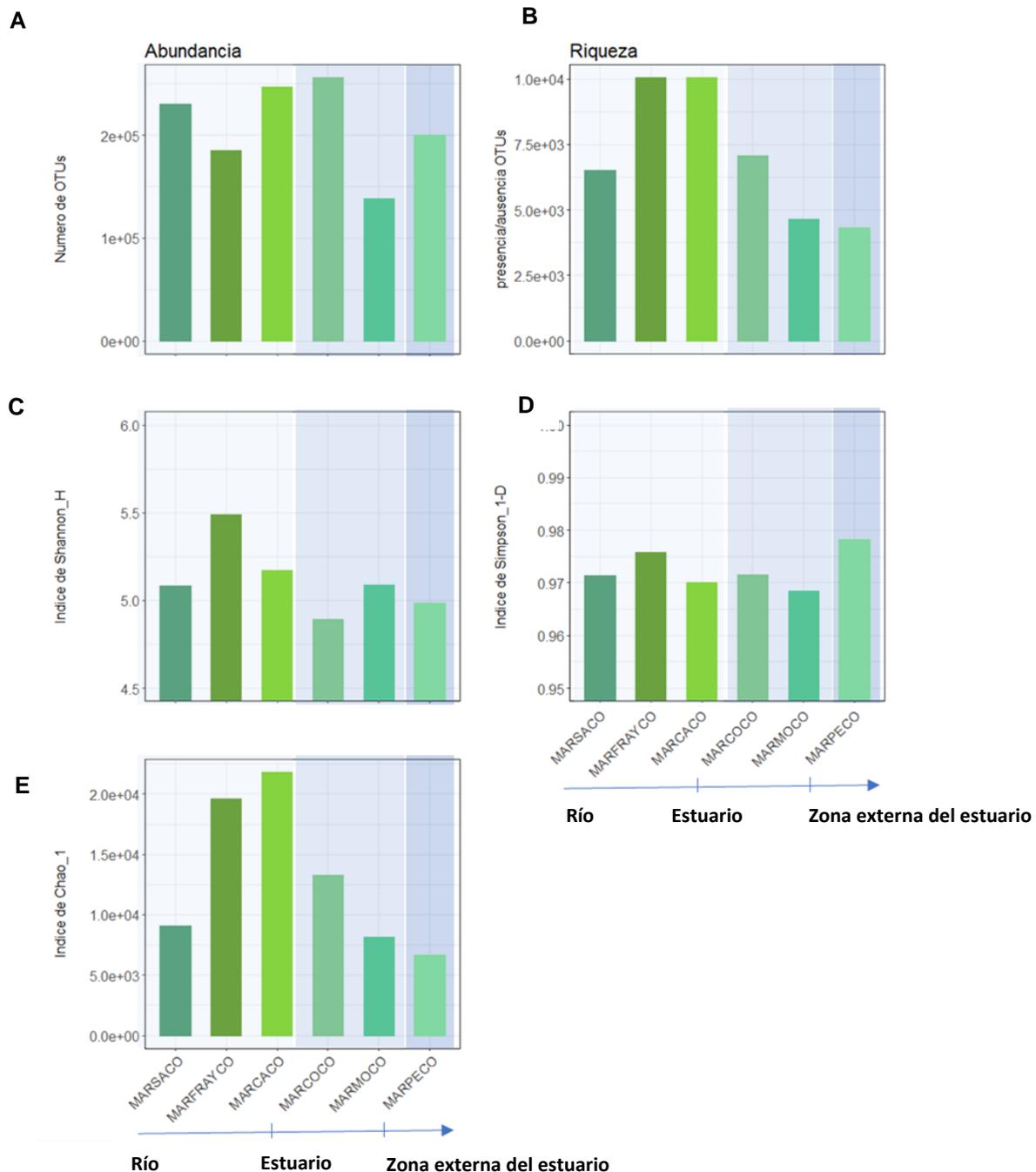


Figura 26. Parámetros descriptivos de la comunidad en muestras del gradiente estuarino. A. Riqueza, B. Abundancia, C. Índice de diversidad de Shannon, D. Índice de diversidad de Simpson, E. Índice de riqueza de Chao1.

De manera de ordenar y visualizar la diversidad en el gradiente, se obtuvieron los perfiles de diversidad de Renyi para los órdenes 0, 1 y 2 (Figura 27). Los puntos en celeste representan los valores de H_α para cada α y estos se relacionan con las curvas de valores medios, máximos y mínimos. En todos los casos el perfil de la curva da una idea de la equitatividad, alcanzándose la equitatividad máxima cuando la curva es horizontal (Kindt & Coe, 2010). En este caso, los perfiles encontrados presentan una distribución de especies no equitativa. Además, considerando que los perfiles obtenidos no se ordenan en su totalidad uno encima del otro, no es posible ordenar los sitios de menor a mayor diversidad. En todos los casos, el punto de inicio

en el lado izquierdo del perfil, indica la riqueza de especies (entropía de orden 0), Al observar los valores obtenidos para esta última, es posible notar que los sitios con una mayor riqueza son MARFRACO y MARCACO, encontrándose las demás muestras en el valor o menor a la media. En cuanto a la entropía de orden 0, el valor obtenido es mayor en MARFRACO y MARCACO. Por otro lado, se considera que, si el perfil de un sitio se encuentra sobre el perfil de otro, es decir alcanza un valor mayor de H_α , este sitio o condición es más diverso que el primero. La entropía de orden 1 (Entropía de Shannon), es posible observar que en todos los casos es mayor que 0, y que el mayor valor lo presentan MARPECO y MARFRACO. Por otro lado, la entropía de orden 2 (Entropía de Simpson), resulta muy similar en todas las muestras, menos en MARFRACO y MARPECO en dónde es mayor.

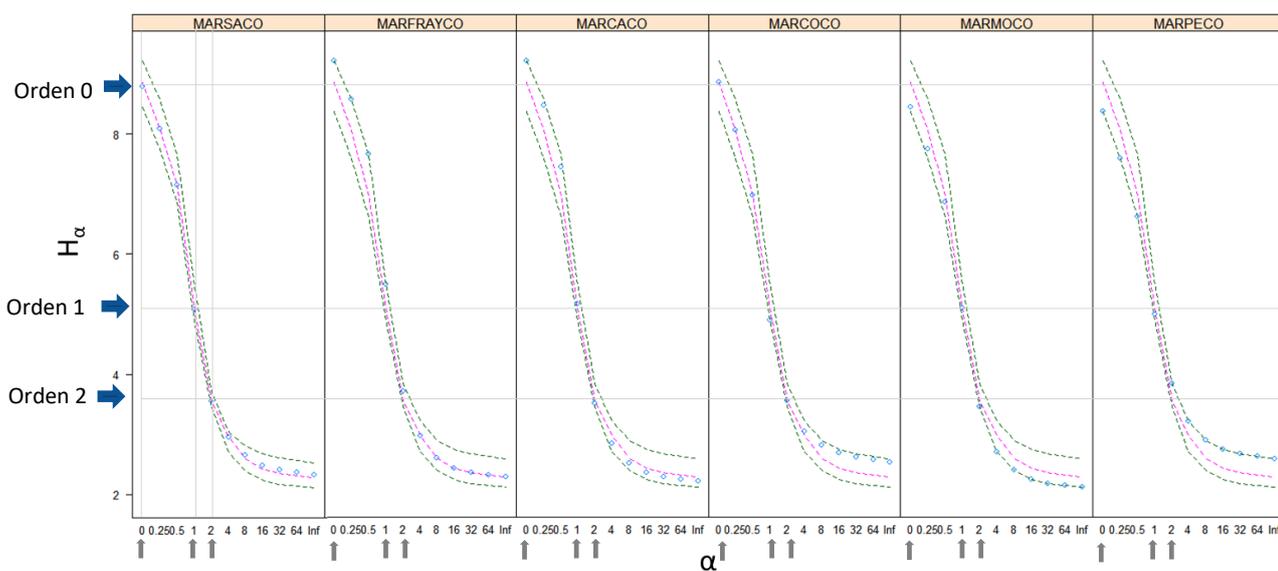


Figura 27. Diversidad de Renyi para las muestras de gradiente analizadas. Los puntos celestes corresponden al valor de H_α de cada sitio para los distintos valores de α . Las líneas punteadas representan los extremos y la media para todas las muestras. Las líneas grises detallan la posición de los puntos para $\alpha= (0,1,2)$ de MARSACO a modo de referencia para la comparación. Las flechas grises señalan los valores de $\alpha= (0,1,2)$ en todos los casos y las flechas en azul los valores de H_α para el análisis de las curvas.

Se analizó la estructura de la comunidad bacteriana en las distintas muestras teniendo en cuenta diferentes niveles taxonómicos de las OTUs (Figura 28). Considerando la totalidad del gradiente, el orden más abundante fue Sphingobacteria, representando un 36% en Río y estuario (MARSACO y MARCOCO), y presentando una abundancia relativa variable y con tendencia a disminuir hacia la zona externa del estuario. En el Río y estuario, en las muestras MARSACO y MARCOCO la abundancia relativa de las OTUs estuvo representada por unos pocos órdenes: Sphingobacteria, Opitutae y Holophagae, y en MARCACO por Sphingobacteria Aphaproteobacteria y Cytophaga. Otros órdenes dominaron en los sitios aguas abajo en el Río Uruguay como Gammaproteobacteria y Flavobacteria en MARFRACO. En el sitio MARMOCO, zona de mezclado del estuario, la abundancia relativa fue mayor para Gammaproteobacteria y en la zona externa del estuario los órdenes Aplhaproteobacteria y Falvobacteria fueron dominantes (MARPECO).

Por otra parte, considerando la abundancia relativa de los órdenes, se observó una tendencia de la riqueza a disminuir un total de 140 órdenes en MARPECO los cuales se correspondió a un

50% de las OTUs. Es importante destacar que a un nivel filogenético de baja resolución ya se observan diferencias marcadas en la composición de la comunidad a lo largo del gradiente.

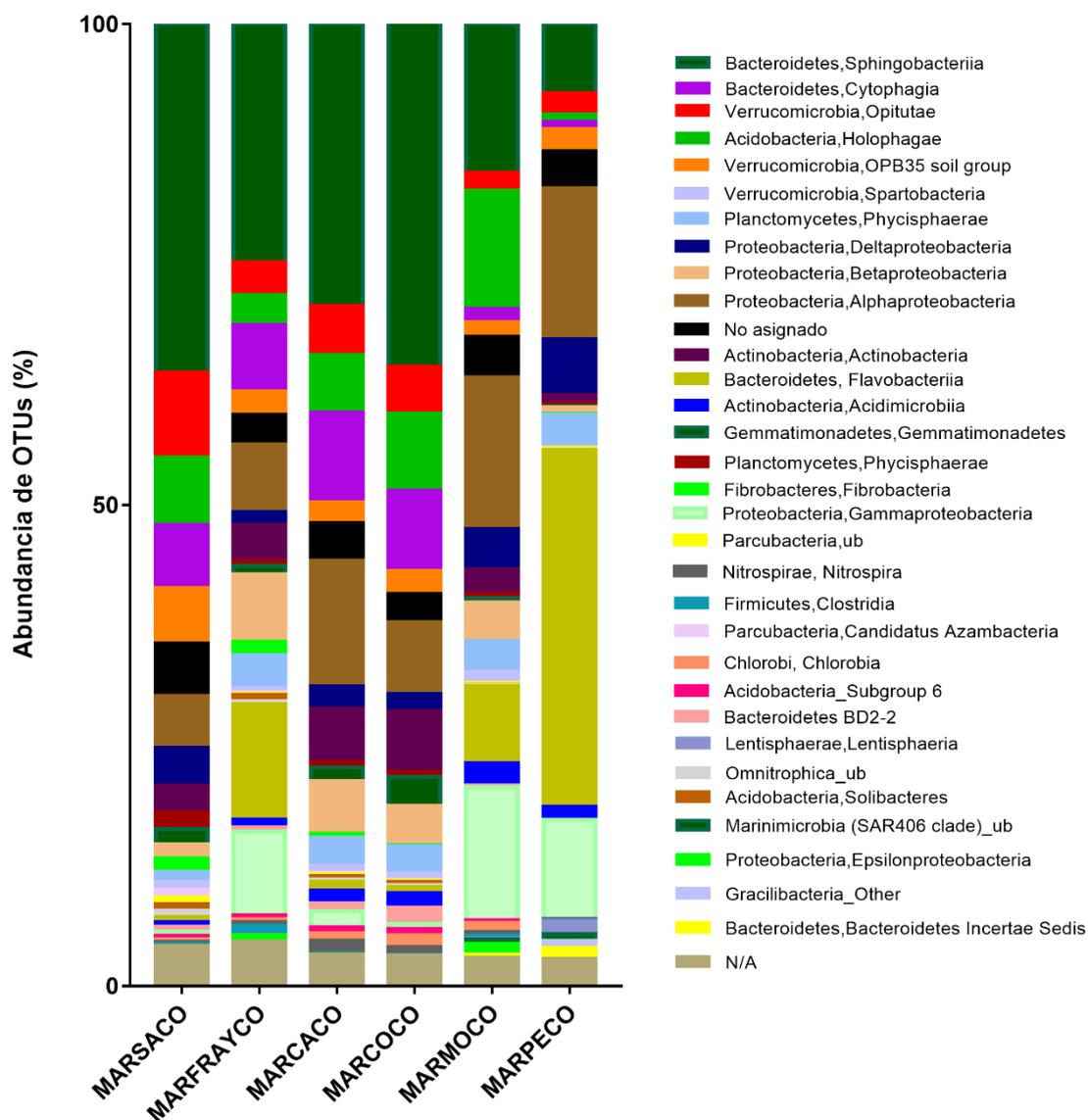


Figura 28. Abundancia relativa de OTUs agrupadas a nivel de Clase con abundancia mayor al 0.05. N/A= No asignado.

Diversidad beta en el gradiente Salto-Punta del Este

A nivel de OTUs, se observó una disimilitud promedio de 70% entre los sitios de río, estuario y zona externa del estuario. Un total de 5 OTUs fueron responsables de las diferencias en un 20% entre los sitios. Dichas OTUs se detallan en la figura 29, encontrándose mayormente representadas en río, estuario o zona externa del estuario. Considerando la fluctuación de las OTUs, es posible establecer que la composición de la comunidad bacteriana parece seguir el patrón del gradiente, definido por las características ambientales de los sitios y su localización geográfica. Lo observado es concordante con lo mencionado anteriormente, una mayor riqueza y diversidad en la zona de río, además del mayor número de *reads* obtenidos (abundancia).

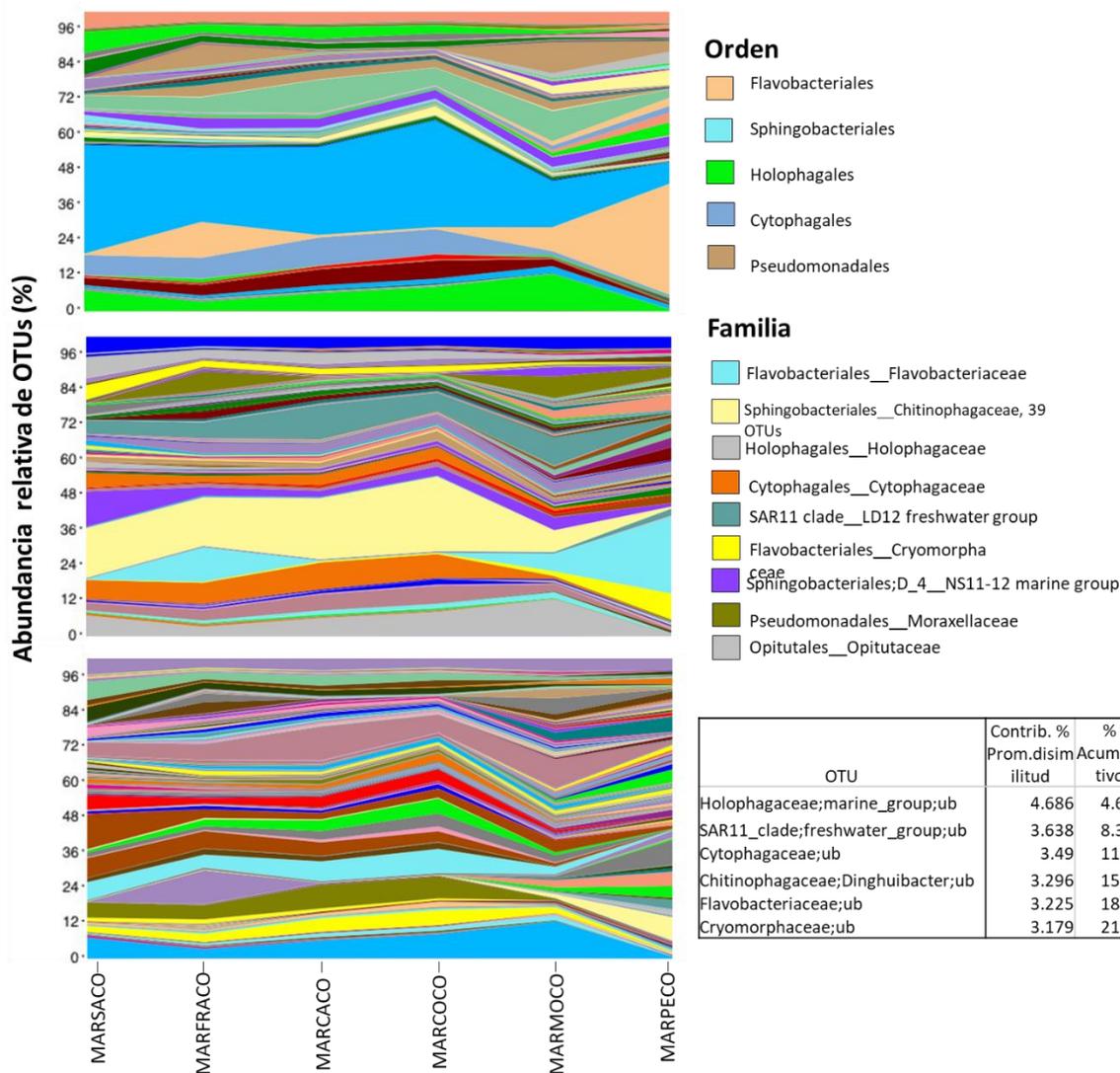


Figura 29. Abundancia relativa de OTUs en sitios de muestreo en Marzo del 2013, a nivel de Orden, Familia (referencias de las contribuyentes de un 50% en SIMPER) y OTUs. La tabla a la derecha muestra los resultados del análisis SIMPER para las OTUs contribuyentes a un 20% de disimilitud y coloreadas según su abundancia media mayor) a nivel de OTU. ub=Bacteria no cultivable. Columnas de izquierda a derecha: nombre de OTU, Contribución porcentual al la disimilitud promedio, Contribución porcentual acumulativa, Abundancia media en río (MARSACO, MARFRACO, MARCACO), Abundancia media en estuario, (MARCOCO, MARMOCO) Abundancia media en océano (MARPECO)

Se utilizaron curvas de rango abundancia para evaluar y comparar la abundancia de OTUs. Las curvas de rango de abundancia permiten obtener información acerca de la distribución de las abundancias relativas de las OTUs en los sitios, ordenándolas en un rango establecido para poder realizar la comparación. Una vez ordenadas se realiza un ajuste mediante modelos de rango abundancia para describir la estructura de cada comunidad. Para la selección del mejor modelo de ajuste, se utilizó el criterio de información de Akaike (AIC). En las curvas, el rango máximo de la curva indica la riqueza, y la pendiente de la curva la equitatividad (a mayor pendiente menor equitatividad). Los sitios estudiados presentaron diferencias a lo largo del gradiente, con algunas OTUs dominantes y muchas de ellas en baja abundancia (OTUs raras), especialmente en la zona de río (MARSACO, MARFRACO, MARCACO) (Figura 30).

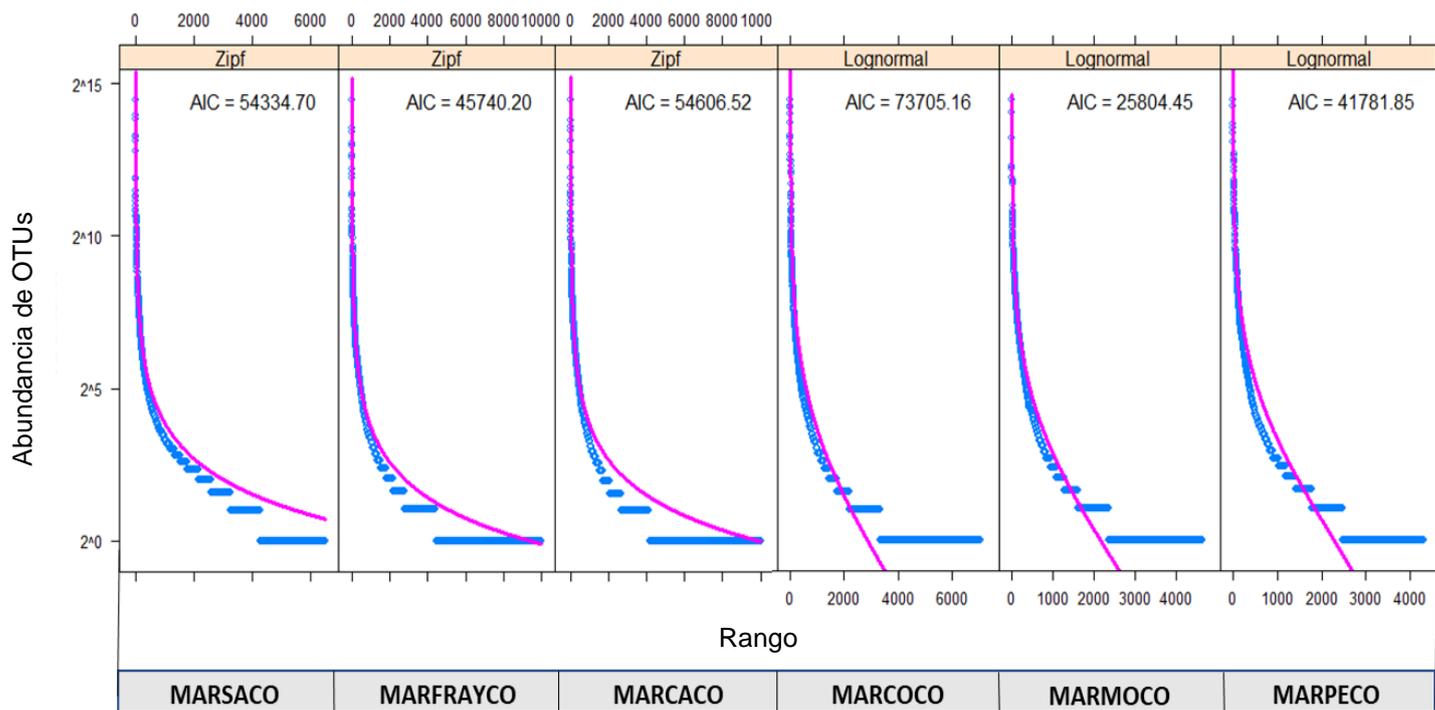


Figura 30. Ranking de abundancias para las muestras del gradiente en marzo 2013. La línea representa el ajuste del modelo paramétrico. En azul se observan los rangos de abundancia. El modelo con menor desviación y menor AIC es el que mejor describe la distribución de la abundancia en función de su rango.

Las muestras de Río presentaron un AIC menor para una distribución Zipf, mientras que en las muestras del estuario y en la zona externa del estuario esto ocurre para una distribución *Lognormal* (Ecuación en Anexo 1). El modelo estadístico Zipf puede entenderse como un proceso de sucesión de individuos en una comunidad, en el que las especies colonizadoras tardías tienen las mayores necesidades de nicho especializado y son, por lo tanto, más raras que la especie colonizadora inicial (Magurran, 2006). La distribución de abundancias de tipo Zipf, presenta un número mayor de especies raras, como es el caso de las muestras de río-estuario. Estas especies se pierden a lo largo del gradiente hacia la zona externa marina. Es decir que ocurre un cambio en la estructura comunitaria a lo largo del gradiente. Estas curvas constituyen una manera de visualizar lo mencionado anteriormente en el análisis SIMPER, pero esta vez considerando el ensamble comunitario en su totalidad.

Para estudiar la relación entre las comunidades de cada sitio, se realizó un análisis de cluster de las muestras del gradiente utilizando la distancia de Bray-Curtis (Figura 31). El análisis reveló el agrupamiento entre MARCACO y MARCOCO, y agrupó a MARSACO, MARFRACO, MARMOCO y MARPECO con una distancia creciente desde dicho grupo. Si bien MARCOCO es considerada en dicho análisis como una muestra estuarina, vemos que la comunidad presenta una alta similitud con MARCACO (último sitio del Río Uruguay estudiado). Sin embargo esta agrupación no fue significativa según el análisis de similitud realizado.

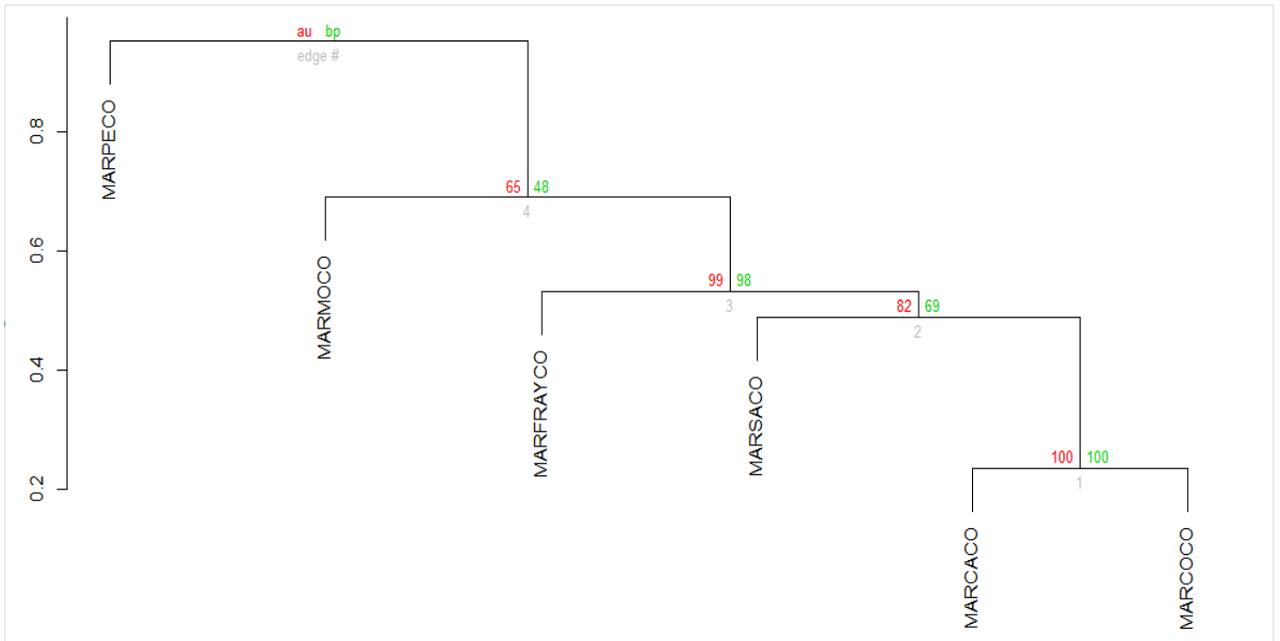


Figura 31. Dendrograma de análisis de sitios del gradiente, mediante clustring jerárquico utilizando la distancia de Bray Curtis. Bootstrap n=1000, Coeficiente de correlacion=0.991, en Pastv3. ANOSIM: R=1, p-value=0,066.

Al realizar el ordenamiento de los sitios utilizando la matriz de distancia de UniFrac (Figura 32), es posible observar en el eje de mayor disimilitud (37%), los sitios Río-Estuario presentan diferencias con el sitio MARCOCO (zona de mezclado del estuario) y la muestra MARPECO (Zona externa marina). En otras palabras, Río-estuario presentan una menor distancia con el estuario en el componente principal I, que con la zona externa marina. Además, en el segundo componente principal, el cual es explicativo de aproximadamente el 25% de disimilitud, se observan diferencias entre las muestras de río-estuario (MARSACO, MARFRACO, MARCACO y MARCOCO) y la zona de mezclado (MARMOCO) y la zona externa (MARPECO). El análisis ANOSIM realizado reveló que estas diferencias son significativas en la comunidad bacteriana a lo largo de las 3 zonas (río-estuario, estuario (zona de mezclado) y zona externa del estuario (R=0.98, p-value= 0.037). Esto nos permite establecer que la composición de la comunidad sigue el patrón del gradiente ambiental estuarino.

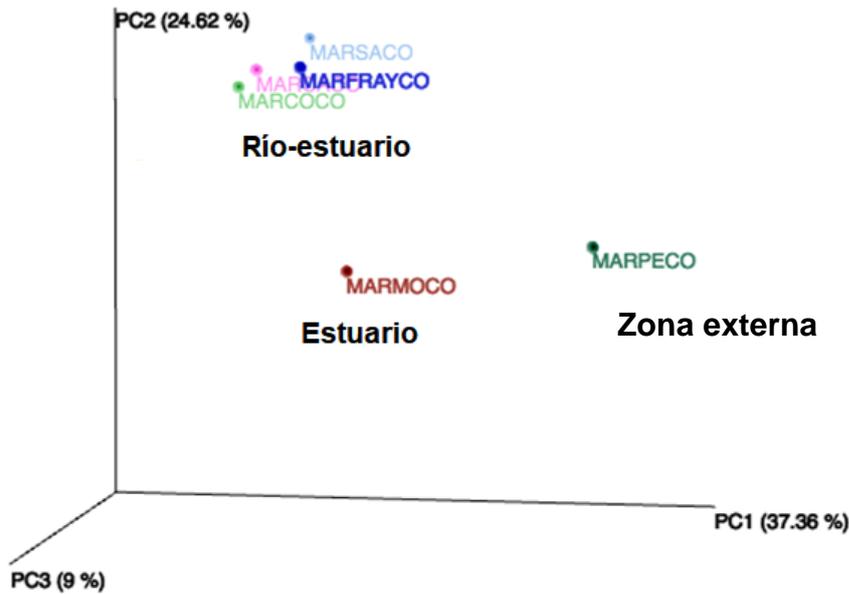


Figura 32. Resultados de PCoA ponderado, (UniFrac), para las muestras del gradiente en marzo 2015.

Estudio de las comunidades en presencia/ausencia de una floración de cianobacterias tóxicas

En todos los sitios se observó macroscópicamente (a simple vista) la presencia de colonias de cianobacterias. Se observó una totalidad de 182 OTUs en dicho filo, siendo MARSACO el sitio con mayor abundancia. El sitio más diverso resultó ser MARPECO, y el menos diverso MARFRACO, en dónde más OTUs fueron dominantes (Figura 33).

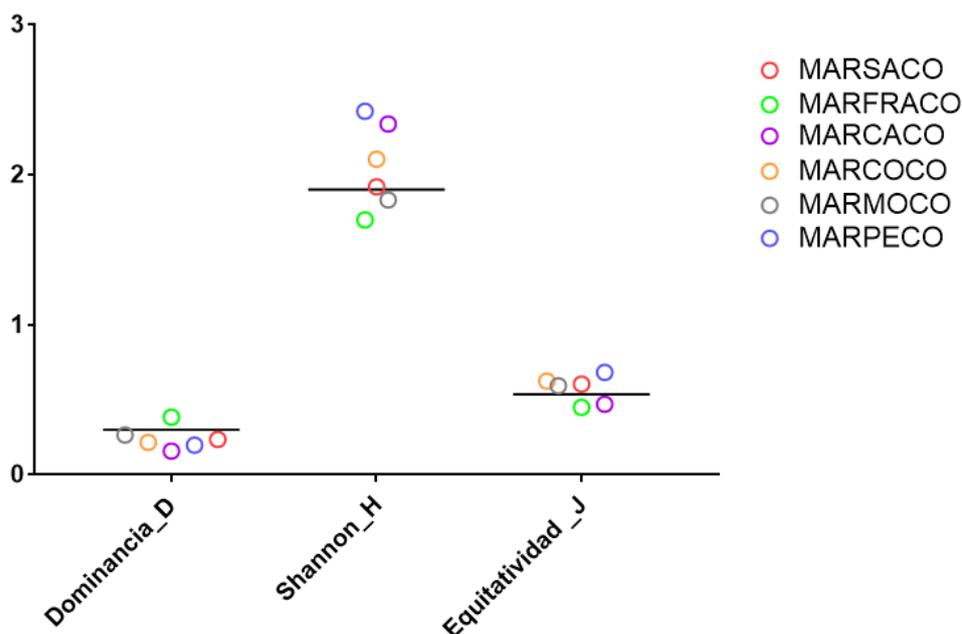
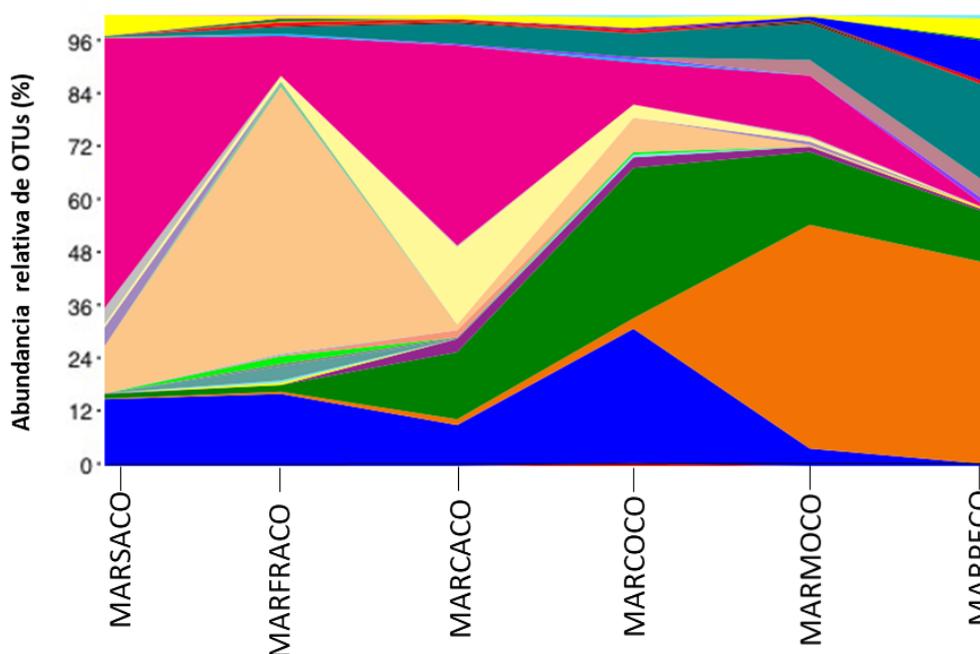


Figura 33. Diversidad del filo Cyanobacteria en sitios de muestreo en Marzo del 2013. La línea señala la media de los valores presentados.

Esto resultó concordante con la presencia de OTUs agrupadas en el filo Cyanobacteria en todas las muestras del gradiente (Figura 34). La comunidad de cianobacterias presentó variabilidad a lo largo del gradiente ambiental, con una disimilitud promedio del 61%, siendo 5 OTUs las responsables de su variación en un 75%. Dichas OTUs se identificaron en los géneros *Prochlorococcus*, *Synechococcus*, *Microcystis* y cianobacterias no cultivables. *Microcystis* se mantuvo en todo el gradiente, siendo más abundante en la zona de río-estuario, mientras que *Prochlorococcus* fue más abundante en el tramo estuario-zona externa.



OTU	Contrib. % Prom. disimilitud	% Acumulativo	Abun. med. Río	Abun. med. Estuario	Abun. med. Océano
Cyanobacteria;SubsectionI;Family; <i>Prochlorococcus</i>	21.54	21.54	0.01	0.26	0.45
Cyanobacteria;SubsectionIV;Family; Other	19.61	41.15	0.38	0.11	0.01
Cyanobacteria;SubsectionIII;Family;ub	13.64	54.79	0.24	0.039	0
Cyanobacteria;SubsectionI;Family; <i>Synechococcus</i>	10.69	65.48	0.06	0.25	0.11
Cyanobacteria;SubsectionI;Family; <i>Microcystis</i>	9.71	75.19	0.13	0.17	0.01

Figura 34. Abundancia relativa de OTUs del filo Cyanobacteria, en sitios de muestreo en Marzo del 2013, a nivel de OTU (referencias de las contribuyentes de un 75% de las disimilitudes. ub=Bacteria no cultivable. Columnas de izquierda a derecha: nombre de OTU, Contribución porcentual al la disimilitud promedio, Contribución porcentual acumulativa, Abundancia media en río (MARSACO,MARFRACO,MARCACO), Abundancia media en estuario, (MARCOCO,MARMOCO), Abundancia media en océano (MARPECO).

Correlación con variables ambientales

Se estudió la relación entre el agrupamiento de las muestras según su diversidad (38950 OTUs en todo el gradiente) y las variables ambientales abióticas medidas al momento del muestreo

(10 datos ambientales). El ordenamiento obtenido resultó en una descripción adecuada a las distancias entre las muestras (*stress factor*=0.01). Se observa que la Salinidad se agrupa hacia la localización de MARPECO. Las variables “*biovolumen_ciano*” y “*Fósforo_Total*” agrupan juntas y hacia los sitios de río (Figura 35).

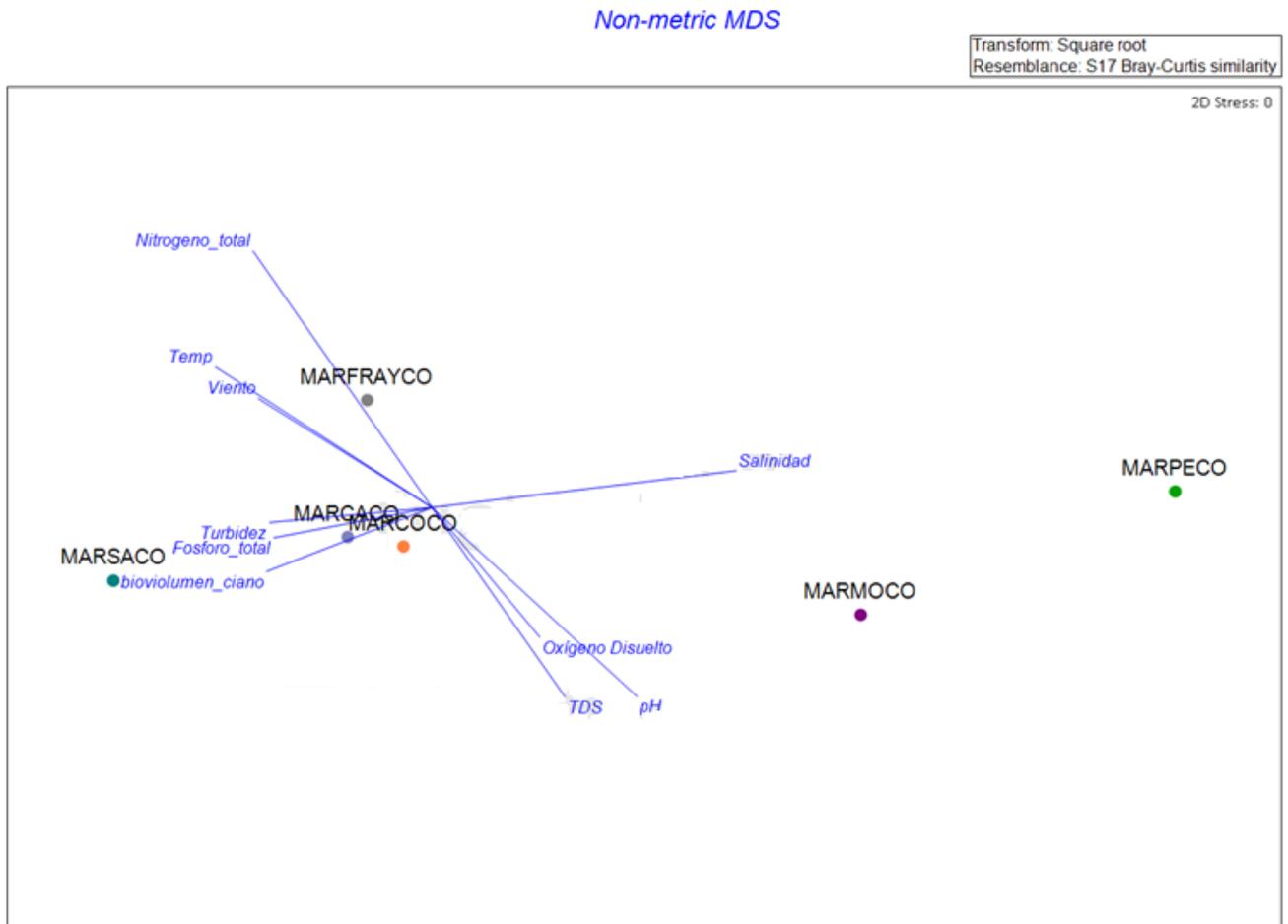


Figura 35. Gráfico de NMDS (factor de estrés = 0.01; 999 permutaciones en base a la distancia de Bray-Curtis y la influencia de variables abióticas en la composición de la comunidad bacteriana determinada a través de la una correlación de Pearson (Correlaciones positivas, $p > 0.2$). Temp=Temperatura, Cond=Conductividad, TDS=Total de sólidos disueltos, OD=Oxígeno disuelto, biovolumen_ciano= biovolumen total de cianobacterias.

DISCUSIÓN

Extracción de ADN, puesta a punto de la amplificación del gen ADNr 16S y secuenciación masiva utilizando primers con y sin barcode a partir de muestras de agua.

En el presente trabajo se ensayaron dos metodologías la amplificación del gen ADNr 16S y su posterior secuenciación. Primeramente, se obtuvo ADN genómico de las muestras, los cuales presentaron un bajo índice de absorbancia 260/230, lo que podría deberse a la presencia de ácidos húmicos. Estos son abundantes en muestras de agua ambientales, pueden extraerse en conjunto con el ADN durante el protocolo utilizado y absorben a esta longitud de onda (Zipper, 2003).

En cuanto al protocolo de amplificación utilizado, se determinó que el uso de BSA fue clave para el éxito de la amplificación en las muestras de agua. La BSA puede actuar uniéndose a moléculas inhibitoras presentes en las muestras como ácidos húmicos, evitando el secuestro de la Taq polimerasa (Jianlin et al., 2005). Ha sido reportado previamente como agente de “alivio de la inhibición de la amplificación en PCR” por Kreader, (1996) y utilizado en el laboratorio previamente para amplificar genes de toxinas a partir de muestras de agua (Martínez De La Escalera et al., 2015). La puesta a punto del protocolo de amplificación resultó ser exitosa, realizándose el mismo protocolo de amplificación de las muestras utilizando *primers* con y sin *barcode* en las mismas condiciones, de manera que las comunidades obtenidas fueran comparables.

Los *primers* utilizados se seleccionaron en base a reportes previos y se confirmó el alineamiento de estos con el 88.7% de las bacterias y un 13.7% de las Archaeas reportadas (Base de datos de SILVA ARNr 16S). Si bien todas las reacciones de PCR se realizaron por triplicado, en futuros estudios deberían realizarse réplicas de la secuenciación de los sitios de manera de analizar la significancia de las observaciones. Existen errores durante todas las etapas del proceso de secuenciación, desde la amplificación inicial en donde un sesgo puede existir por la degradación o contaminación de las muestras durante su preservación, hasta errores en la preparación de las librerías y secuenciación. Otros errores que pueden ocurrir durante la PCR lo constituyen los sesgos debidos a desplazamientos múltiples del *primer* durante la amplificación, el incorrecto *annealing* de los *primers* con la secuencia objetivo o la incorporación de errores de secuencia durante la amplificación clonal y ciclos de PCR (Robasky et al., 2014). Varios de estos errores se corrigen durante el procesamiento de los resultados e incluye la eliminación de secuencias cortas, de los *singletons* y la detección de secuencias quiméricas. Sin embargo, réplicas de secuenciación podrían ser muy útiles en este tipo de estudios para poder obtener resultados representativos.

Para algunas de las muestras, las bandas obtenidas presentaron una baja concentración de producto, lo cual podría estar relacionado directamente con sus características, al tratarse de muestras ambientales. Es posible que debido a la congelación-descongelación de los filtros de partida para la extracción, haya ocurrido la degradación de ADN. La presencia de inhibidores

como los ácidos húmicos también pueden haber afectado en la de amplificación. La secuenciación de réplicas de las muestras analizadas evitaría dichas problemáticas (Robasky et al., 2014).

El total de *reads* obtenido luego en las secuenciaciones utilizando Ion Torrent PGM se encontró aproximadamente entre $1.1-1,8 \times 10^6$ *reads*. La profundidad obtenida por muestra se encontró en el orden de la recomendada por Caporaso et al., (2011) (1×10^5) para el estudio de comunidades microbianas de agua y suelo. Los *pipelines* utilizados han sido ampliamente reportados por múltiples estudios de comunidades bacterianas mediante el análisis *downstream* de secuencias del gen codificante para el ARNr 16S (Caporaso et al., 2011; Tremblay et al., 2015). En particular, el programa QIIME también fue utilizado por Fujimoto et al., (2014) para el análisis de comunidades bacterianas en muestras acuáticas utilizando la secuenciación masiva de 400 pb en Ion Torrent. Del total de *reads* obtenidos, se filtró un un porcentaje del 2.4% de secuencias quiméricas. Las secuencias quiméricas son muy frecuentes durante la amplificación de fragmentos de secuencia cercanamente relacionadas como el ARNr 16S (Song et al., 2017) Por lo tanto, el porcentaje de quimeras obtenido se encontró dentro del rango de lo reportado por dichos autores al utilizar el algoritmo UCHIME mediante VSERACH (Rognes et al., 2016). En particular, Xue et al., (2018) utilizó una comunidad sintética de prueba para comparar las tecnologías de secuenciación MiSeq, Illumina e Ion Torrent, obteniendo alrededor de un 1,4% de quimeras.

En cuanto a las metodologías de *clustering* de *reads* utilizadas para la determinación de las secuencias representativas de cada OTU, diferentes enfoques han sido reportados en QIIME para secuencias cortas: asignación *de novo* o asignación utilizando como referencia una base de datos ofrecida. Ambos métodos tienen impactos sobre la comunidad bacteriana observada (Xue et al., 2018). En el presente estudio se seleccionó la metodología *de novo* y no el alineamiento directo con la base de datos por tratarse de una muestra ambiental, de la que se espera que muchas de las secuencias no estén aún anotadas. Allí radica la ventaja de dicha metodología, ya que existen muchos parámetros libres durante la iteración y el alineamiento (como cuántos alineamientos pueden suceder antes de asignar una OTU) sin que ninguna referencia externa lo determine (Rideout et al., 2014). En contraparte, Xue et al., (2018) plantean que esta metodología podría dificultar la comparación de comunidades al inicio del *clustering*. Sin embargo, aunque utilizar una base de datos de referencia puede ofrecer una ventaja, esta podría resultar en la sobrestimación de variantes de secuencia encontradas.

Luego de realizado el *clustering*, la asignación de las OTUs se realizó utilizando un porcentaje mínimo de similitud del 97%, establecido por Wayne et al., (1987). De esta manera, se asume que las OTUs son buenas aproximaciones a especies, y la frecuencia de los *reads* a las abundancias de las mismas (Edgar, 2017). Según lo reportado por Yarza et al., 2014 este límite es de 98.5% cuándo se agrupan secuencias del gen completo 16S o *full-length*. A pesar de ello, dicho resultado ha sido criticado debido a que utilizó un método de agrupamiento incorrecto y establecen que el límite de agrupamiento es cercano al 99% de identidad para secuencias *full-length* de la región V4 del gen codificante para el ARN 16S (Edgar, 2017). En este estudio se

secuenció una longitud de aproximadamente 300 pb, y se consideró utilizar 97% ya que fue lo recomendado por QIIME para la asignación de OTUs *de novo*.

Al realizar el análisis de comunidades microbianas es necesario evaluar qué tan bien una muestra refleja la diversidad *in situ*, es decir la riqueza de especies y abundancia relativa en tiempo y espacio. La microbiología depende de muestras para revelar la diversidad real de comunidades microbianas, además de una serie de enfoques estadísticos que han sido desarrollados para comparar la riqueza de especies entre muestras. Las curvas de rarefacción muestran las OTU observadas con una profundidad de secuencia dada y se utilizan para comparar la riqueza observada de comunidades que han sido muestreadas desigualmente mediante secuenciación masiva (Kim et al., 2017). En este estudio se realizó la rarefacción de las OTUs obtenidas para cada muestra, de manera de ajustar las diferencias en el tamaño de las comunidades observadas, ya que la muestra MARPECO fue la que presentó menor número de OTUs y la muestra MARFRACO la que presentó una mayor riqueza. El método implicó seleccionar un número específico de *reads* menores a la muestra con menor número de *reads*, y luego realizar submuestreos al azar de igual tamaño hasta alcanzar un límite establecido (Weiss et al. 2017). No todas las curvas de rarefacción obtenidas resultaron ser asintóticas, por lo que es posible afirmar que la técnica presentada podría perfeccionarse de manera de alcanzar una mayor cobertura de la comunidad bacteriana presente. Según lo reportado por Kennedy et al., (2014), el ADN de partida y la concentración del molde juegan un rol clave en la variabilidad de la comunidad microbiana observada, por lo que no se descarta el efecto de la degradación del ADN de las muestras de partida debido al descongelado/congelado repetitivo de las mismas y su antigüedad (tomadas en 2013-2014).

Análisis comparativo de la comunidad microbiana en muestras con y sin barcode.

El uso de *primers* con secuencias identificadoras o *barcodes* ha sido ampliamente utilizado desde el 2007, permitiendo el desarrollo de nuevas tecnologías multiplex de secuenciación como Illumina o Ion Torrent. Los *barcodes* utilizados en Ion Torrent, que pueden ser agregados previamente en la amplificación o durante la creación de las librerías, son diseñados utilizando altos controles de calidad y astringencia que validan su funcionalidad durante la secuenciación. El uso de la secuenciación masiva para la detección de ARNr 16S para el análisis de la composición de la comunidad microbiana ambiental independiente del cultivo ha sido limitado por los costos de cada ejecución individual, y por la dificultad de realizar varias detecciones al mismo tiempo. Este inconveniente ha sido resuelto mediante la utilización de un código de barras o *barcode* agregado a cada *primer* utilizado para etiquetar la muestra (Hamady et al., 2012).

Durante la PCR con *barcodes* (bcPCR) se asume que la secuencia adaptadora adyacente no interactúa con el molde afectando la especificidad y promoviendo la amplificación selectiva hacia determinadas secuencias *target* (Binladen et al., 2007; Hoffmann et al., 2007). A pesar de esto, los estudios de diversidad que utilizan métodos de secuenciación masiva son conocidos por estar afectados por diferentes factores como el tamaño del amplicón o región *target*,

elección de los *primers*, errores durante la secuenciación y reproducibilidad (Zhou et al., 2011). En el presente trabajo se estudió el posible sesgo en la caracterización de la comunidad bacteriana en muestra ambientales, obtenida a través del uso de los *primers* 520F y 802R con y sin *barcode*. La importancia de este análisis radica en seleccionar la mejor metodología para estudiar comunidades microbianas pudiendo establecer sesgos que podrían ser claves por ejemplo en la aplicación futura del uso de *barcodes* para la detección de presencia/ausencia de bacterias patógenas. El uso de *barcodes* ofrece una detección rápida de bacterias en muestras de agua sin necesidad de preparación de la librería, dando lugar a un menor costo y tiempo de procesamiento. En técnicas de detección de patógenos en muestras de agua es muy importante la reproducibilidad, especificidad, sensibilidad, rapidez y bajo costo del ensayo (Ramírez-Castillo et al., 2015). Sin embargo, un sesgo establecido por el *barcode* podría afectar los resultados.

En el estudio realizado, se observó que alrededor del 50% las OTUs fueron compartidas entre muestras amplificadas con y sin *barcode* (Figura 18). Dicho resultado podría explicarse por los factores presentados anteriormente, así como también por la baja reproducibilidad de los resultados, ya que durante el procesamiento *downstream* se realizó en conjunto y utilizando una misma base de datos. Se obtuvo una mayor abundancia de determinadas OTUs en las muestras amplificadas con *barcode* (Figura 21, 22 y 23). Dichas OTUs fueron abundantes en muestras con y sin *barcode*, por lo que el uso del *barcode* presentaría un sesgo hacia especies más abundantes.

Durante el análisis de la diversidad beta por PCoA (Unifrac ponderado), fue posible observar que, en el *primer* componente, los sitios se separan por una distancia cercana al 50%. Esto puede explicarse ya que este análisis tiene en cuenta directamente las diferencias en las abundancias relativas de las muestras (Lozupone et al., 2010). Al considerar esta última, la comunidad microbiana es aún más distinta entre las muestras de Salto y Punta del Este. En el segundo componente principal otorga una varianza de 25%, observándose allí la distancia entre el mismo sitio con y sin *barcode*. Es decir que tiene más peso el ambiente que el uso del *barcode*.

Para determinar si los *primers* con *barcode* podrían favorecer a las OTUs más abundantes se realizó un estudio de aquellas estructuras terciarias en el espacio que estos adoptan durante la reacción de PCR, lo que les impide estar disponibles para el *annealing* o que este ocurra con una menor especificidad. De acuerdo con las predicciones de OligoEvaluator (www.oligoevaluator.com), se forman 16 estructuras terciarias en el *primer reverse*, calificadas como de alta frecuencia, en comparación con 1 en el *primer reverse* sin *barcode* (Figura 36). El

primer *forward*, no forma ninguna estructura, y conteniendo las secuencias adaptadoras y el *barcode* forma 2 con una alta probabilidad de ocurrencia.



Figura 36. Resultados de OligoEvaluator para el *primer* 802R (A). B- estructuras con probabilidad alta formadas por el *primer* con estructuras adaptadoras: adaptador A, key y adaptador GAT (amarillo) y *barcode* (verde). C- estructuras con probabilidad alta formadas por el *primer* con estructuras adaptadoras: adaptador A, key y adaptador GAT (amarillo) y *barcode* (azul).

Las estructuras terciarias formadas por los *primers* con *barcode* podrían jugar un rol clave dando lugar a amplificación diferencial. La observación de un sesgo podría estar dada por una lado debido al aumento de determinadas OTUs específicos por su afinidad de estas estructuras o secuencias, y/o por la no amplificación o amplificación trunca (*reads* de mala calidad) de OTUs con baja representación en la muestra inicial. Sin embargo, la tecnología de *barcodes* ofrecida por Ion Torrent establece que las secuencias utilizadas permitirían una correcta diferenciación de las muestras y evitarían la obtención de *reads* de baja calidad.

Diversos estudios reportados utilizan PCR con *primers* con *barcode* para la amplificación de secuencias *target* (Appenzeller et al., 2015; Claesson et al., 2009; Nguyen et al., 2015). Entre ellos, Goodrich et al., (2014) aseguran que a través del uso repetido de *barcodes* no tiene una influencia sobre el rendimiento de amplificación y la diversidad detectada, aunque no muestran sus resultados. De acuerdo con lo reportado, dichas secuencias adicionales causarían sesgos y errores durante la secuenciación al ser ligados (preparación de librerías) o en el PCR con *barcode* (D'Amore et al., 2016). La diferencia entre estos escenarios radica en que la utilización del PCR con *barcode* podría afectar directamente a la detección de especies raras, como se observa en el presente estudio. Este hecho podría estar relacionado con la formación de las estructuras comentadas durante el PCR con *barcode*, lo cual impide la detección de aquellas OTUs que se encuentran en bajas copias.

Como fue mencionado anteriormente, el presente trabajo forma parte de una serie de estudios que están siendo realizados en el Departamento de Microbiología y el Departamento de Genómica (IIBCE) con el objetivo de perfeccionar una técnica de detección de bacterias patógenas en muestras de agua. Dicho sesgo observado podría ofrecer una desventaja al momento de detectar bacterias patógenas en agua, ya que estos se encuentran generalmente en baja concentración presentando el desafío más importante para su detección (Suzuki &

Giovannoni, 1996). Es importante destacar que la detección de patógenos presenta dificultades dado el bajo número de células que estando presentes pueden causar enfermedades. El desarrollo de una infección en el hospedero depende, entre otros factores, de la dosis infecciosa mínima (MID) siendo para las bacterias entéricas en el rango de 10^7 a 10^8 células. Esta MID es mucho menor en algunas especies, como *Shigella spp.*, (10^1 – 10^2), *Campylobacter spp.*, (alrededor de 500 células), *E.coli* O157:H7 (10^6 – 10^8) y *V. cholera* (10^3) (Ramírez-Castillo et al., 2015). Múltiples evaluaciones son pertinentes para el desarrollo de una técnica de detección de patógenos en agua (Ramírez-Castillo et al., 2015).

Al observar que 1) un número reducido de OTUs de géneros más representados en todo el gradiente, presentan una mayor abundancia relativa en las muestras con *barcode*, 2) la similitud de OTUS entre muestras con y sin *barcode* fue de apenas un 50%, se decidió utilizar la amplificación con *primers* sin *barcode* para analizar el total de muestras del gradiente. Dicha decisión fue tomada además ya que, en base al entendimiento del grupo de investigación, constituye la metodología más conservadora para estudiar la comunidad acuática.

Análisis de la comunidad bacteriana en muestras del gradiente Río-Estuario-Océano.

Los factores fisicoquímicos como la temperatura, concentración de nutrientes y salinidad provocan cambios en la composición de las comunidades microbianas (Andersson et al., 2010; Eiler et al., 2014). En relación con lo anteriormente mencionado, el efecto espacial o zonal de la composición microbiana puede ser afectado por dichos parámetros, especialmente por la salinidad, profundidad y materia orgánica disuelta (Bertoglio, 2016; Morado, 2016; Claudia Piccini et al., 2006a, 2006b, 2011) entre otros relacionados con impactos antropogénicos (Labbate et al., 2016). En el presente trabajo se estudió la diversidad bacteriana de 6 sitios en costas uruguayas, ubicados en forma de gradiente ambiental, desde el Río Uruguay, el estuario del Río de la Plata y hacia el Océano Atlántico. Investigaciones precedentes se han realizado en el Río de la Plata, evidenciando el impacto de la salinidad en la abundancia y riqueza de las comunidades (Alonso et al., 2010; Bertoglio, 2012; Martínez De La Escalera et al., 2015). Se han enfocado especialmente en comunidades de fitoplancton y la variación en el biovolumen a lo largo del gradiente Río Uruguay- Río de la Plata (Nogueira, 2018), observándose distintos grupos dominantes de fitoplancton según una zona de río o estuario.

La *core* microbiota resultó estar dominada en un 50% por 8 OTUs pertenecientes al clado SAR11 (la más abundante), y las familias Holophagaceae Sphingobacteriaceae, y Cytophagaceae. De acuerdo por lo reportado por Bertoglio, (2016), utilizando las mismas muestras que el presente trabajo y otras tomadas en aguas abiertas, el clado SAR11 y LD12 fueron los más abundantes en Marzo 2013 en los sitios de Colonia, Punta del Este y Montevideo (estuario- zona externa). Morris *et al.*, (2002) reportó por primera vez la presencia del clado SAR11 el cual se determinó que representaría alrededor del 50% de la comunidad microbiana de aguas superficiales (bajos nutrientes), y el 25% de comunidades sub-fóticas (que habitan una zona rica en nutrientes, pero con luz limitada por la profundidad). También fue reportado como el clado más abundante por en las costas de la Laguna de Rocha (Piccini et al., 2006b). Investigaciones de Malmstrom *et al.*,

(2004) reportan que dicho clado juega un rol significativo en el metabolismo de C, N y ciclado de S en el océano.

En cuanto a la familias anteriormente mencionadas, las tres han sido reportadas en sedimentos de lagunas y en ecosistemas de agua dulce (Rosenberg, 2011) . La familia Sphingobacteriales ha sido reportada en localidades de río particularmente afectadas por plantas de tratamiento de aguas residuales (sistemas eutróficos), en dónde también mostraron actividad degradadora de herbicidas y antibióticos (Angly et al., 2016). El hecho de que este clado sea muy abundante en todo el gradiente podrían estar relacionado con el aporte importante de nutrientes de actividades antropogénicas desde la costa sur-este y sur-oeste del país, principalmente en Montevideo y Colonia debido a la concentración de la población metropolitana y a el impacto de actividades agropecuarias aguas arriba (MVOTMA, 2017).

El gradiente salino en estuarios juega un papel fundamental en la estructura espaciotemporal de propiedades físicas, biológicas y biogeoquímicas de los ecosistemas. Los estuarios constituyen ecosistemas de transición entre la tierra y el océano, considerándose no solo ambientes transicionales sino ecosistemas en sí mismos, debido a que poseen ensamblajes comunitarios únicos y diferentes a los de sus extremos. (Cloern et al., 2017). En el gradiente de estudio se observó una mayor riqueza en los sitios de río, desde Salto a Carmelo, lo cual concuerda con que en estos ambientes se constató una mayor abundancia bacteriana utilizando tinción con DAPI (resultados no mostrados obtenidos por proyecto FAN). Se observó que el río no solo posee una mayor abundancia de OTUs, sino que posee una mayor riqueza y diversidad que las otras zonas del gradiente (Figura 26). Esto podría estar relacionado a la presencia de floraciones fluctuantes durante el año en dicha zona, ya que Salto constituye una zona de embalse frecuentemente afectada (Nogueira, 2018). En estudios realizador por Martínez de la Escalera *et al.*, 2017 se reportó un mayor biovolumen de *Microcystis*, riqueza y potencial tóxico (detección de genes *mcy*) en los sitios de río, disminuyendo hacia el estuario. Este resultado, confirma la hipótesis planteada acerca de la comunidad heterótrofa y su composición asociada a floraciones tóxicas de cianobacterias ya que se evidencia una comunidad con una riqueza y diversidad mayor que en los sitios en donde no existen floraciones (estuario-zona externa del estuario).

Las distribuciones de abundancias de las especies (SADs) constituyen un concepto importante a nivel de la ecología y macro-ecología, siendo útil para la exploración de patrones ecológicos y ambientales relacionados a las comunidades (Legendre & Legendre, 2000). El análisis realizado en el gradiente evidencia gráficamente ensamblajes diferentes entre las zonas del gradiente. Las muestras de Río presentan una distribución de tipo Zipf, mientras que en las muestras del estuario y océano poseen una distribución *Lognormal* (Figura 30). La distribución según el modelo estadístico Zipf explica la colonización tardía de individuos con nichos especializados, observándose numerosas especies raras con alto nivel de recambio. Por otro lado, las distribuciones del tipo *Lognormal* se caracterizan por poseer un alto número de especies con una abundancia intermedia y un bajo número de especies raras. Resulta más probable que se encuentren SADs *lognormales* en comunidades con una baja rotación temporal y espacial de especies siendo moldeadas por múltiples procesos estocásticos, independientemente de la diferenciación de nicho o de su capacidad competitiva. En contraparte, son moldeadas por la existencia de filtros ambientales que seleccionan ciertas especies y combinaciones de especies,

limitando la colonización a lo largo del tiempo (Magurran & Henderson, 2003). Filtros ambientales podrían constituir el gradiente de salinidad generado del estuario hacia el océano (Cloern et al., 2017). En contraparte, se espera que SADs de tipo Zipf, ocurran en comunidades con altos grados de dispersión y recambio de especies, presentando un número mayor de especies raras (Barange & Campos, 1991) lo cual podría estar relacionado con la dinámica de incidencia de floraciones que ocurren en el embalse.

La distribución de abundancia de especies ha sido estudiada previamente en gradientes ambientales, reportándose que las de tipo *lognormal* prevalecen en entornos estables y sin perturbaciones, mientras que SADs de series *log* se encuentran en hábitats perturbados con una mayor variabilidad temporal (Ulrich et al., 2016). En el gradiente río-estuario estudiado, el estudio de SADs permitió evidenciar que las poblaciones varían en el gradiente independientemente de la floración, encontrándose una mayor riqueza (más especies raras) en el río. Alonso et al., (2010) reportó esto para el Río de la Plata realizando un análisis del espaciador intergénico ribosómico (ARISA). Observaron una mayor riqueza y abundancia en la zona estuarina, en donde hubo baja salinidad y mayor concentración de nutrientes. Además, reportaron un efecto en la temperatura en la variabilidad de las Gammaproteobacterias, siendo estas últimas más abundantes en la zona marina. También reportaron la incidencia de Actinobacterias y Betaproteobacterias en la zona estuarina de agua dulce, de la misma manera que se observó en este estudio.

Si bien se conoce que la salinidad y la temperatura varían en el gradiente estudiado (Kruk et al., 2015), no se logró encontrar una correlación significativa entre el agrupamiento de OTUs de los sitios y estas variables ambientales ya que los sitios muestreados analizados fueron escasos. Sin embargo, la salinidad constituye en conjunto con la conductividad como la variable explicativa de las separaciones de MARPECO en los análisis multivariados realizados. El efecto de la salinidad en las comunidades microbianas, particularmente en el potencial tóxico de cianobacterias ha sido reportado previamente por Martínez de la Escalera et al., (2017b).

La variación entre las comunidades de los sitios del gradiente fue atribuida a un bajo número de OTUs de alta abundancia. El análisis de *cluster* entre los sitios reveló el agrupamiento entre MARCACO y MARSACO, y agrupó a MARSACO, MARFRACO, MARMOCO y MARPECO (hacia el Océano Atlántico) con una distancia creciente desde dicho grupo (Figura 31). Existen diferencias ampliamente documentadas en la composición de las comunidades bacterianas en agua dulce y en ambientes marinos. Por ejemplo, como se mencionó anteriormente, la mayor abundancia de la clase Betaproteobacteria en agua dulce y de la clase Flavobacteria en ambientes marinos (Alonso et al., 2010; Bertoglio, 2016; Kimbrel et al., 2018). En cuanto a las OTUs que diferenciaron a cada una de las zonas, el río se caracterizó por poseer una mayor abundancia de dos OTUs asignadas a la familia Chitinophagaceae, del orden Sphingobacteriales, las cuales son muy abundantes en ecosistemas de agua dulce y su presencia ha sido reportada en estuarios cuando las descargas desde el río son mayores en estaciones lluviosas (Angly et al., 2016). Por otro lado, en el océano, las familias de bacterias marinas como Flavobacteriaceae y Crymorphaceae se observaron más abundantes. En el estuario, la incidencia del clado SAR11 y la familia Holophagaceae fue más abundante en comparación con otros sitios, lo cual concuerda con lo comentado anteriormente y reportado por Bertoglio, (2016) en comunidades del Río de la Plata. También se observó la presencia de una mayor abundancia del filo Acidobacteria en el

estuario, lo cual fue reportado previamente para un ambiente riverino en Texas (Estados Unidos) (Henson et al., 2018). En congruencia con lo reportado, dicho filo disminuyó considerablemente en presencia de mayor salinidad (en MARPECO).

En ambientes acuáticos, en presencia de fitoplancton, ocurren importantes interacciones relacionadas con el intercambio de nutrientes y metabolitos. La fijación de carbono orgánico mediante la fotosíntesis por parte de las cianobacterias puede provocar una respuesta quimiotáctica promoviendo asociaciones con otros microorganismos debido al aumento de compuestos intermediarios fotosintéticos (glicolato, osmolitos, ácidos grasos y polímeros extracelulares propios del mucílago) o productos de la lisis celular (Beliaev et al., 2014). Esto estaría relacionado con las observaciones presentadas en este trabajo, siendo las zonas de río y estuario la que presentan mayor diversidad. Por otro lado, la comunidad de cianobacterias resultó ser más diversa en el océano, en comparación con las otras dos zonas. La misma se caracterizó por la presencia de OTUs asignadas a los géneros *Prochlorococcus* y *Synechococcus*, los cuales se observaron también en el estuario, aunque en baja abundancia (Figura 34). Dichos géneros marinos no son productoras de cianotoxinas (Berg & Sutula, 2003) y fueron abundantes en Punta del Este, así como bacterias del orden Rhodobacterales y clado SAR11. Según los reportes de Campbell & Kirchman, (2013), taxones dominantes en ambientes marinos pertenecientes a dicho clado, representaron un 70% de la comunidad, en ambientes marinos y de salinidad media en el gradiente estuarino de la bahía de Delaware (Estados Unidos). Además, Zubkov, (2009) recopiló varios conceptos acerca de la actividad foto-heterótrofa del clado, dada la producción del pigmento proteo-rodopsina. Fue reportado conjunto con las cianobacterias *Synechococcus* y *Prochlorococcus* dominando el bacteriplancton en las zonas fóticas del océano (aquella en la que penetra la luz solar).

La comunidad observada de cianobacterias no resultó ser abundante en comparación con otros filos. Esto podría atribuirse a las características de las cianobacterias, ya que al formar colonias conspicuas con un mayor biovolumen, en cada colonia se esperan observar adheridas al mucílago un mayor número de bacterias heterótrofas. Además, se observaron OTUs asignadas a bacterias del género *Sphingomonas* en todo el gradiente, las cuales están reportadas como biodegradadoras de cianotoxinas de *M.aeruginosa* (Briand et al., 2016), lo cual concuerda con la detección de la presencia del gen *mcy* en todo el gradiente (Martínez de la Escalera et al., 2017b). Finalmente, el hecho de que comunidades de río tengan una mayor diversidad y esto se relacione con la presencia de floraciones, podría deberse a las interacciones de asociación reportadas previamente entre las cianobacterias y las bacterias heterótrofas. Las cianobacterias generan mucílago para la formación de colonias, el cual puede actuar como fuente de nutrientes para bacterias heterótrofas circundantes y proveer protección mecánica (Berg, 2009). Además, las cianobacterias son capaces de fijar nitrógeno de la atmósfera, por lo que lo convierten de manera indirecta en formas accesibles a otros microorganismos de la comunidad (Berg et al., 2009). Se ha sido descrito que al aumentar el número de cianobacterias en una floración, aumenta también la biomasa de bacterias circundantes, y esto lleva a un cambio en la comunidad heterótrofa (Shen et al., 2011). En suma, las comunidades bacterianas más diversas parecerían ocurrir en zonas donde ocurren floraciones.

Futuros análisis podrían realizarse utilizando la asignación de OTUs a una base de referencia y estudiando los genes asociados al metabolismo bacteriano mediante la aplicación del programa

PICRUST (<http://picrust.github.io>), de manera de realizar un estudio a priori de la variabilidad metabólica que podría estar ocurriendo en los sitios afectados por floraciones. Además, el estudio de la presencia de factores de virulencia asociada a bacterias patógenas será estudiado, utilizando la metodología presentada en dicho trabajo como control de presencia/ausencia de patógenos.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo realizó una primera evaluación del uso de los *primers* 520F y 802R con y sin *barcodes* para el estudio de comunidades bacterianas mediante la secuenciación de una porción de la región V4 gen ADNr 16S. Se identificó un sesgo de los *primers* con *barcode* hacia un bajo número de OTUs que fueron abundantes en los sitios estudiados. Esto afectaría a la caracterización de comunidades, favoreciendo la observación de pocas especies más abundantes frente a otras menos abundantes. Además, solo la mitad de la riqueza obtenida mediante el uso de *primers* con y sin *barcode* fue congruente para una misma muestra. El presente estudio no recomienda a priori el uso del *barcode* para el estudio de comunidades en muestras de agua, en contrapartida a las ventajas de su aplicación.

Se logró caracterizar la diversidad microbiana de muestras de agua tomadas en el gradiente estuarino del río Uruguay-Río de la Plata desde Salto hacia Punta del Este en el mes de marzo 2013. La comunidad bacteriana presentó una variación notable a lo largo del gradiente, de la cual fueron responsables a un bajo número de OTUs de alta abundancia. Dichas OTUs fueron características de los sitios de río, estuario y zona externa del estuario respectivamente. Se observó entonces que la comunidad bacteriana parece seguir el patrón del gradiente salino y de temperatura, pudiendo estas actuar como un filtro ambiental, aunque dado el número de sitios estudiados no se observó una correlación significativa entre el agrupamiento de OTUs de los sitios y estas variables. Además, la presencia de cianobacterias podría actuar como un fenómeno que favorece a la colonización de especies raras que ocupan nichos especializados dada su interacción con la comunidad heterótrofa.

Agradecimientos

A mi familia y a Gonzalo por siempre estar firmemente acompañándome. A toda la colonia del departamento por recibirme, en especial a los acuáticos y a mi tutora Claudia por abrirme las puertas y enseñarme lo que quería saber y más acerca de la diversidad del mundo acuático. A Alvaro por haber recorrido este desafío junto a mi y al Coya por su ayuda y gran conocimiento.

REFERENCIAS

- Alon, S., Vigneault, F., Eminaga, S., Christodoulou, D. C., Seidman, J. G., Church, G. M., & Eisenberg, E. (2011). Barcoding bias in high-throughput multiplex sequencing of miRNA, Supplementary protocol. *Genome Research*, 21(9), 1506–1511. <https://doi.org/10.1101/gr.121715.111>
- Alonso, C., Gómez-Pereira, P., Ramette, A., Ortega, L., Fuchs, B. M., & Amann, R. (2010). Multilevel analysis of the bacterial diversity along the environmental gradient Río de la Plata-South Atlantic Ocean. *Aquatic Microbial Ecology*, 61(1), 57–72. <https://doi.org/10.3354/ame01439>
- Alvarenga, D. O., Fiore, M. F., & Varani, A. M. (2017). *A Metagenomic Approach to Cyanobacterial Genomics in Río de la Plata*. 8(May), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00809>
- Andersson, A. F., Riemann, L., & Bertilsson, S. (2010). Pyrosequencing reveals contrasting seasonal dynamics of taxa within Baltic Sea bacterioplankton communities. *ISME Journal*, 4(2), 171–181. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.108>
- Angly, F. E., Heath, C., Morgan, T. C., Tonin, H., Rich, V., Schaffelke, B., Bourne, D. G., & Tyson, G. W. (2016). Marine microbial communities of the Great Barrier Reef lagoon are influenced by riverine floodwaters and seasonal weather events. *PeerJ*, 4, e1511. <https://doi.org/10.7717/peerj.1511>
- Appenzeller, S., Gilissen, C., Rijntjes, J., Tops, B. B. J., Kastner-van Raaij, A., Hebeda, K. M., Nissen, L., Dutilh, B. E., van Krieken, J. H. J. M., & Groenen, P. J. T. A. (2015). Immunoglobulin rearrangement analysis from multiple lesions in the same patient using next-generation sequencing. *Histopathology*, 67(6), 843–858. <https://doi.org/10.1111/his.12714>
- Aubriot, L. E. (2018). Evolución de la eutrofización en el Río Santa Lucía: influencia de la intensificación productiva y perspectivas. *Innotec*, 14(14), 7–16. <https://doi.org/10.26461/14.04>
- Baldrige, E., Harris, D. J., Xiao, X., & White, E. P. (2016). An extensive comparison of species-abundance distribution models. *PeerJ*, 4, e2823. <https://doi.org/10.7717/peerj.2823>
- Barange, M., & Campos, B. (1991). Models of species abundance: a critique of and an alternative to the dynamics model. *Marine Ecology Progress Series*, 69(3), 293–298. <https://doi.org/10.3354/meps069293>
- Beliaev, A. S., Romine, M. F., Serres, M., Bernstein, H. C., Linggi, B. E., Markillie, L. M., Isern, N. G., Chrisler, W. B., Kucek, L. A., Hill, E. A., Pinchuk, G. E., Bryant, D. A., Wiley, H. S., Fredrickson, J. K., & Konopka, A. (2014). Inference of interactions in cyanobacterial-heterotrophic co-cultures via transcriptome sequencing. *The ISME Journal*, 8(11), 2243–2255. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.69>
- Berg, K. (2009). *Heterotrophic Bacteria Associated with Cyanobacteria in Recreational and Drinking Water* (Issue 2089). University of Helsinki.
- Berg, K., Lyra, C., Sivonen, K., Paulin, L., Suomalainen, S., Tuomi, P., & Rapala, J. (2009). High diversity of cultivable heterotrophic bacteria in association with cyanobacterial water blooms. *The ISME Journal*, 3(3), 314–325. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.110>
- Berg, M., & Sutula, M. (2003). Factors affecting growth of Cyanobacteria. *SCCWRP Technical Report*, 869, 103–107.
- Berry, D., Mahfoudh, K. Ben, Wagner, M., & Loy, A. (2011). Barcoded primers used in multiplex amplicon pyrosequencing bias amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(21), 7846–7849. <https://doi.org/10.1128/AEM.05220-11>
- Bertoglio, F. (2012). *Respuesta de la comunidad bacteriana a alteraciones de la trama trófica planctónica en el Río de La Plata*. 1–59.
- Bertoglio, F. (2016). Diversidad y producción de la comunidad bacteriana en el de la Plata Río. *Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias UDELAR (Uruguay)*.
- Binladen, J., Gilbert, M. T. P., Bollback, J. P., Panitz, F., Bendixen, C., Nielsen, R., & Willerslev, E. (2007). The use of coded PCR primers enables high-throughput sequencing of multiple homolog amplification products by 454 parallel sequencing. *PLoS ONE*, 2(2), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000197>
- Bray, J. R., & Curtis, J. T. (1957). An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin.

- Briand, E., Humbert, J. F., Tambosco, K., Bormans, M., & Gerwick, W. H. (2016). Role of bacteria in the production and degradation of Microcystis cyanopeptides. *MicrobiologyOpen*, 5(3), 469–478. <https://doi.org/10.1002/mbo3.343>
- Campbell, B. J., & Kirchman, D. L. (2013). Bacterial diversity, community structure and potential growth rates along an estuarine salinity gradient. *ISME Journal*, 7(1), 210–220. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.93>
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyon, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Fierer, N., & Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *PNAS*, 108(15), 4516–4522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000080107/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1000080107>
- Caporaso, J., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F., Costello, E., Fierer, N., Pena, A., Goodrich, J., Ji, G., & Huttley, G. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 7(5), 335–336.
- Chalar, G. (2006). *Eutrophication's dynamics on different temporary scales: Salto Grande Reservoir (Argentina-Uruguay)*. 87–101.
- Chorus, I., & Bartram, J. (2003). Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. In C. and J. Bartram (Ed.), *Freshwater Biology* (Vol. 48, Issue 9). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2003.01107.x>
- Claesson, M. J., Sullivan, O. O., Wang, Q., Nikkila, J., Vos, W. M. De, Ross, R. P., Toole, P. W. O., & Marchesi, J. R. (2009). *Comparative Analysis of Pyrosequencing and a Phylogenetic Microarray for Exploring Microbial Community Structures in the Human Distal Intestine*. 4(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006669>
- Cloern, J. E., Jassby, A. D., Schraga, T. S., Nejad, E., & Martin, C. (2017). Ecosystem variability along the estuarine salinity gradient: Examples from long-term study of San Francisco Bay. *Limnology and Oceanography*, 62, S272–S291. <https://doi.org/10.1002/lno.10537>
- Codd, G. A., Lindsay, J., Young, F. M., Morrison, L. F., & Metcalf, J. S. (2005). Harmful cyanobacteria: from mass mortalities to management measures. *Harmful Cyanobacteria*, 3, 1–23. https://doi.org/10.1007/1-4020-3022-3_1
- D'Amore, R., Ijaz, U. Z., Schirmer, M., Kenny, J. G., Gregory, R., Darby, A. C., Shakya, M., Podar, M., Quince, C., & Hall, N. (2016). A comprehensive benchmarking study of protocols and sequencing platforms for 16S rRNA community profiling. *BMC Genomics*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2194-9>
- Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *J. Vis. Exp.*, (45).
- Dolman, A. M., R??cker, J., Pick, F. R., Fastner, J., Rohrlack, T., Mischke, U., & Wiedner, C. (2012). Cyanobacteria and cyanotoxins: The influence of nitrogen versus phosphorus. *PLoS ONE*, 7(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038757>
- Douterelo, I., Boxall, J. B., Deines, P., Sekar, R., Fish, K. E., & Biggs, C. A. (2014a). Methodological approaches for studying the microbial ecology of drinking water distribution systems. *Water Research*, 65, 134–156. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.07.008>
- Douterelo, I., Boxall, J. B., Deines, P., Sekar, R., Fish, K. E., & Biggs, C. A. (2014b). Methodological approaches for studying the microbial ecology of drinking water distribution systems. *Water Research*, 65, 134–156. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.07.008>
- Edgar, R. C. (2017). UNBIAS: An attempt to correct abundance bias in 16S sequencing, with limited success. *BioRxiv*, 124149. <https://doi.org/10.1101/124149>
- Eiler, A., & Bertilsson, S. (2004). Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish lakes. *Environmental Microbiology*, 6(12), 1228–1243. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00657.x>
- Eiler, A., Zaremba-Niedzwiedzka, K., Mart??nez-Garc??a, M., McMahon, K. D., Stepanauskas, R., Andersson, S. G. E., & Bertilsson, S. (2014). Productivity and salinity structuring of the microplankton

- revealed by comparative freshwater metagenomics. *Environmental Microbiology*, 16(9), 2682–2698. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12301>
- Ferrão-Filho, A. D. S., & Kozłowsky-Suzuki, B. (2011). Cyanotoxins: Bioaccumulation and effects on aquatic animals. *Marine Drugs*, 9(12), 2729–2772. <https://doi.org/10.3390/md9122729>
- Fujimoto, M., Moyerbrailean, G. A., Noman, S., Gizicki, J. P., Ram, M. L., Green, P. A., & Ram, J. L. (2014). Application of ion torrent sequencing to the assessment of the effect of alkali ballast water treatment on microbial community diversity. *PLoS ONE*, 9(9), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107534>
- Goodrich, J. K., Di Rienzi, S. C., Poole, A. C., Koren, O., Walters, W. A., Caporaso, J. G., Knight, R., & Ley, R. E. (2014). Conducting a Microbiome Study - S0092-8674(14)00864-2.pdf. *Cell*, 158(2), 250–262. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.037>
- Graham, L., Graham, J., & Wilcox, L. (2009). *Algae* (2nd ed.). Benjamin Cummings.
- Hamady, M., Walker, J. J., Harris, J. K., Gold, N. J., & Knight, R. (2012). NIH Public Access. *Life Sciences*, 5(3), 235–237. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1184>. Error-correcting
- Hammer, Ø., Harper, D. A., & Ryan, D. D. (2001). Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 178kb. T. Harper. *Geological Museum*, 4(4), 5–7. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.05.025>
- Handelsman, J. (2004). Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 68(4), 669–685. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.4.669-685.2004>
- Henson, M. W., Hanssen, J., Spooner, G., Fleming, P., Pukonen, M., Stahr, F., & Thrash, J. C. (2018). Nutrient dynamics and stream order influence microbial community patterns along a 2914 kilometer transect of the Mississippi River. *Limnology and Oceanography*, 63(5), 1837–1855. <https://doi.org/10.1002/lno.10811>
- Hoffmann, C., Minkah, N., Leipzig, J., Wang, G., Arens, M. Q., Tebas, P., & Bushman, F. D. (2007). DNA bar coding and pyrosequencing to identify rare HIV drug resistance mutations. *Nucleic Acids Research*, 35(13), 1–8. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm435>
- Holland, A., & Kinnear, S. (2013). Interpreting the Possible Ecological Role(s) of Cyanotoxins: Compounds for Competitive Advantage and/or Physiological Aide? *Marine Drugs*, 11(7), 2239–2258. <https://doi.org/10.3390/md11072239>
- Hu, M., Wang, X., Wen, X., & Xia, Y. (2012). Microbial community structures in different wastewater treatment plants as revealed by 454-pyrosequencing analysis. *Bioresource Technology*, 117, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.061>
- Jianlin, J., Kerri A., A., Ajaib, S., & Lihua, X. (2005). Development of Procedures for Direct Extraction of Cryptosporidium DNA from Water Concentrates and for Relief of PCR Inhibitors. *Appl Environ Microbiol*, 71(3), 1135–1141.
- K. R. Clarke. (1993). Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology*, 18(1988), 117–143. <https://doi.org/10.1071/WR9840181>
- Kaevska, M., Videnska, P., Sedlar, K., & Slana, I. (2016). Seasonal changes in microbial community composition in river water studied using 454-pyrosequencing. *SpringerPlus*, 5(1), 409. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2043-6>
- Kato, T., Kuroda, H., & Nakasone, H. (2009). Runoff characteristics of nutrients from an agricultural watershed with intensive livestock production. *Journal of Hydrology*, 368(1–4), 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2009.01.028>
- Kemp, P. F., & Aller, J. Y. (2004). LIMNOLOGY OCEANOGRAPHY : METHODS Estimating prokaryotic diversity : When are 16S rDNA libraries large enough ? *Assessment*, 1, 114–125.
- Kennedy, K., Hall, M. W., Lynch, M. D. J., Moreno-Hagelsieb, G., & Neufeld, J. D. (2014). Evaluating bias of Illumina-based bacterial 16S rRNA gene profiles. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(18), 5717–5722. <https://doi.org/10.1128/AEM.01451-14>
- Kim, B. R., Shin, J., Guevarra, R. B., Lee, J. H., Kim, D. W., Seol, K. H., Lee, J. H., Kim, H. B., & Isaacson, R. E. (2017). Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities. *Journal*

- of *Microbiology and Biotechnology*, 27(12), 2089–2093. <https://doi.org/10.4014/jmb.1709.09027>
- Kimbrel, J. A., Ballor, N., Wu, Y. W., David, M. M., Hazen, T. C., Simmons, B. A., Singer, S. W., & Jansson, J. K. (2018). Microbial community structure and functional potential along a hypersaline gradient. *Frontiers in Microbiology*, 9(JUL), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01492>
- Kindt, R., & Coe, R. (2010). Tree diversity analysis. *World Agroforestry Centre*, 18(18), 18598–18614. <https://doi.org/10.1198/tas.2008.s264>
- Kreader, C. A. (1996). *Kreader Relief of Amplification Inhibition PCR with T4 Gene 32 Protein*. 62(3), 1102–1106.
- Kruk, C., Segura, A., Nogueira, L., Carballo, C., Martínez de la Escalera, G., Calliari, D., Ferrari, G., Simoens, M., Cea, J., Alcántara, I., Vico, P., Míguez, D., & Piccini, C. (2015). Herramientas para el monitoreo y sistema de alerta de floraciones de cianobacterias nocivas : Río Uruguay y Río de la Plata. *INNOTEC*, 10, 23–39.
- Kruk, C., Suárez, C., Ríos, M., Martino, D., & Zaldúa, N. (2013). Análisis Calidad de Agua en Uruguay. *Informe Vida Silvestre*, 9. <http://vidasilvestre.org.uy/wp-content/uploads/2013/09/informeaguafinalcm1.pdf>
- Labbate, M., Seymour, J. R., Lauro, F., & Brown, M. V. (2016). *Anthropogenic Impacts on the Microbial Ecology and Function of Aquatic Environments*. Frontiers Media SA. <https://books.google.com.uy/books?id=H4kwDwAAQBAJ>
- Langille, M. G. I., Zaneveld, J., Caporaso, J. G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J. A., Clemente, J. C., Burkepille, D. E., Vega Thurber, R. L., Knight, R., Beiko, R. G., & Huttenhower, C. (2013). Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature Biotechnology*, 31(9), 814–821. <https://doi.org/10.1038/nbt.2676>
- Laursen, M. F., Dalgaard, M. D., & Bahl, M. I. (2017). Genomic GC-content affects the accuracy of 16S rRNA gene sequencing based microbial profiling due to PCR bias. *Frontiers in Microbiology*, 8(OCT), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01934>
- Legendre, P., & Legendre, L. (2000). *Numerical Ecology* (ELSEIVER (ed.); 2nd ed.).
- Legendre, Pierre, Borcard, D., & Peres-Neto, P. R. (2005). Concep Ts & Synthesis. *Ecological Monographs*, 75(4), 435–450.
- Life Technologies. (2012). *Ion Amplicon Library Preparation (Fusion Method) for use with : Ion Torrent Personal Genome Machine ® System*. 4468326, 1–19.
- López de Heredia, U. (2016). Las técnicas de secuenciación masiva en el estudio de la diversidad biológica. *Munibe Ciencias Naturales*, 64(December). <https://doi.org/10.21630/mcn.2016.64.07>
- Louati, I., Pascault, N., Debros, D., Bernard, C., Humbert, J. F., & Leloup, J. (2015). Structural diversity of bacterial communities associated with bloom-forming freshwater cyanobacteria differs according to the cyanobacterial genus. *PLOS ONE*, 10(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140614>
- Lozupone, C., Lladser, M. E., Knights, D., Stombaugh, J., & Knight, R. (2010). UniFrac : an effective distance metric for microbial community comparison. *The ISME Journal*, 5(2), 169–172. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.133>
- Magurran, A.E. (2006). *Measuring biological diversity* (Maldem & MA (eds.)). Blackwell Publishing.
- Magurran, Anne E., & Henderson, P. A. (2003). Explaining the excess of rare species in natural species abundance distributions. *Nature*, 422(6933), 714–716. <https://doi.org/10.1038/nature01547>
- Malham, S. K., Rajko-Nenow, P., Howlett, E., Tuson, K. E., Perkins, T. L., Pallett, D. W., Wang, H., Jago, C. F., Jones, D. L., & McDonald, J. E. (2014). The interaction of human microbial pathogens, particulate material and nutrients in estuarine environments and their impacts on recreational and shellfish waters. *Environmental Science. Processes & Impacts*, 16(9), 2145–2155. <https://doi.org/10.1039/c4em00031e>
- Malmstrom, R. R., Kiene, R. P., Cottrell, M. T., & Kirchman, D. L. (2004). Contribution of SAR11 bacteria to dissolved dimethylsulfoniopropionate and amino acid uptake in the North Atlantic Ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7), 4129–4135. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.7.4129-4135.2004>

- Martínez de la Escalera, G., Kruk, C., Segura, A. M., Nogueira, L., Alcántara, I., & Piccini, C. (2017a). Dynamics of toxic genotypes of *Microcystis aeruginosa* complex (MAC) through a wide freshwater to marine environmental gradient. *Harmful Algae*, *62*, 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.11.012>
- Martínez de la Escalera, G., Kruk, C., Segura, A. M., Nogueira, L., Alcántara, I., & Piccini, C. (2017b). Dynamics of toxic genotypes of *Microcystis aeruginosa* complex (MAC) through a wide freshwater to marine environmental gradient. *Harmful Algae*, *62*, 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.11.012>
- Martínez De La Escalera, G., Piccini, C., & Kruk, C. (2015). *Dinámica y condicionantes ambientales de genotipos tóxicos del complejo Microcystis aeruginosa en el río Uruguay-Río de la Plata*.
- Martínez de la Escalera, G., Segura, A., Calliari, D., Miguez, D., Kruk, C., & Piccini, C. (2014). Variación espacial de genotipos tóxicos de *Microcystis* spp. en el sistema Río Uruguay-Río de la Plata. *Jornadas Interdisciplinarias En Biodiversidad y Ecología, Cure-Rocha*.
- Matthews, T. J., & Whittaker, R. J. (2015). On the species abundance distribution in applied ecology and biodiversity management. *Journal of Applied Ecology*, *52*(2), 443–454. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12380>
- Meyer, M., Stenzel, U., & Hofreiter, M. (2008). Parallel tagged sequencing on the 454 platform. *Nature Protocols*, *3*(2), 267–278. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.520>
- Milani, C., Hevia, A., Foroni, E., Duranti, S., Turrioni, F., Lugli, G. A., Sanchez, B., Martín, R., Gueimonde, M., van Sinderen, D., Margolles, A., & Ventura, M. (2013). Assessing the Fecal Microbiota: An Optimized Ion Torrent 16S rRNA Gene-Based Analysis Protocol. *PLoS ONE*, *8*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068739>
- Morado, M. (2016). *Diversidad de bacterioplancton en relación con los factores ambientales en las aguas superficiales de la costa de A Coruña*.
- Morris, R., Rappé, M., Connon, S., Vergin, K., Siebold, W., Carlson, C., & Giovannoni, S. (2002). SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. *Nature*, *420*(6917), 806–810. <https://doi.org/10.1038/nature01240>
- MVOTMA. (2017). *Plan Nacional de Aguas: Propuesta elevada a consideración del Poder Ejecutivo*. 1–318.
- Nguyen, N. H., Smith, D., Peay, K., & Kennedy, P. (2015). Parsing ecological signal from noise in next generation amplicon sequencing. *New Phytologist*, *205*(4), 1389–1393. <https://doi.org/10.1111/nph.12923>
- Nogueira, L. (2018). Efectos del gradiente ambiental sobre floraciones fitoplanctónicas en el sistema Río Uruguay-Río de la Plata: una aproximación funcional. *Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias UDELAR (Uruguay)*.
- Oksanen, J. (2017). Vegan: ecological diversity. *R Package Version 2.4-4*, 11. <https://doi.org/10.1029/2006JF000545>
- Oliver, J. D. (2010). Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, *34*(4), 415–425. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x>
- Pandey, P. K., Kass, P. H., Soupir, M. L., Biswas, S., & Singh, V. P. (2014). Contamination of water resources by pathogenic bacteria. *AMB Express*, *4*, 51. <https://doi.org/10.1186/s13568-014-0051-x>
- Perrin, Y., Bouchon, D., Delafont, V., Moulin, L., & Héchard, Y. (2019). Microbiome of drinking water: A full-scale spatio-temporal study to monitor water quality in the Paris distribution system. *Water Research*, *149*(November), 375–385. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.11.013>
- Piccini, C., & García-Alonso, J. (2015). Bacterial diversity patterns of the intertidal biofilm in urban beaches of Río de la Plata. *Marine Pollution Bulletin*, *1*, 476–482.
- Piccini, Claudia, Aubriot, L., Fabre, A., Amaral, V., González-Piana, M., Giani, A., Figueredo, C. C., Vidal, L., Kruk, C., & Bonilla, S. (2011). Genetic and eco-physiological differences of South American *Cylindrospermopsis raciborskii* isolates support the hypothesis of multiple ecotypes. *Harmful Algae*, *10*(6), 644–653. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.04.016>
- Piccini, Claudia, Conde, D., Alonso, C., Sommaruga, R., & Pernthaler, J. (2006a). Blooms of single bacterial species in a coastal lagoon of the southwestern Atlantic Ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(10), 6560–6568. <https://doi.org/10.1128/AEM.01089-06>

- Piccini, Claudia, Conde, D., Alonso, C., Sommaruga, R., & Pernthaler, J. (2006b). Blooms of single bacterial species in a coastal lagoon of the southwestern Atlantic Ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(10), 6560–6568. <https://doi.org/10.1128/AEM.01089-06>
- Price, M. N., Dehal, P. S., & Arkin, A. P. (2010). FastTree 2 - Approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS ONE*, *5*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>
- Ramanan, R., Kim, B. H., Cho, D. H., Oh, H. M., & Kim, H. S. (2016). Algae-bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications. *Biotechnology Advances*, *34*(1), 14–29. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.12.003>
- Ramírez-Castillo, F. Y., Loera-Muro, A., Jacques, M., Garneau, P., Avelar-González, F. J., Harel, J., & Guerrero-Barrera, A. L. (2015). Waterborne pathogens: detection methods and challenges. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, *4*(2), 307–334. <https://doi.org/10.3390/pathogens4020307>
- Rastogi, R. P., Madamwar, D., & Incharoensakdi, A. (2015). Bloom dynamics of cyanobacteria and their toxins: Environmental health impacts and mitigation strategies. *Frontiers in Microbiology*, *6*(NOV), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01254>
- Rényi, A. (1961). Observability of Rényi's entropy. *Physical Review. E, Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, *69*(2), 026128.
- Rideout, J. R., He, Y., Navas-Molina, J. A., Walters, W. A., Ursell, L. K., Gibbons, S. M., Chase, J., McDonald, D., Gonzalez, A., Robbins-Pianka, A., Clemente, J. C., Gilbert, J. A., Huse, S. M., Zhou, H.-W., Knight, R., & Caporaso, J. G. (2014). Subsampled open-reference clustering creates consistent, comprehensive OTU definitions and scales to billions of sequences. *PeerJ*, *2*, e545. <https://doi.org/10.7717/peerj.545>
- Riesenfeld, C. S., Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2004). Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annu Rev Genet*, *38*, 525–552. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.38.072902.091216>
- Robasky, K., E.N, L., & Church, G. . (2014). The Role of Replicates for Error Mitigation in Next-Generation Sequencing. *Nat Rev Genet.*, *15*(1), 56–62. <https://doi.org/10.1038/nrg3655>.The
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., & Mahé, F. (2016). VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, *4*, e2584. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>
- Rosenberg, E. (2011). *The Prokaryotes* (Vol. 12, Issue 5). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-38954-2>
- Schnell, J. K., & Safi, K. (2016). Biodiversity Conservation and Phylogenetic Systematics. *Biodiversity Conservation and Phylogenetic Systematics*, *14*, 319–332. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-22461-9>
- Schreiber, C., Rechenburg, A., Rind, E., & Kistemann, T. (2015). The impact of land use on microbial surface water pollution. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, *218*(2), 181–187. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2014.09.006>
- Shen, H., Niu, Y., Xie, P., Tao, M., & Yang, X. (2011). Morphological and physiological changes in *Microcystis aeruginosa* as a result of interactions with heterotrophic bacteria. *Freshwater Biology*, *56*(6), 1065–1080. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2010.02551.x>
- Shokralla, S., Spall, J. L., Gibson, J. F., & Hajibabaei, M. (2012). Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular Ecology*, *21*(8), 1794–1805. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05538.x>
- Song, L., Huang, W., Kang, J., Huang, Y., Ren, H., & Ding, K. (2017). Comparison of error correction algorithms for Ion Torrent PGM data: Application to hepatitis B virus. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08139-y>
- Stackebrandt, E., & Goebel, B. M. (1994). Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *44*(4), 846–849. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)43317-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)43317-4)
- Suzuki, M. T., & Giovannoni, S. J. (1996). Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by B i a s C a u s e d b y T e m p l a t e A n n e a l i n g i n t h e A m p l i f i c a t i o n o f M i x t u r e s o f 1 6 S r R N A G e n e s b y P C R †. *Applied and Environmental Microbiology*, *62*(2),

- Thukral, A. K. (2017). A review on measurement of Alpha diversity in biology. *Agricultural Research Journal*, 54(1), 1. <https://doi.org/10.5958/2395-146X.2017.00001.1>
- Tilman, D. (2001). Functional diversity. In *Encyclopedia of Biodiversity* (Vol. 3, Issue 3, pp. 109–120). <https://doi.org/10.1016/B0-12-226865-2/00132-2>
- Tremblay, J., Singh, K., Fern, A., Kirton, E. S., He, S., Woyke, T., Lee, J., Chen, F., Dangl, J. L., & Tringe, S. G. (2015). Primer and platform effects on 16S rRNA tag sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 6(AUG), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00771>
- Ulrich, W., Soliveres, S., Thomas, A. D., Dougill, A. J., & Maestre, F. T. (2016). Environmental correlates of species rank - abundance distributions in global drylands. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 20, 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2016.04.004>
- UNESCO. (2009). *Cianobacterias Planctónicas del Uruguay. Manual para la identificación y medidas de gestión* (S. Bonilla (ed.); PHI-VII).
- Üveges, V., Tapolczai, K., Krienitz, L., & Padisák, J. (2012). Photosynthetic characteristics and physiological plasticity of an *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria, Nostocaceae) winter bloom in a deep oligo-mesotrophic lake (Lake Stechlin, Germany). *Hydrobiologia*, 698(1), 263–272. <https://doi.org/10.1007/s10750-012-1103-3>
- Wang, M., Zhang, D., Dong, J., & Tan, S. K. (2017). Application of constructed wetlands for treating agricultural runoff and agro-industrial wastewater: a review. *Hydrobiologia*, 1–31. <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3315-z>
- Ward, D., & Cohan, F. (2005). Microbial Diversity on Hot Spring Cyanobacterial Mats: Pattern and Prediction. In *Geothermal biology and geochemistry in Yellowstone National Park* (W. P. Insk). Thermal Biology Institute.
- Wayne, L. ., Moore, W. E. C., Stackebrandt, E., Kandler, O., Colwell, R. R., Krichevsky, M. I., Truper, H. G., Murray, R. G. E., Wayne, L. G., Grimont, P. A. D., Brenner, D. J., Starr, M. P., & Moore, L. H. (1987). Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 37(4), 463–464. <https://doi.org/10.1099/00207713-37-4-463>
- Weber, K. A. (1907). *Aufbau und vegetation der Moore Norddeutschlands*.
- Whittaker, A. R. H. (1965). Dominance and Diversity in Land Plant Communities Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/1715420> REFERENCES Linked references are available on JSTOR for this article : You may need to lo. *Science*, 147(3655), 250–260.
- Wu, R. S. S., Avenue, T. C., & Kong, H. (1999). *Eutrophication , Water Borne Pathogens and Xenobiotic Compounds : Environmental Risks and Challenges*. 39(99), 11–22.
- Xue, Z., Kable, M. E., & Marco, M. L. (2018). Impact of DNA Sequencing and Analysis Methods on 16S rRNA Gene Bacterial Community Analysis of Dairy Products. *MSphere*, 3(5), 1–14. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00410-18>
- Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F. O., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., Whitman, W. B., Euzéby, J., Amann, R., & Rosselló-Móra, R. (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews. Microbiology*, 12(9), 635–645. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3330>
- Zhou, J., Wu, L., Deng, Y., Zhi, X., Jiang, Y. H., Tu, Q., Xie, J., Van Nostrand, J. D., He, Z., & Yang, Y. (2011). Reproducibility and quantitation of amplicon sequencing-based detection. *ISME Journal*, 5(8), 1303–1313. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.11>
- Zhu, L., Zancarini, A., Louati, I., De Cesare, S., Duval, C., Tambosco, K., Bernard, C., Debroas, D., Song, L., Leloup, J., & Humbert, J. F. (2016). Bacterial communities associated with four cyanobacterial genera display structural and functional differences: Evidence from an experimental approach. *Frontiers in Microbiology*, 7(OCT), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01662>
- Zimmerman, L. J., & Fuscoe, J. C. (1991). Direct DNA sequencing of PCR products. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 18(4), 274–276. <https://doi.org/10.1002/em.2850180413>

Zipper, H. (2003). Mechanisms underlying the impact of humic acids on DNA quantification by SYBR Green I and consequences for the analysis of soils and aquatic sediments. *Nucleic Acids Research*, 31(7), 39e – 39. <https://doi.org/10.1093/nar/gng039>

Zubkov, M. V. (2009). Photoheterotrophy in marine prokaryotes. *Journal of Plankton Research*, 31(9), 933–938. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbp043>

ANEXO

Anexo 1.

Tabla 1A. Parámetros utilizados para el estudio de la diversidad alfa.

Parámetro	Aplicación	Ecuación
Riqueza observada	El número de OTUs observadas, agrupadas utilizando un 97% de identidad.	
Índice de diversidad filogenética o <i>Phylogenetic Diversity (PD)</i>	Medida representada por la suma de las longitudes de las ramas que conectan un grupo de taxones (Faith 1992). Utiliza el cálculo de la riqueza de especies esperada (S), la cual se define como la suma de probabilidades (p) de cada especie que ocurre en un subconjunto de m unidades de acumulación (Ec. 1) (Pellens libro). Entonces, para un conjunto de especies S, hay un conjunto correspondiente de segmentos de rama T. Cada segmento de rama (j) tiene una longitud (L) medida como cantidad de sustituciones de secuencia o algún otro parámetro estimado de diferencia biológica significativa (Ec. 2)	Ec. 1 $E[S]_m = \sum S_i \cdot m p_i$ Ec. 2 $PD = \sum T_j, L_j$
El índice no paramétrico de Chao.1	Se basa en la presencia de las especies representadas por un solo y dos individuos en toda la comunidad muestreada (Ec. 3). En donde Sobs es la riqueza observada (número de especies) y n1 y n2 es el número de especies observadas una única vez y dos veces respectivamente (Chao 1987).	Ec. 3 $Chao.1 = Sobs + (n1/2n2)$
Índice de Shannon-Weiner (Shannon_H)	Índice o entropía de Shannon . Medida de diversidad que tiene en cuenta el número de individuos y el número de taxones presentes (entre 0 y 1, Ec. 4) Siendo ni el número de individuos de una especie (OTU) i en la comunidad, y n el número de total de individuos en la muestra (ni/n como la proporción de especies i). La equitatividad de Shannon da cuenta de la distribución de las abundancias de las OTUs presentes. Analiza la distribución de la comunidad en relación al valor máximo posible que tomaría asumiendo que los individuos están distribuidos de manera equivalente (entre 0 y 1). Se calcula través de la ecuación Ec. 5 siendo Sobs el número de individuos observados. (Libro biodiversity) (Tesis Bertoglio).	Ec. 4 $H = - \sum_i \frac{n_i}{n} \ln \frac{n_i}{n}$ Equitatividad de Shannon-Weiner Ec 5. $J = H / \ln (Sobs)$
Índice de Dominancia (D) y de Simpson (1-D)	El índice de dominancia de Simpson se calcula de acuerdo a la ecuación Ec.6, siendo ni el número de individuos de una OTU i. Por otra parte, el índice de Simpson se calcula como 1 menos dicho valor. Es una medida de la equitatividad de la comunidad de 0 a 1 (Simpson 1943).	Ec 6. $D = \sum_i \left(\frac{n_i}{n} \right)^2$ Índice de Simpson = 1-D.
ANOSIM	Análisis de similitud. Test no paramétrico el cual consiste en determinar estadísticamente la significancia de las diferencias entre dos o más grupos de unidades muestreadas, utilizando una matriz de disimilitud o distancia rankeada (Clarke 1993).	
SIMPER, Bary'-Curtis	Porcentaje de similitud. Método simple para evaluar aquellos taxones responsables de diferencias observada entre grupos de muestras (Clarke, 1993). El significado general de dicha disimilitud es generalmente evaluado mediante un ANOSIM. La distancia de Bray-Curtis (1957) es calculada según la Ec 7. en donde y representa la abundancia de la fila i-ésima y la similitud completa se alcanza cuando toma un valor de 100%.	$S_{jk} = 100 \left\{ 1 - \frac{\sum_{i=1}^n y_{ij} - y_{ik} }{\sum_{i=1}^n y_{ii} + y_{kk} } \right\}$
Abundancia Rankeada	Distribución de abundancia de las especies en la que se grafican las abundancias logarítmicas en orden decreciente (rankeadas). Las curvas de distribución son utilizadas para estudiar características de los ecosistemas de acuerdo a distribuciones a las cuales se ajusta (Whittaker 2015). En la Ec.8 y 9 se calculan la distribución logarítmica y de Zipf respectivamente. Donde α_r es la abundancia esperada a un ranking dado r, S es la riqueza, N la abundancia y los otros parámetros están estandarizados para la función dada.	Ec 8. $\hat{\alpha}_r = \exp [\log(\mu) + \log(\sigma)\Phi]$ Ec9 $\hat{\alpha}_r = N \hat{p}_1 r^{-\gamma}$

Anexo 2.

Tabla 2A. Resultados de la extracción de ADN genómico de muestras de agua.

Muestra	Vol filtrado (mL)	ng/ μ L	Abs 260/280 nm	Abs 260/230 nm
MARPECO	200	11,8	2,29	0,10
MARSACO	250	8,4	1,68	0,46
MARCOCO	150	0,9	1,13	0,09
MAR14PECO	300	9,9	2,43	0,10
MAR14SACO	150	21,0	1,70	0,11

Anexo 5.

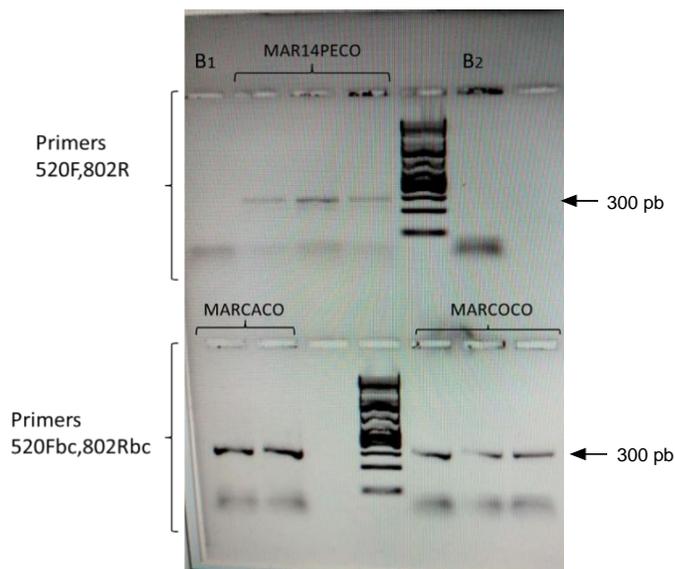


Figura 1A. Amplificación de las muestras MAR14PECO, MARCACO y MARCOCO con los *primers* 520F y 802R y 520Fbc y 802Rbc luego del agregado de BSA. MP-Marcador de peso molecular 1Kb Plus (Thermo-Fisher), B-blanco.

Anexo 3.

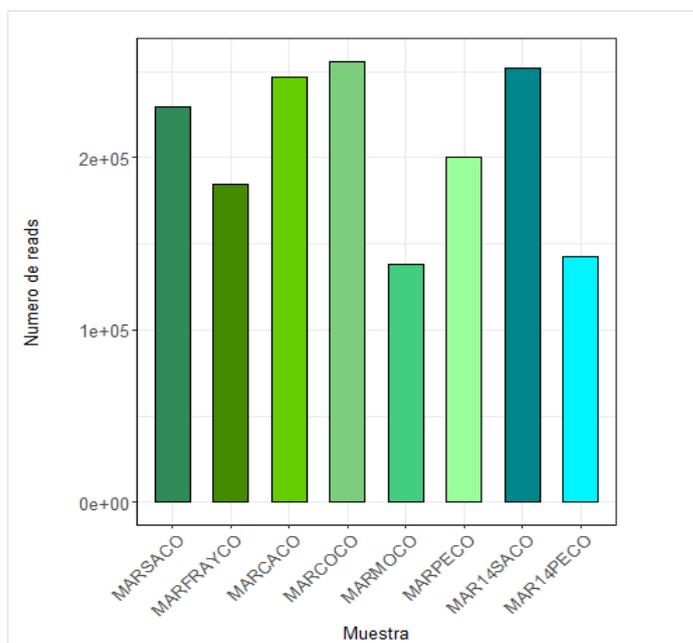


Figura 2A. Número de *reads* en muestras de gradiente Río Uruguay-Río de la Plata.