



**UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY**



**FACULTAD DE
CIENCIAS**

UDELAR | fcien.edu.uy

Tesina de grado - Licenciatura en Bioquímica

**Caso de estudio Embalse Palmar: Detección
molecular de comunidades bacterianas en aguas y su
aplicación en sistemas eutrofizados**

Bruna Cizmic Gaione

Tutora: Msc. Noelia Rivas

Cotutora: Dra. Alexandra Castro

Laboratorio de Ecotoxicología y Química Ambiental y Laboratorio de Biología

Molecular Vegetal de Facultad de Ciencias

Universidad de la República

Montevideo, Uruguay

2023

Agradecimientos

En primer lugar le agradezco a mis tutoras, Noelia Rivas y Alexandra Castro por enseñarme y ayudarme en este largo proceso, y a Gabriela Eguren por establecer el primer vínculo.

También agradezco el tiempo brindado y la colaboración de Guillermo Chalar de la Sección Limnología, Lucía Calleros e integrantes del Laboratorio de Genética Evolutiva y Gastón Azziz del Laboratorio de Microbiología de Facultad de Agronomía.

Por último muchas letritas de amor para toda mi familia por estar siempre, así como para mis amigas y amigos, especialmente mis colegas bioquímicas.

Resumen

La eutrofización de ecosistemas acuáticos tiene un impacto significativo en la calidad del agua, afectando negativamente la salud del ecosistema y la supervivencia de organismos vivos que dependen de este recurso. En el país, muchos cursos de agua, entre ellos los embalses, se ven afectados por este fenómeno, comúnmente inducida por influencia antrópica y cambios estacionales. Siendo uno de los síntomas más comúnmente observados la floración de cianobacterias, es claro que este fenómeno repercute sobre la comunidad de bacterias en el agua, modificando su estructura y diversidad. En el presente trabajo se adaptó un método de extracción de ADN genómico específicamente para caracterizar la comunidad microbiológica en embalses del Río Negro. Luego, como una primera aproximación, se compararon los taxones y características encontradas de esta comunidad con antecedentes reportados por métodos tradicionales, además de analizar su relación con los parámetros fisicoquímicos asociados propios de la región. Aunque se logró diferenciar composicionalmente las muestras según su ubicación en la columna de agua y se establecieron asociaciones entre características de cada una, persisten interrogantes sobre la reproducibilidad de la técnica. Se proponen modificaciones a la metodología aplicada para futuros estudios en embalses del país, entendiendo relevante la información que esta técnica puede aportar a la gestión de estos ecosistemas.

Palabras clave: eutrofización, gestión de ecosistemas acuáticos, ADN genómico, secuenciación de ampliaciones, ARNr 16S, comunidad microbiana

Índice

Introducción	4
<i>Repercusión de la eutrofización sobre comunidades biológicas</i>	4
<i>Desarrollo de nuevos bioindicadores</i>	6
<i>ADN ambiental como nueva herramienta</i>	8
Objetivos	11
Metodología	12
<i>Sitio de estudio</i>	12
<i>Diseño de muestreo</i>	13
<i>Análisis fisicoquímico del agua y determinación de estado trófico</i>	14
<i>Extracción de ADN genómico</i>	16
<i>Preparación de librerías</i>	17
<i>Secuenciación masiva ARNr 16s y análisis bioinformático</i>	19
Resultados	21
<i>Puesta a punto</i>	21
<i>Aplicación de la técnica para un caso de estudio</i>	25
<i>Fisicoquímica</i>	25
<i>Análisis molecular</i>	30
Discusión	37
<i>Puesta a punto</i>	37
<i>Aplicación de la técnica para un caso de estudio: caracterización del embalse</i>	39
Conclusiones y perspectivas	44
Bibliografía	45

Introducción

Repercusión de la eutrofización sobre comunidades biológicas

En Uruguay diversos ecosistemas acuáticos se ven afectados por la eutrofización (*Informe del Estado del Ambiente 2016-2019*, 2020; Kruk et al., 2013), lo que implica que en ellos se hallan concentraciones elevadas de nutrientes como fósforo y nitrógeno. La mayor disponibilidad de nutrientes esenciales para el desarrollo de ciertos organismos provoca el aumento general de la productividad de estos sistemas, lo que impacta negativamente en su salud (Wetzel, 2001).

Existen múltiples disparadores del fenómeno de eutrofización, siendo uno de ellos el represamiento de cursos de agua. La construcción de embalses, ya sea para la producción de energía hidroeléctrica o para riego de cultivos, produce el pasaje de un ecosistema terrestre a uno acuático debido a la inundación, lo que aporta cantidades significativas de materia orgánica. Así como también genera un cambio en el régimen hidrológico, donde un sistema léntico adquiere cualidades de lóxico a lo largo del eje longitudinal (Thorton et al., 1981).

En particular, el represamiento influye directamente en los tiempos de residencia y afecta la retención y exportación de nutrientes en los embalses (Montemurro, 2017). Además, también es un posible catalizador de la liberación de la carga interna del fósforo (Qin et al., 2020). Considerando que el fósforo en el sedimento puede encontrarse disponible en mayor o menor medida y eventos particulares de hipoxia- anoxia producen el suceso (Rydin, 2000). Este fenómeno, a la hora de la gestión, hace importante tener en cuenta no solo los aportes externos de nutrientes sino que requiere la comprensión del comportamiento interno de cada sistema, y cómo estas modificaciones repercuten en su funcionamiento.

Considerando que el 48% del volumen ribereño mundial se encontraba represado en 2015, y que se encuentra una clara tendencia al aumento de esta práctica, estas obras ingenieriles son sin duda un factor que influye en la integridad de los ecosistemas acuáticos (Grill et al., 2015).

En Uruguay se ha observado el efecto de la modificación física de los cursos de agua tanto en los principales ríos del país, como en pequeños arroyos por la implementación de embalses que modifican sus características y que tienen consecuencias en su salud (Kruk et al., 2023; Zabaleta et al., 2023). En particular, en el Río Negro la inundación de pasturas y bosque ribereños provocó el desprendimiento de compuestos de carbono, que repercuten en la oxigenación del agua, y otros elementos que provienen de las especies vegetales terrestres (Campo & Sancholuz, 1998).

En el caso particular de la represa Palmar, participe de la cadena de embalses que se encuentra a lo largo del Río Negro, la mayor estabilidad física hace más probable visualizar el aumento de biomasa algal (Illarze, 2015), siendo los cambios en el régimen hidrológico un factor que

normalmente favorece este fenómeno (Rangel et al., 2012). Consecuentemente, uno de los síntomas más comunes de la eutrofización son las floraciones de cianobacterias, es decir, el crecimiento explosivo de organismos fotosintetizadores que ahora no cuentan con factores limitantes como lo son los nutrientes (Paerl et al., 2001). Las repercusiones se hallan a nivel de la fisicoquímica del agua, por ejemplo promoviendo mayor desoxigenación de los fondos, cambios en el pH y turbidez del agua (Li et al., 2022a; Paerl et al., 2001). Pero también provocan cambios estructurales en otras comunidades, como el zooplancton, plantas acuáticas y bacterias (Amorim & Moura, 2021; Geng et al., 2022; Wu et al., 2015).

Los también llamados *blooms* deterioran la calidad del agua, cambiando su olor y sabor. Particularmente, la proliferación de cianobacterias trae consigo mayor abundancia de los metabolitos que ellas producen, que pueden ser tóxicos para otros seres vivos (Chorus, 2001; Wang et al., 2021b). A estas moléculas también se les llama cianotoxinas y un ejemplo presente en los cursos de agua nacionales son las microcistinas (Bonilla et al., 2021). Como resultado el fenómeno compromete el agua como servicio ecosistémico, repercutiendo a nivel social por posibles riesgos en la salud de quienes la utilizan como medio recreativo y de consumo.

Otras causas, de origen antropogénico, preponderantes de la eutrofización en el país son: la intensificación agrícola, que actúa como fuente difusa de estos nutrientes (Goyenola, 2016; Kruk et al., 2023), el vertido de efluentes industriales y domésticos (Olano et al., 2019), y el cambio climático (Jeppesen et al., 2010).

Las modificaciones antropogénicas introducidas en distintos ecosistemas y sus síntomas son las causantes de la tendencia global a la homogeneización biótica de las comunidades (McKinney & Lockwood, 1999). En el caso específico de los microbiomas, bajo condiciones de estrés ambiental se observan propiedades características de comunidades inestables (ej, disminución de la diversidad, pérdida de modularidad) (Hernandez et al., 2021).

En ambientes acuáticos, el impacto traducido a una elevada carga de nutrientes produce cambios estructurales y funcionales en sus comunidades, y particularmente sobre el microbioma acuático la eutrofización y sus síntomas específicos como los *blooms* de especies fitoplanctónicas también producen cambios en la diversidad microbiológica, no solo por el aumento en proporción de cianobacterias (Fandino et al., 2001; Geng et al., 2022; Wemheuer et al., 2015).

Los microorganismos cumplen funciones como la remineralización de materia orgánica disuelta (Amon & Benner, 1996) y participan en su asimilación y reintroducción a las redes tróficas a través del llamado bucle microbiano (Azam et al., 1983). A su vez se involucran en varias etapas de los ciclos biogeoquímicos (Newton et al., 2011). Todos estos procesos se ven afectados por la eutrofización, por ejemplo al mermar los *blooms* queda una gran cantidad de carbono orgánico que es degradado por un conjunto favorecido de bacterias (Pinhassi et al., 2004; Shi et al., 2017). Además, los nutrientes persisten luego de la lisis algal.

También los factores temporales y espaciales influyen en la composición de las comunidades bacterianas, ya que se manifiestan sobre variables relevantes como la temperatura y el pH (Lindström et al., 2005; Liu et al., 2013). Por otro lado, en las represas se encuentran los cambios de carga hidráulica como principales modeladores de la estabilidad de esta comunidad (Li et al., 2022b). La multiplicidad de factores involucrados dificulta la discriminación de aquellos que tienen un rol más influyente, sobre todo en situaciones de estrés ambiental.

A pesar de que se encuentra que las comunidades en su totalidad son resilientes y que puede haber un restablecimiento del equilibrio luego de un *bloom* (Berry et al., 2017; Woodhouse et al., 2016), a largo plazo estas comunidades se adaptan a las características del medio y se alcanza un nuevo equilibrio (Shade et al., 2011). Y sin embargo en este proceso adaptativo se puede observar una pequeña disminución de la diversidad taxonómica, y mayor a nivel funcional (Wang et al., 2022a). Por ejemplo, se ven perjudicados aquellos taxones que cumplen funciones específicas (ej. la degradación de ciertos compuestos poliméricos o toxinas) por ser producidas por un pequeño grupo de microorganismos más propenso a perderse, y al mismo tiempo que se ven afectados procesos globales como la descomposición, encontrándose falta de redundancia de funciones (Delgado-Baquerizo et al., 2016).

En el contexto de la pérdida de diversidad de microorganismos y sus funciones por cambios ambientales diversos, se ven comprometidos procesos relevantes para los ecosistemas, por ejemplo en los ciclos de nutrientes (Hong et al., 2022; Woodhouse et al., 2016).

Es evidente por tanto el vínculo entre la salud de los ecosistemas acuáticos y la comunidad de microorganismos por los múltiples roles que allí cumplen y la posibilidad de que estos se vean afectados a causa de la presión por factores antropogénicos.

Desarrollo de nuevos bioindicadores

Para conocer efectivamente el estado trófico de un sistema acuático (grado de eutrofización) se utiliza la determinación de concentración de nutrientes como el fósforo, el nitrógeno, así como sus formas biodisponibles. Estos datos son fundamentales para la elaboración de índices que permiten la clasificación de un curso o región de él en el gradiente comprendido entre oligotrófico e hipereutrófico. Además se estudian en conjunto con parámetros como la turbidez del agua, oxígeno disuelto y clorofila a, también empleado en el cálculo TSI (Índice de Estado Trófico de Carlson) (Carlson, 1977).

La teledetección mediante imágenes satelitales se ha vuelto esencial para la detección de cianobacterias en ecosistemas acuáticos, permitiendo la cuantificación de su biomasa (Zabaleta et al., 2023).

Otros índices involucran datos biológicos como ser la morfología de ciertas especies, su presencia/ ausencia y diversidad. Los bioindicadores son organismos o características de ciertas comunidades que permiten evaluar el estado de un hábitat y monitorear los cambios que pueda sufrir, gracias a que presentan sensibilidad por la variabilidad de los parámetros ambientales que allí ocurren (Stork et al., 1996). A diferencia de los parámetros fisicoquímicos, los seres vivos muestran el efecto acumulativo de los cambios físicos del lugar en que se encuentran.

En el país, el grupo de Chalar y colaboradores de la sección limnología de Facultad de Ciencias desarrollaron un índice para la clasificación del estado trófico utilizando macroinvertebrados bentónicos (2010), mientras que otros han desarrollado índices que clasifican en torno a la comunidad de zooplancton (Neto et al., 2014) o plantas (Dennison et al., 1993).

Sin embargo, se encuentra una creciente necesidad de desarrollar índices más robustos que se adapten al rápido avance de la investigación científica. El muestreo requerido para la determinación por índices bentónicos demanda tiempo, posteriormente se lleva a cabo la caracterización morfológica que requiere personal especializado debido a las diferencias que presentan muchas especies en su ciclo de vida y la posibilidad de encontrar individuos dañados (Cordier et al., 2021). Algo similar ocurre con los taxones de peces que se utilizan como indicadores.

En esta línea, la comunidad de bacterias se presenta como candidata prometedora debido a sus ciclos de vida cortos (Lear et al., 2011) y su importancia en la base de la cadena trófica (Pernthaler, 2013). Otra de las características que la hacen útil es que, mientras en un ambiente degradado se ve una menor riqueza de macroinvertebrados, estudiar la comunidad de bacterias aporta mayor información debido a que el cambio en esta comunidad se da en términos de su funcionalidad. Los taxones que se encuentren allí pueden aportar no solo información sobre el estado de un lugar, sino que puede arrojar luz sobre el causante de la degradación (Lear et al., 2011).

Apoyándose en que la composición de esta comunidad se relaciona significativamente con el gradiente trófico (Wang et al., 2022a), se entiende que para desarrollar índices de estado trófico y calidad de agua en base a sus microorganismos se debe conocer el rol ecológico de los distintos taxones.

Generalmente, sin importar el ecosistema acuático de agua dulce que se estudie o su ubicación geográfica, los filos dominantes son *Actinobacteria*, luego *Proteobacteria* seguido en menor medida por *Cyanobacteria* y *Bacteroidetes* (Humbert et al., 2009). Sin embargo, en escenarios de alto índice de estado trófico las actinobacterias disminuyen su abundancia relativa al prevalecer las cianobacterias. Esta cualidad contribuyó al desarrollo de un nuevo índice, el “Bacterial Eutrophic Index” (BEI) (Ji et al., 2019).

Adicionalmente, se implementa normalmente el estudio del microbioma para evaluar la salud de los suelos (Astudillo-García et al., 2019), y también se encuentran antecedentes del desarrollo de otros

bioindicadores utilizando esta comunidad en lagos (Wang et al., 2022a) y biofilms de ambientes lóticos (Lau et al., 2015).

Cabe destacar que otros taxones también pueden sufrir modificaciones debido a la eutrofización. Por ejemplo, al producirse mayor cantidad de materia orgánica de origen algal en este escenario la comunidad microbiana en los sedimentos favorece taxones relevantes para su descomposición (Han et al., 2020).

A modo general, también es posible diferenciar distintas etapas de los *blooms* a partir de la diversidad alfa (Woodhouse et al., 2016). Índices de diversidad como Shannon y Simpson son herramientas relevantes para identificar el vínculo de la diversidad de especies con el grado de eutrofización y funcionamiento ecosistémico, aunque puede ser cuestionable su uso para monitoreo debido cierta variabilidad inexplicable en los resultados (Spatharis et al., 2011). Se sugiere por ello la equitatividad (*evenness*) como una aproximación más informativa.

Las limitantes de la aplicación de microorganismos como bioindicadores se encuentran en la selección de un método para su identificación y en el análisis estadístico necesario para llegar a conclusiones sólidas (Astudillo-García et al., 2019). Establecer estándares y protocolos comunes puede mejorar la comparabilidad entre diferentes estudios y sistemas ambientales.

ADN ambiental como nueva herramienta

El abordaje molecular para la identificación de microorganismos es la principal aproximación utilizada hoy en día. Este enfoque ofrece soluciones a desafíos fundamentales como la identificación de microbios viables pero no cultivables (VBNC por sus siglas en inglés), aportando información valiosa sobre taxones desconocidos previamente debido a la limitación del cultivo en placa y la observación al microscopio (Trevors, 2011). Dentro de las técnicas moleculares que se implementan para la caracterización microbiológica se encuentra la metagenómica, el fingerprinting genético o la secuenciación de amplicones (Douterelo et al., 2014).

En los últimos años, el abordaje molecular basado en la secuenciación ha experimentado un crecimiento significativo, producto del desarrollo de métodos más robustos y su democratización debido al descenso de costos por muestra. La genómica ambiental abarca técnicas como la secuenciación de amplicones específicos que son marcadores genéticos para determinar presencia o ausencia de organismos y abundancia relativa, y también estudios funcionales utilizando metatranscriptómica (Cordier et al., 2021). Estas técnicas permiten mayor resolución taxonómica y resuelven varios de los problemas que presentan los métodos tradicionales (Pawlowski et al., 2018).

Se han desarrollado protocolos para la detección de ADN ambiental en ecosistemas acuáticos de multiplicidad de organismos variando desde anfibios, invertebrados y microorganismos. En ellos se

deben tener en cuenta particularidades del muestreo como la preservación de muestras, cantidades y replicados, pero también se debe estudiar los métodos adecuados para la extracción de ADN, ya que generan sesgos debido a la menor o mayor dificultad de lisar células, por ejemplo debido a la fisiología de células gram positivas y negativas o sus endosporas (Pollock et al., 2018; Deiner et al., 2015). También es relevante desarrollar cebadores específicos que detecten fielmente los taxones a identificar (Gołębiewski & Tretyn, 2020).

En cuanto al análisis de datos de secuenciación, se debe optimizar el proceso apoyándose en bases de datos robustas y eligiendo el método de clasificación de taxones adecuado. Actualmente se proponen dos mecanismos para la identificación taxonómica mediante obtención de *reads* cortos, la agrupación por identidad de secuencia (comúnmente del 97%) conocida como Operational Taxonomical Unit (OTU), o la clasificación según secuencia de los amplicones (ASV) (Chiarello et al., 2022; Prodan et al., 2020).

En este trabajo se pondrá a punto la técnica para determinación de comunidad de bacterias mediante la secuenciación del gen 16S de ARN ribosomal, a partir de ADN genómico extraído de muestras acuosas.

Este gen marcador ya cuenta con múltiples juegos de cebadores que tienen como blanco las distintas regiones variables (V) que lo componen (*Figura 1*) (Klindworth et al., 2013). Su presencia universal en organismos procariotas dada su función, combinado con una estructura que intercala regiones conservadas y variables permite identificar a los distintos organismos a partir de su secuencia (Ludwig & Schleifer, 1994). Particularmente, para muestras de agua se reporta la elección de las regiones V3-V4 y V4 como las más aptas para el discernimiento de la comunidad (Brandt & Albertsen, 2018).

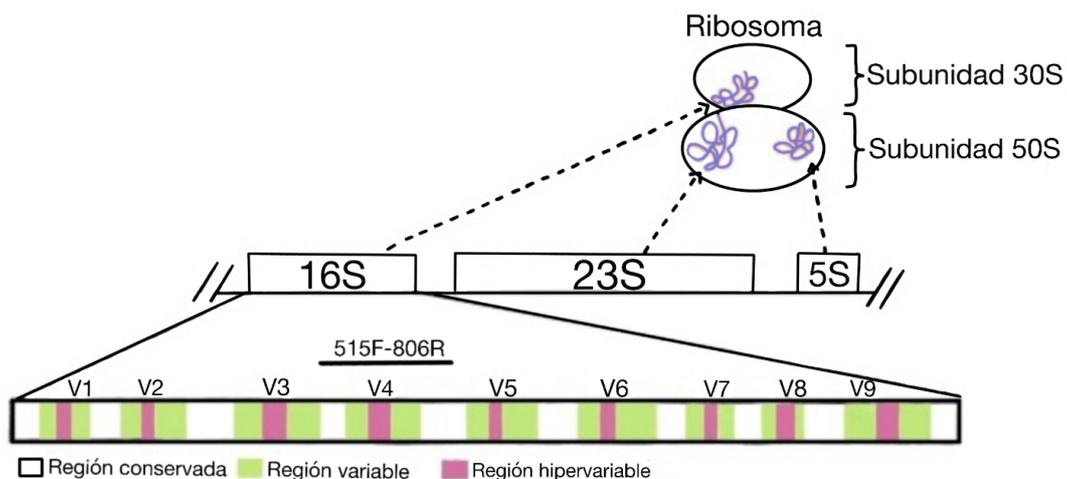


Figura 1: Representación del ribosoma y ubicación del gen 16S de ARN ribosomal, tomada y adaptada de Fukuda et al. (2016). Se muestran las 9 regiones variables (V) que componen este gen, que incluyen regiones variables e hipervariables, y el fragmento amplificado por el juego de primers 515F-806R utilizado en este trabajo.

En Uruguay, la aplicación rutinaria de esta técnica para evaluar la salud de ecosistemas acuáticos aún no es común, a pesar de ser una herramienta de gran utilidad. Si se encuentran antecedentes en el uso de esta técnica, como en el trabajo de Alonso y colaboradores (2022), que emplea distinto set de primers para determinar la comunidad de bacterias y explorar microorganismos indicadores utilizando el método *IndVal* en el Río de la Plata (Dufrene & Legendre, 1997). Además, se han abordado estos métodos en tesis como las de Bertoglio (2016) y Revello (2020).

Este trabajo tiene como objetivo ampliar la información respecto a la implementación de esta técnica en sistemas de agua dulce comúnmente eutrofizados, con el propósito de utilizarla como herramienta para la evaluación y gestión de estos recursos. Se busca comprender más profundamente la comunidad microbiana y las funciones que ellas cumplen o dejan de cumplir en relación con el deterioro de estos ecosistemas.

La utilización de un equipo de secuenciación de bajo porte que se encuentra en las instalaciones de la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República representa una ventaja significativa para la implementación de esta técnica. Sumándose el hecho de que puede realizarse rápidamente la preparación de muestras al contar con los insumos necesarios.

Al combinar el análisis fisicoquímico con la composición específica de la comunidad microbiológica, este trabajo busca evaluar la eficacia y rentabilidad de la técnica molecular aplicada. Además, espera posibilitar la evaluación del estado trófico de un embalse identificando taxones relevantes para distintos procesos que allí ocurren.

Objetivo

Objetivo general: Evaluar un método de extracción de ADN genómico con el fin de caracterizar comunidades bacterianas en un contexto de eutrofización, integrando datos fisicoquímicos y moleculares.

Objetivos específicos:

- Poner a punto un protocolo de extracción de ADN genómico de muestras de agua con el fin de identificar la diversidad bacteriana utilizando el gen 16S del ARN ribosomal.
- Validar el método escogido mediante determinación de parámetros fisicoquímicos del agua y mediciones *in situ*, y establecer su relación con las poblaciones clave de microorganismos.
- Proponer una estrategia para su utilización como herramienta para mejorar la gestión y el monitoreo de los ecosistemas acuáticos.

Metodología

Sitio de estudio

El Río Negro es el principal curso de agua en el interior del país, abarcando una longitud de 750 km. Ubicado entre las latitudes 31° y 33° S y longitudes 54° y 57° O, comienza en el estado de Río Grande do Sul en Brasil, donde recorre sus primeros 50 kilómetros. Luego atraviesa transversalmente el país, desembocando en el Río Uruguay (MVOTMA, 2018) (Figura 2).

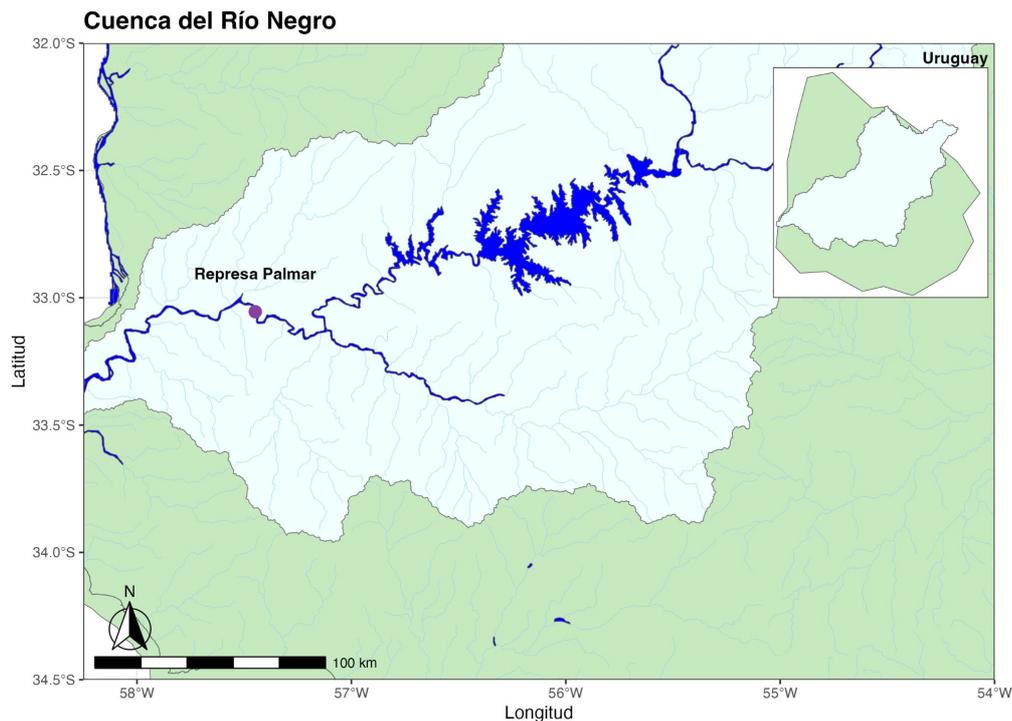


Figura 2: Extensión de la cuenca del Río Negro (celeste) y detalle de la ubicación de su principal curso de agua donde se ubica la represa hidroeléctrica Palmar (violeta). Elaborado en software R a partir de archivos del catálogo de Datos Abiertos de Uruguay y diva-gis.org.

Por su parte, el embalse Palmar, construido en 1982, forma parte de una cadena de embalses ubicados a lo largo del Río Negro realizados con el fin de generar energía hidroeléctrica y ocupa 320 km². En este embalse se halla una retención del 22% del fósforo total y 34% de los sólidos suspendidos (Limnología, 2021), mientras que el tiempo de retención promedio observado de este embalse es de 50 días (MVOTMA, 2018). Río arriba del embalse Palmar se encuentra el siguiente de la cadena, Baygorria, y hacia el centro del país se encuentra en el Río Negro el embalse Rincón del Bonete. El mismo ocupa 1070 km² y constituye la obra más extensa de las tres construidas con el mismo fin, mientras que Baygorria abarca 100 km².

En cuanto al uso de suelos en la cuenca de la represa Palmar, se encuentra desde hace muchos años su creciente expansión forestal, y posteriormente agrícola (Foucher, et al, 2023; MVOTMA, 2018).

Se cuenta con antecedentes de la zona en cuanto a nutrientes y parámetros fisicoquímicos gracias a muestreos trimestrales en Convenio UTE- Facultad de Ciencias realizados con el objetivo de monitorear el estado de la calidad del agua en los distintos embalses de la zona (Chalar, 2022).

Diseño de Muestreo

Para lograr los objetivos propuestos se llevaron a cabo dos campañas de muestreo. Ambas fueron realizadas con la colaboración de la sección de Limnología de la Facultad de Ciencias, UDELAR. La primera se realizó en el marco de la tesis de maestría de la Lic. Lucía Rehermann en el embalse Rincón del Bonete, también ubicado sobre el Río Negro, el día 5 de diciembre de 2022. Se recolectó un litro de agua en superficie y otro en fondo a 1 metro por sobre el sedimento, al mediodía, para la determinación de la comunidad microbiana. Se utilizaron las muestras con el fin de optimizar un método de extracción aplicable en embalses.

En siguiente instancia, los días 13 y 14 de febrero de 2023 se llevó a cabo una nueva campaña de la cual se obtienen datos para los dos últimos objetivos planteados. En esta salida de campo la toma de muestras de agua fue de un litro y se realiza para un ciclo diario completo, por triplicado, a tres profundidades (superficie, medio y fondo). Se divide el ciclo en tres momentos de muestreo, que incluyen una primera toma al mediodía, otra inmediatamente antes de la puesta del sol y finalmente una antes del amanecer. Estas se utilizaron para la determinación de parámetros físicoquímicos. A su vez se lleva el registro de temperatura, pH, turbidez y oxígeno disuelto (OD) en el perfil longitudinal del embalse utilizando sonda multiparamétrica Horiba U-52G.

Como complemento de la técnica molecular se recolectó singularmente en bolsas estériles un volumen mayor a 300 ml para determinación de coliformes fecales (UFC/100 mL) según APHA (1995), realizadas por el Laboratorio Analítico Agro Industrial (LAAI).

Para la validación del método de determinación de comunidad de bacterias se realizó una nueva colecta de un litro para superficie y fondo, a las 13 horas. Las muestras para este propósito (incluyendo ambas instancias) se colectaron en recipientes previamente desinfectados y esterilizados, y se conservaron a 4°C desde su recolección hasta arribar a la estación de procesamiento más cercana (Wang et al., 2022b).

Allí se colocaron filtros de membrana de celulosa (mixta) con 0,22 μm de poro y 47 mm de diámetro (Millipore) en un embudo, que junto a una bomba de filtración permiten concentrar la fracción de microorganismos presentes en el agua (Djurhuus et al., 2017). Se filtró hasta saturar el filtro entre 100-150 ml por triplicado, para superficie y fondo, y se esterilizó el equipo de filtrado entre cada punto de muestreo a modo de evitar la contaminación de las muestras. Esta es la matriz para la extracción de ADN, por lo que se mantuvieron en tubos eppendorf estériles a -80°C hasta proceder con este protocolo.

Se cuenta con información meteorológica proveniente del Servicio Pluviométrico Nacional y el Departamento de Viabilidad Climática y Cambio Climático del Instituto Uruguayo de Meteorología (INUMET) para las estaciones cercanas al sitio de muestreo, en los días que se realizaron.

Análisis fisicoquímico del agua y determinación de estado trófico

Al llegar a la estación de procesamiento se homogeneizaron las muestras de agua recolectadas y se procedió a realizar alícuotas para la determinación de los múltiples compuestos de interés. Esto se realiza, junto con los pasos de filtración, inmediatamente luego de la recolección de las muestras al retirarse de la embarcación. Luego, se conservaron los recipientes con muestras originales y agua filtrada en frío hasta posterior análisis.

Según la clasificación dada en el Decreto 253/79 bajo el Código de Aguas del Uruguay, el Río Negro se considera como un curso de Clase 3 (Uruguay, 1979). Por tanto se tuvieron en cuenta los valores máximos que él exige para cada una de las variables estudiadas y su utilización como indicadores de calidad de agua. Adicionalmente, todos los análisis de nutrientes se realizan por triplicado para corroborar estadísticamente la relación entre estos resultados.

Tanto los sólidos totales como la materia orgánica en suspensión se determinaron por filtración y diferencia de peso por ignición según protocolo (APHA, 1995). Para ello, previo a la salida de campo se quemaron a 500°C y se pesan los filtros de fibra de vidrio (GF/C) utilizando balanza analítica, y se registra su peso junto al número identificador. Luego de filtrar, se conservaron hasta arribar al laboratorio en heladera donde en primer lugar, se secan en estufa a 105° hasta peso constante (STS), para luego quemarse en mufla a 500°C por 15 minutos para ser pesados nuevamente (MOS).

Asimismo, la cuantificación de clorofila *a* también se realiza por filtración inmediatamente luego del muestreo en filtros GF/C de 0,45µm de poro, los cuales se mantienen en frío luego de recolectarse. En el laboratorio se extrajeron de él los pigmentos concentrados y luego de su tratamiento se cuantifica espectrofotométricamente a tres longitudes de onda, que mediante cálculo permiten discriminar el aporte de clorofila *a* de demás pigmentos presentes en la muestras (Nusch, 1980).

Para la determinación de nutrientes se emplearon distintos métodos que permiten la cuantificación por medio de espectrofotometría.

En el caso del nitrato en agua, se utilizó sobre la muestra previamente filtrada el método de Salicilato de sodio (Monteiro & Ferreira, 2003), fundamentado en la transformación de NO_3^- a NO_2^+ para su reacción con salicilato. El producto formado es un compuesto de color que permite cuantificar el nutriente de interés midiendo absorbancia a 420 nm.

Los valores de fósforo total (PT) se determinaron por oxidación de la muestra con reactivo oxidante (Valderrama, 1981), por el cual se obtiene la totalidad del fósforo presente en la muestra como

ortofosfato (PO_4^{3-}), y posteriormente el método del ácido ascórbico (Murphy & Riley, 1962). El método lleva al desarrollo de color por azul de molibdeno al someterse la muestra a reactivo que reacciona con ortofosfato, y permite la cuantificación por absorbancia a 885 nm. Para determinar fósforo reactivo soluble (FRS) se aplica únicamente el método del ácido ascórbico (Murphy & Riley, 1962) sobre la muestra previamente filtrada.

Se contrastaron los valores de nutrientes recabados espacial y temporalmente a través de análisis de varianza (ANOVA) con intervalo de confianza del 95%, asumiendo distribución normal. Posteriormente se aplicó test *post hoc* Tukey. En los casos en que no se encontró la distribución esperada se hicieron análisis de varianza no paramétricos (Kruskal-Wallis) y test *post hoc* Mann-Whitney.

Adicionalmente, se hallaron los coeficientes de correlación de Pearson entre los datos de PT/FRS, PT/STS y FRS/STS.

El índice de estado trófico se obtuvo utilizando el cálculo sugerido para su implementación en embalses (Cunha et al., 2013), apoyándose en valores de fósforo total (PT) encontrados en el curso (en $\mu\text{g/L}$). Explicado a continuación:

$$TSI = 10 * \left(6 - \frac{(-0,27637 * (\ln PT) + 1,329766)}{\ln 2} \right)$$

El valor obtenido se utilizó para la clasificación del embalse según su estado trófico, dependiente del rango en que se encontrara (Tabla 1).

Tabla 1: Clasificación de estado trófico según índice de Cunha y colaboradores (2013) desarrollado a partir de valores de fósforo total obtenidos en $\mu\text{g/L}$.

Categoría de estado trófico	Rango PT ($\mu\text{g/L}$)
Ultraoligotrófico	$\leq 15,9$
Oligotrófico	16,0 - 23,8
Mesotrófico	23,9 - 36,7
Eutrófico	36,8 - 63,7
Supereutrófico	63,8 - 77,6
Hipereutrófico	$\geq 77,7$

Adicionalmente se aplicó el índice de calidad de agua (ICA) desarrollado en el país por Eguren y colaboradores (2018) basándose en la normalización de los valores de nitrato, fósforo total, sólidos totales suspendidos y coliformes totales. El rango de valores va de 0 a 100, donde se asigna 0 a una menor calidad de agua, el 50 corresponde al máximo establecido por el decreto 253/79, y 100 a

aquellos que sugieren buena calidad del agua. A continuación se encuentra la fórmula aplicada para su cálculo, donde n es el número total de variables y Ci el valor asignado a la variable i de la normalización :

$$ICA = \sum_{i=1}^n \frac{C_i}{n}$$

Originalmente este índice incluye la normalización de la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) como quinto parámetro considerado, pero no se dispuso de este dato en el presente trabajo.

Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico se realizó mediante dos técnicas, para luego elegir una con la cual proceder para posteriores objetivos. Por un lado se utiliza el kit comercial de QIAGEN DNeasy PowerWater DNA Isolation Kit, y luego el método casero CTAB optimizado para la extracción de ADN por Martínez de la Escalera et al (2014), posteriormente modificado. En ambos casos se utilizó la totalidad del filtro.

El método comercial se empleó para dos muestras, una perteneciente a la superficie del embalse y otra al fondo. Los filtros se introdujeron previamente en nitrógeno, y se adicionó un paso de ruptura mecánica del filtro introduciendo 6 *beads* de sílica de 2,3mm de diámetro (Biospec) por tubo eppendorf, junto con el buffer de extracción del kit, y sometiendo a agitación en el disruptor de tejido celular Mini beadBeater 16 (Biospec) durante 1 minuto 30 segundos (Djurhuus et al., 2017; Pollock et al., 2018). Luego se procedió con el protocolo experimental brindado por QIAGEN. Al finalizar se resuspendió en 75µl de buffer de elución y el ADN fue almacenado a -20°C hasta su utilización.

Por otro lado, se procesaron 4 filtros completos para el método casero, dos pertenecientes a superficie y dos de fondo, y en el caso de las muestras del embalse Palmar fueron 3 por ubicación en la columna. Brevemente, el protocolo comienza por la introducción de 6 *beads* de sílica de 2,3mm de diámetro (Biospec) por tubo eppendorf, luego un filtro en cada uno de ellos, (previamente introducido en nitrógeno) y 900µl de 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 disruptor de tejido celular Mini beadBeater 16 (Biospec) durante 1 minuto 30 segundos. Se incubaron por 5 minutos a 55°C, invirtiendo intermitentemente los tubos para lograr el desprendimiento del ADN de la membrana.

Luego, se centrifugaron los tubos a 12000 rpm durante 1 minuto, y se transfiere el sobrenadante a tubos estériles, a los que se les realiza una extracción utilizando cloroformo y alcohol isoamílico

(24:1). Se centrifuga 2 min a 13000 rpm y se extrae la fase acuosa a nuevos tubos estériles. Dicho paso se repite dos veces, tomando entre 600-700 µl cada vez.

Finalmente se precipitó el ADN utilizando isopropanol, homogeneizando moderadamente e incubando los tubos a temperatura ambiente durante 24 horas. Se centrifugaron los tubos a 14.000 rpm durante 75 minutos y se descartó el sobrenadante. Los pellet se lavaron con etanol al 70% y se secaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Del protocolo original se modificaron aspectos como la velocidad de centrifugación, y la utilización de *beads* como instrumento mecánico de lisis. El volumen total de elución fue de 65µl en este caso.

Por último, la concentración de ADN se cuantificó por fluorimetría en Qubit 4 con la opción BR 1x dsDNA assay (Invitrogen, Thermo Fisher).

Preparación de librerías

El *workflow* completo de preparación de librería en ambas instancias se realizó en el laboratorio de Genómica Evolutiva de la Facultad de Ciencias, en el marco de una pasantía a cargo de Dra Lucía Calleros. Como referencia se utilizan los lineamientos brindados por Illumina para la secuenciación del gen 16S en equipos MiSeq y en la figura 3 se encuentra un esquema con el flujo de trabajo sugerido para la obtención de ADN secuenciable (Illumina, 2013).

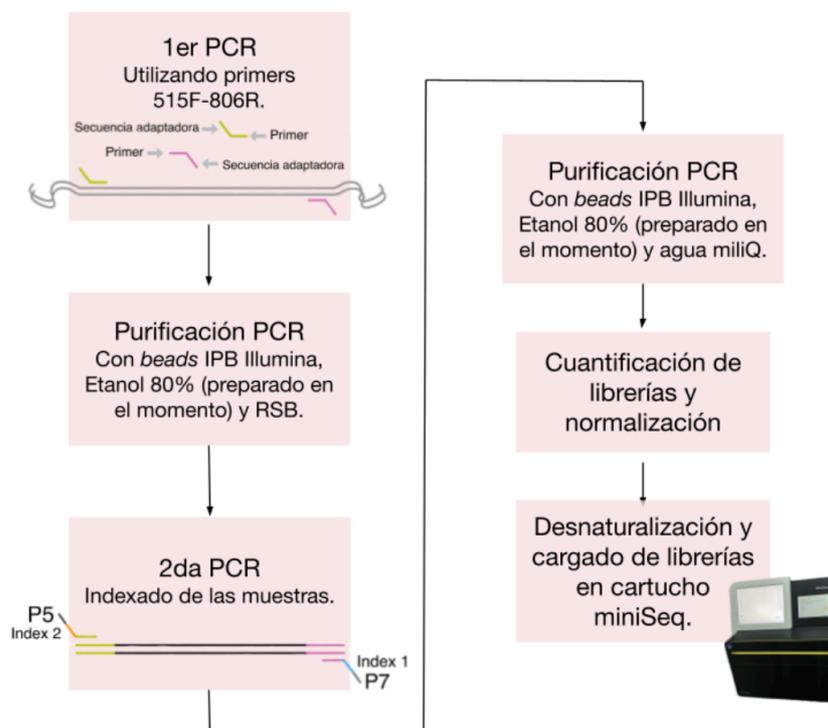


Figura 3: Flujo de trabajo de preparación de librerías para secuenciación en miniSeq, Illumina. Adaptado de Illumina, 2013.

El primer paso de la preparación de librerías implica una PCR utilizando el par de cebadores F515 y R806 (Caporaso et al., 2011). En este caso ambos cebadores se encuentran unidos a los adaptadores necesarios para la secuenciación Illumina (Tabla 2). El segmento amplificado corresponde a la región hipervariable V4 del gen ARNr 16S, un marcador filogenético utilizado para *Bacteria* y *Archaea*.

Tabla 2: Secuencias correspondientes a adaptadores Illumina y cebadores F515 y R806 utilizados para la secuenciación

Nombre	Secuencia Adaptadora (5'-3')	Secuencia del Cebador (5'-3')
F515	5' - TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG- (secuencia específica del locus)	5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3'
R806	5' - GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG- (secuencia específica del locus)	5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'

En la primera reacción de PCR, realizada en un volumen total de 25µl, la cantidad de muestra de ADN introducida varía en cada caso según su concentración, para así lograr amplificar proporcionalmente las muestras. Se agregó 1µl de BSA (8 ug/ul) a todos los tubos, ya que se ha observado una mejora en el rendimiento en aquellas reacciones donde el amplicón presenta alta frecuencia de pares de base GC (Farell & Alexandre, 2012). Se utilizó la enzima Polimerasa NEB Q5 *Hot Start High Fidelity* (New England BioLabs).

Se llevaron a cabo tanto un control negativo, sin presencia de molde, como uno positivo utilizando el *mock* de ADN de la comunidad bacteriana ZymoBIOMICS. Se trata de un estándar que presenta proporciones conocidas de ADN de diferentes especies microbianas.

La verificación del éxito del paso anterior se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8%, utilizando el agente intercalante Bromuro de Etidio. Se consideró una muestra positiva aquella que presentara una única banda correspondiente a un amplicón de 291 pares de base o similar.

Posteriormente a la PCR, se llevó a cabo una purificación empleando esferas magnéticas (IPB Illumina) y una cuantificación con Qubit HS dsDNA assay (Thermo Fisher).

Se realizó una segunda PCR para el agregado de un par de índices únicos a cada lado de los fragmentos previamente amplificados. Estos índices permiten al equipo diferenciar las muestras y

asignar luego las secuencias correspondientes a cada muestra en un archivo único. Esta reacción también se realizó en un volumen total de 25µl, con ciclado variable según la concentración de ADN obtenida en promedio para todas las muestras.

Una vez finalizado el indexado, se configuró un *pool* de muestras para optimizar la repurificación y cuantificación de los productos de la PCR anterior. Finalmente, se normalizaron las librerías, a modo de ingresar al equipo una cantidad equivalente de cada muestra y se preparó el ADN por desnaturalización para la secuenciación.

Secuenciación masiva ARNr 16s y análisis bioinformático

Las librerías generadas se secuenciaron con la plataforma Illumina MiniSeq (150 x 2), disponible en el Laboratorio de Genética Evolutiva de la Facultad de Ciencias.

Las secuencias *forward* y *reverse* obtenidas en formato Fastq se procesan utilizando el paquete DADA2 v1.28.0 (B. Callahan et al., 2015), desarrollado para el lenguaje de programación R v 2023.03.1+446.

En primer lugar se eliminaron los cebadores al inicio de cada secuencia y se filtraron según su calidad, evaluada con la función *plotQualityProfile*. Se llevó a cabo otro control de calidad mediante *plotErrors*, función que permite conocer posibles transiciones de las bases nucleotídicas secuenciadas a partir del *Quality Score*. Posteriormente, se solaparon las secuencias *forward* y *reverse*, considerando un número mínimo de pares de bases coincidentes para la determinación de los *amplicon sequence variants* o ASV, considerando el largo del amplicón estudiado. La función *removeBimeraDenovo* se utilizó para eliminar quimeras.

La taxonomía de los ASV se asignó con la base de datos SILVA REF99 SSU versión 138.1 (Quast et al., 2013), y se eliminaron las secuencias clasificadas como cloroplastos y mitocondrias. Posteriormente, se empleó el paquete *Phyloseq* (McMurdie & Holmes, 2013) para generar un único documento conteniendo la clasificación taxonómica y los metadatos de cada muestra, posibilitando posteriores representaciones gráficas.

Todas las muestras secuenciadas se normalizaron a un mismo número de *reads*, para equilibrar el esfuerzo de muestreo, luego de corroborar mediante una curva de rarefacción que se alcanzaba un valor asintótico de especies en cada muestra respecto a los *reads* generados.

Para realizar los cálculos de diversidad alfa y beta, así como las representaciones gráficas de abundancia relativa de las distintas muestras, se utilizaron paquetes del software R como *vegan*, *microeco*, *microbiome* y algunas funciones propias de *phyloseq*. Se calcularon índices como Chao1, Shannon y Equitatividad de Pielou. La variabilidad de la estructura de esta comunidad entre muestras se visualizó mediante Análisis de coordenadas principales (PcoA), basado en el cálculo

de matrices de disimilitud de Bray Curtis. La elección de este método por sobre NMDS se fundamenta en la pequeña cantidad de muestras con las que se trabaja (Paliy & Shankar, 2016).

Finalmente, se clasificaron los taxones por su función utilizando la base de datos FAPROTAX v1.2.6 en conjunto con el paquete *microeco* (Louca et al., 2016).

Resultados

Puesta a punto

En esta etapa se utilizaron muestras recolectadas por la Lic. Lucía Rehermann en el marco de su proyecto de maestría, para una primera aproximación a la extracción de ADN genómico del agua mediante dos métodos. Se extrajo un litro de agua de dos profundidades diferentes y se generaron réplicas técnicas filtrando tres alícuotas. El volumen filtrado por réplica fue 120 ml para todas las muestras de superficie y 130 ml para las de fondo, ya que fue lo requerido para lograr la saturación de un filtro.

Luego de emplear ambos métodos de extracción de ADN se encontraron los siguientes resultados (Tabla 3) al cuantificar la concentración en ng/μl. Como se expresa, en las muestras DO y DU, asignadas para su extracción con kit, no se detectó ADN utilizando función Broad Range de Qubit para ADN doble hebra.

Tabla 3: Método asignado para la extracción de ADN genómico de las muestras y la concentración obtenida en ng/μl para cada caso. Las muestras DO, DP y DQ, donde la D indica el mes en que se realizó la toma (Diciembre), corresponden a la superficie del embalse. Mientras que DU, DQ y DV corresponden a fondo

Método de extracción	Muestra	Concentración (ng/μl)
QIAGEN DNeasy PowerWater DNA Isolation Kit	Bonete- DO	No detectable
	Bonete- DU	No detectable
Método casero CTAB	Bonete- DP	0,018
	Bonete- DQ	0,0434
	Bonete- DW	0,0148
	Bonete- DV	0,175

A pesar de las bajas concentraciones obtenidas para las muestras DP, DQ, DW y DV, se logró amplificar en la primera PCR de la preparación de librerías en tres de las muestras, todas ellas provenientes de la extracción realizada mediante el método casero. En la figura 4 se hallan los resultados de la amplificación de un fragmento del gen 16S ARNr para las muestras y se confirman los resultados observando la migración en gel del control positivo (Mock). Únicamente se obtuvo producto de amplificación para las muestras DP, DW y DV y debajo de las bandas correspondientes al amplicón de interés se observan dímeros de *primers*. Todas ellas corresponden al método de extracción CTAB, una de superficie y dos de fondo.

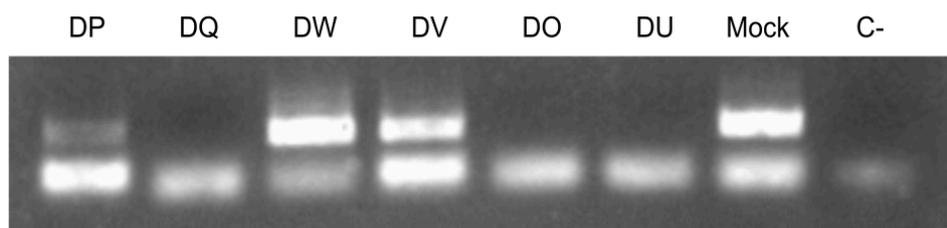


Figura 4: Corrida electroforética en Gel de Agarosa 0,8% visualizada con Bromuro de Etidio. Se observan bandas que corresponden a la obtención de amplicones generados con el set de cebadores 515F-806R luego de PCR en 4 de los 8 carriles, y debajo dímeros de primer.

Se procedió a verificar la calidad del ADN obtenido para la secuenciación del amplicón en la región V4. Se observó mayor cantidad de *reads* (384675) para la muestra proveniente de superficie, mientras que se obtuvieron resultados de secuenciación inferiores para fondo, con 290562 para DV y 130616 para DW (Tabla 4). Sin embargo, tras el proceso de filtrado, la unión de los fragmentos *forward* y *reverse* y eliminación de secuencias quiméricas, se llegó a un máximo de 18428 *merged reads* en la muestra DP, 60668 para DW y 53209 para DV. La unión de las secuencias resultó ser el paso crítico en la pérdida de *reads* totales para las muestras y en particular para DP.

Tabla 4: *reads* obtenidos para cada muestra al final de cada paso del procesamiento de secuencias obtenidas

Muestra	Input	Filtración	<i>Denoising R</i>	<i>Denoising F</i>	<i>Merge</i>	Remoción Quimeras
DP	384675	355475	354448	354753	20220	18428
DW	130616	126805	123663	123720	94530	60668
DV	290562	272670	270693	270693	67165	53209

Se grafican las siguientes curvas de rarefacción (Figura 5) y se normalizan las tres muestras al mismo número de *reads* que la de menor alcance. Sin embargo, no se logró alcanzar completamente una tendencia asintótica para la muestra DV. El costo de esta práctica es la pérdida de información de aquella muestra que sí logró mayor profundidad y en este caso es más evidente al encontrar que la muestra DV contiene 856 especies observadas antes de la rarefacción y se redujo a 778 después de este proceso.

Debido a que se trata de una etapa de ajuste no se harán posteriores análisis, se presentan datos de abundancia relativa de los taxones en base a los datos rarefaccionados, a pesar de que este proceso eliminó parte de la diversidad hallada (Figura 6). El análisis para obtención de ASV realizado con DADA2 y phyloseq en R permitió identificar la diversidad presente en cada muestra.

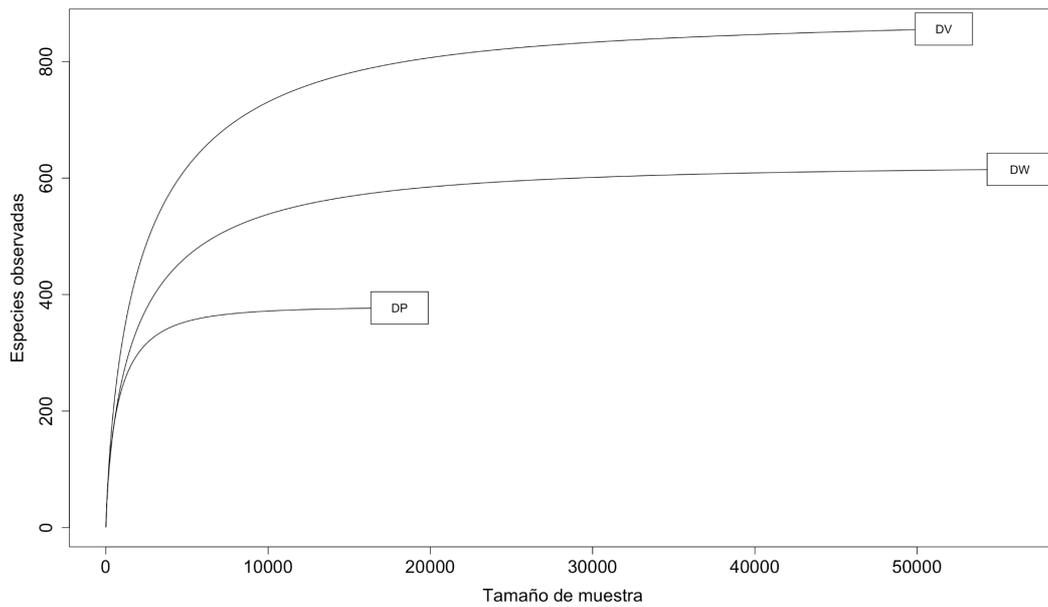


Figura 5: Curvas de rarefacción, realizadas con *vegan*, para las tres muestras secuenciadas (Heck et al., 1975)

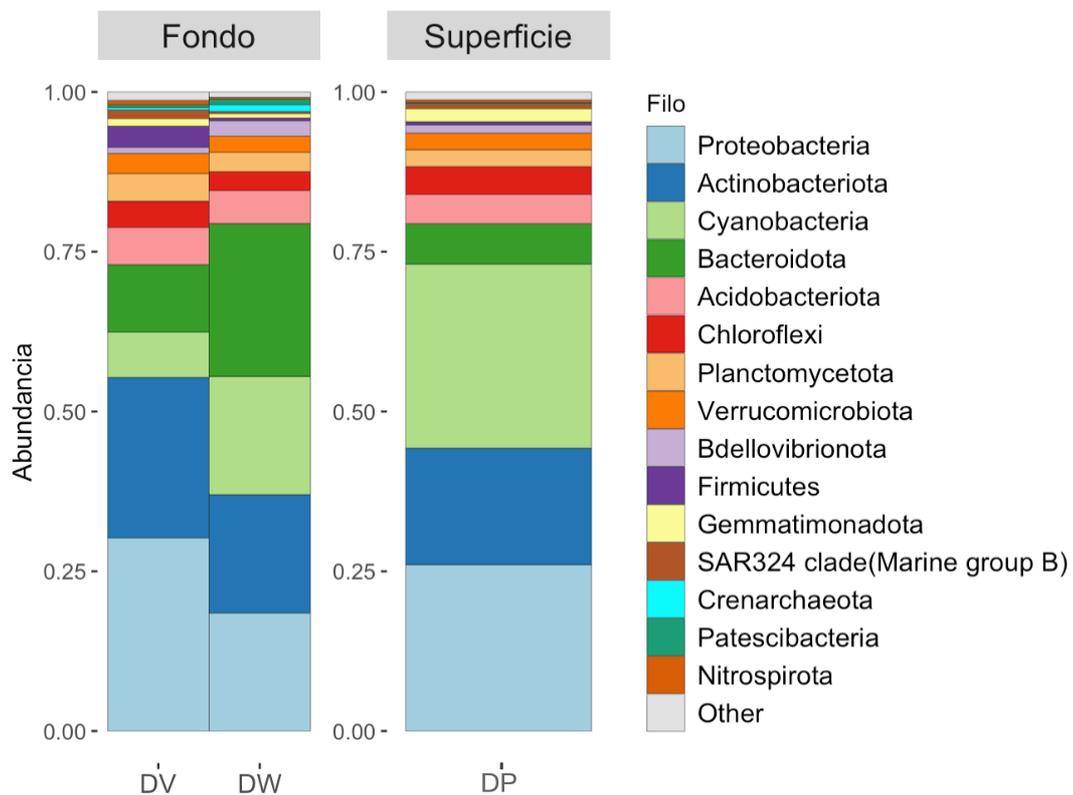


Figura 6: Abundancia relativa de los distintos filos presentes en las tres muestras analizadas.

Posteriormente se procedió a obtener la diversidad alfa correspondiente a cada muestra incluyendo la riqueza observada, el índice de Chao, la diversidad según índice de Shannon y la equitatividad (Figura 7).

En esta primera instancia se observan grandes diferencias en la riqueza de las muestras secuenciadas. Asimismo, las réplicas de fondo también difieren en su riqueza.

Por otro lado, el índice Chao1 calculado tiene en cuenta los ASV raros presente en una muestra en relación a la riqueza observada, ya que estas hablan sobre posibles especies faltantes en la muestra. Se observa para la muestra que presenta la menor cantidad de *reads*, índices muy similares de chao y de riqueza observada.

Luego se evaluó la diversidad de la muestra con el índice de Shannon. Si valores más altos significan mayor diversidad, en este caso las muestras más diversas son aquellas que pertenecen a fondo. Sin embargo, al analizar el índice “evenness”, donde la unidad equivale a una muestra con equitatividad perfecta, se revela que a pesar de ser las más diversas, aunque con grandes diferencias entre ellas para riqueza y cantidad de especies, ambas muestras presentan una distribución similar de sus especies y se distribuyen de forma menos equitativa que en superficie.

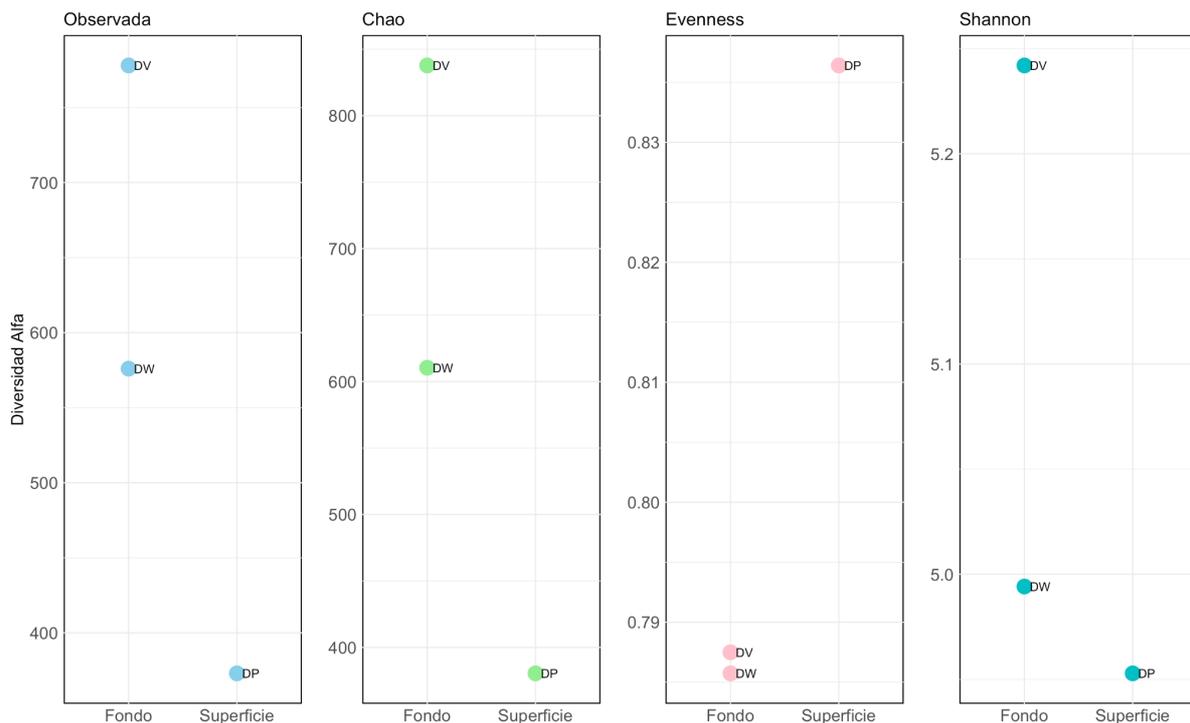


Figura 7: Índices de diversidad alfa calculados para las 3 muestras secuenciadas.

Aplicación de la técnica para un caso de estudio

Fisicoquímica

El muestreo de un ciclo diario en el mes de febrero permitió la caracterización de este ecosistema puntual a lo largo de un continuo de tiempo, en un punto específico en el centro del embalse. El muestreo del mediodía fue realizado 14:52 y se procuró mantener la ubicación de este para posteriores instancias. A destacar está la incidencia de fuertes vientos en este horario. En la estación meteorológica de Durazno del INUMET, una de las más cercanas al sitio de muestreo, se registró una velocidad de 44 km/h a las 14 hs, mientras que la temperatura ambiente era de 37,2 °C.

El siguiente muestreo se realizó 19:21, donde amainó el viento a 15 km/h y temperatura de 31,1 °C, y luego el último muestreo tuvo lugar a las 6:04 del día siguiente. En cada horario se recolectaron muestras de agua para aplicar los protocolos de determinación de nutrientes, obteniéndose los siguientes resultados (Tabla 5) luego del trabajo de laboratorio realizado en el Laboratorio de Ecotoxicología y Química Ambiental del Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales y por el servicio contratado del LAAI. Al contrastar con los valores de referencia para cursos de agua se destaca el exceso de fósforo a lo largo de toda la columna, así como el de ortofosfato, mientras que los demás valores se hallan dentro de lo permitido por las normativas.

Tabla 5: Resultados de las variables fisicoquímicas monitoreadas a lo largo de la columna de agua en los tres horarios, y sus valores de referencia.

	Momento	Mediodía			Tarde			Mañana			Valores de Referencia**
	Ubicación en el perfil*	Superficie	Medio	Fondo	Superficie	Medio	Fondo	Superficie	Medio	Fondo	
Parámetros Fisicoquímicos medidos en laboratorio	PT (µg/L)	60,6 ± 15,3	58,9 ± 13,5	52,8 ± 13,9	45,0 ± 5,9	50,0 ± 24,6	62,2 ± 9,8	49,4 ± 8,4	53,3 ± 10,0	70,0 ± 13,0	25
	FRS (µg/L)	53,3 ± 1,7	45,0 ± 2,9	53,9 ± 3,5	55,6 ± 6,3	54,4 ± 7,7	64,4 ± 2,5	52,8 ± 8,4	56,7 ± 10,0	73,3 ± 13,0	40
	Nitrato (µg/L)	288,3 ± 47,0	215,0 ± 24,0	277,2 ± 26,9	169,4 ± 13,5	199,4 ± 45,3	266,1 ± 15,0	236,1 ± 3,8	209,4 ± 10,7	273,9 ± 45,4	1000
	STS (mg/L)	3,8 ± 1,4	1,6 ± 1,2	2,9 ± 0,6	3,2 ± 0,7	2,2 ± 0,6	2,5 ± 0,8	2,1 ± 0,5	2,7 ± 0,7	2,8 ± 0,0	Máx. 30
	MOS (%)	18,5 ± 14,3	12,6 ± 15,6	16,5 ± 8,0	42,3 ± 15,0	31,9 ± 6,4	27,4 ± 18,1	54,1 ± 28,9	38,1 ± 13,7	11,9 ± 10,9	-
	Coliformes T (UFC/100 mL)	28,00	23,00	22,00	29,00	<3	30,00	<3	25,00	36,00	Máx. 2000
	Clorofila a (µg/L)	1,184	1,184	0,592	7,611	1,776	0,592	5,328	2,368	0,000	-
Parámetros	Temperatura (°C)	26,85 ± 0,02	26,51 ± 0,17	26,06 ± 0,12	27,82 ± 0,10	27,03 ± 0,36	26,41 ± 0,39	27,47 ± 0,01	26,95 ± 0,4	26,11 ± 0,14	-
	pH	6,82 ± 0,02	6,87 ± 0,17	7,06 ± 0,10	7,99 ± 0,33	7,31 ± 0,15	7,14 ± 0,20	7,18 ± 0,16	6,98 ± 0,16	6,76 ± 0,04	6,5 - 8,5

Fisicoquímicos <i>in situ</i>	Oxígeno Disuelto (mg/L)	6,68 ± 0,07	6,41 ± 0,23	5,05 ± 0,90	7,86 ± 0,39	6,85 ± 0,53	5,67 ± 0,50	6,82 ± 0,13	6,02 ± 0,48	5,16 ± 0,24	Min. 5
	Turbidez (NTU)	9,17 ± 0,55	8,76 ± 0,3	11,34 ± 3,36	9,93 ± 1,21	9,58 ± 0,71	10,32 ± 0,52	9,66 ± 0,53	10,71 ± 1,22	10,93 ± 3,64	Máx. 50

*Para la presentación de parámetros *in situ* se promedian los valores considerando hasta los 3 metros de profundidad como “superficie”, de 3 metros a 12 como “medio” y a partir de 12 metros el “fondo”.

**Los valores de referencia corresponden al decreto 253/79 (Uruguay, 1979), a excepción de sólidos totales en suspensión (STS) y Fósforo Reactivo Soluble, donde se utilizó el establecido por el “Digesto sobre el uso y aprovechamiento del Río Uruguay” (CARU, 2019).

En la Figura 8 se reportan los perfiles de temperatura, pH y oxígeno disuelto medidos con sonda en las tres instancias, mientras que en la Tabla 4 se resumen los resultados obtenidos en promedio para las distintas secciones de la columna.

En cuanto al perfil de temperatura, no se registra estratificación térmica en ninguno de los casos, pero se presenta la columna con mayor homogeneidad al mediodía. Adicionalmente, si se observa el perfil de oxígeno disuelto al mediodía se encuentran valores correspondientes con un estado anóxico del estrato contiguo al sedimento y por ende fuera de la normativa, pero no así en los otros dos horarios de muestreo.

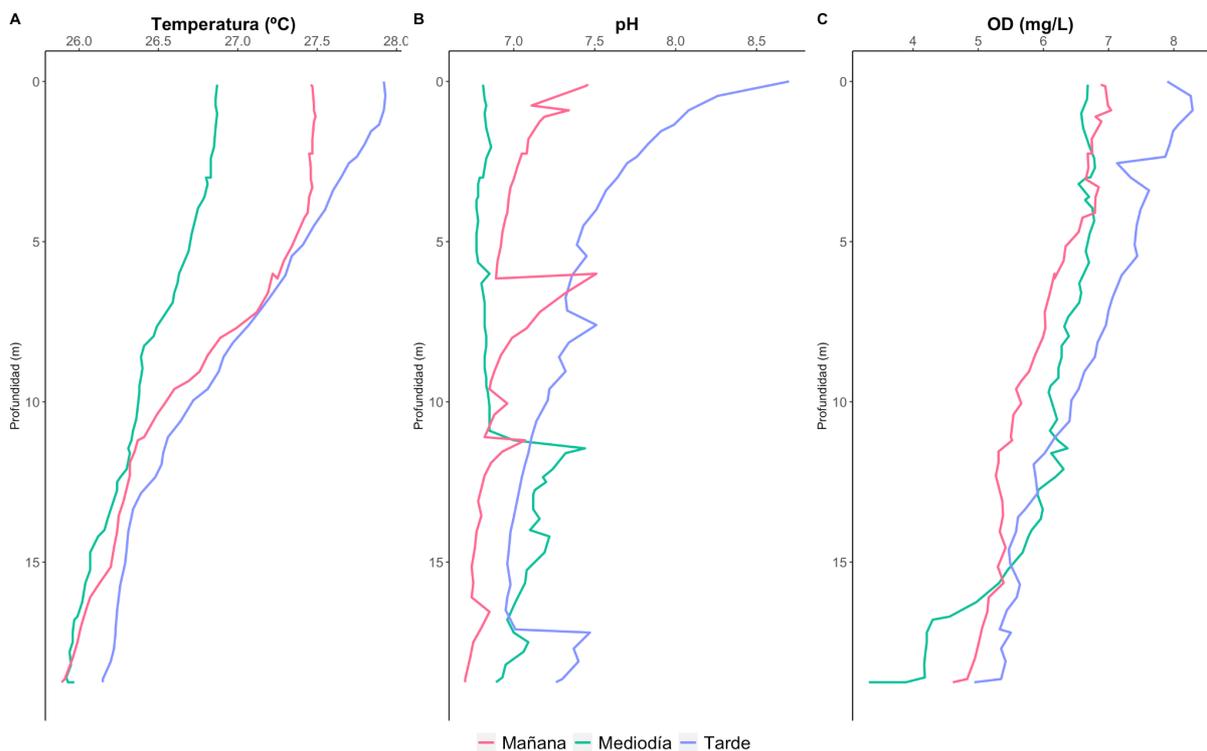


Figura 8: Ciclo diario del perfil longitudinal de A) Temperatura, B) pH y C) Oxígeno Disuelto.

Se contrastan los valores de nutrientes recabados espacial y temporalmente a través de análisis de varianza (ANOVA) con intervalo de confianza del 95%, asumiendo distribución normal y posteriormente se aplicó test *post hoc* Tukey. Como se exhibe en la Figura 9, temporalmente se

hallan diferencias significativas para nitrato únicamente entre la superficie de la tarde y el mediodía. En el caso del fósforo total (Figura 10) las diferencias se encuentran entre superficies de la mañana y el mediodía.

A lo largo del eje longitudinal el contenido de nitrato difiere de forma significativa a la tarde entre superficie y fondo. En la mañana no se encontró distribución normal y por ello se hizo análisis de varianza no paramétrica (Kruskal-Wallis) y test *post hoc* Mann-Whitney, donde se obtuvo diferencias significativas entre medio y fondo.

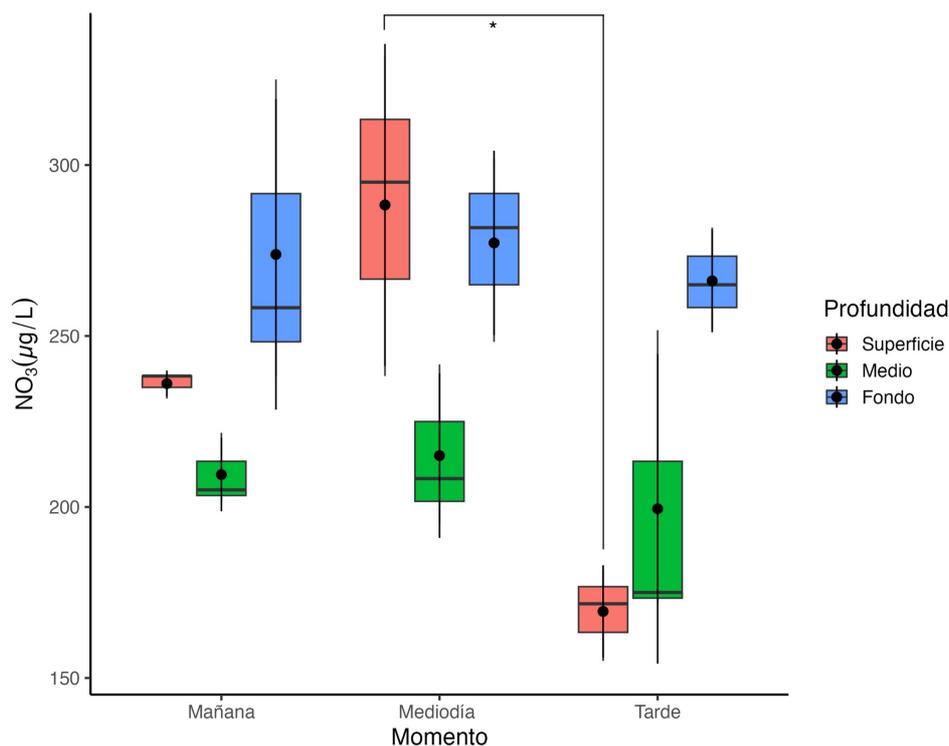


Figura 9: Ciclo diario de concentración de nitrato en $\mu\text{g/L}$ a lo largo de la columna de agua. Se representa la mediana de los datos obtenidos (línea), la media (punto) y el desvío estándar asociado. Se representan con un asterisco los datos significativamente distintos en el eje temporal, según lo obtenido en el análisis estadístico.

Para el fósforo total hay diferencias en el mediodía únicamente, donde la superficie es distinta de fondo y medio. En cuanto al FRS, también al mediodía el medio de la columna se comporta distinto de fondo y superficie.

Adicionalmente, se hizo análisis de los coeficientes de correlación de Pearson entre los datos de PT/FRS, PT/STS y FRS/STS. Se halló únicamente correlación positiva para ambos datos de fósforo en el fondo del espacio muestreado de la represa (p valor: 0,05).

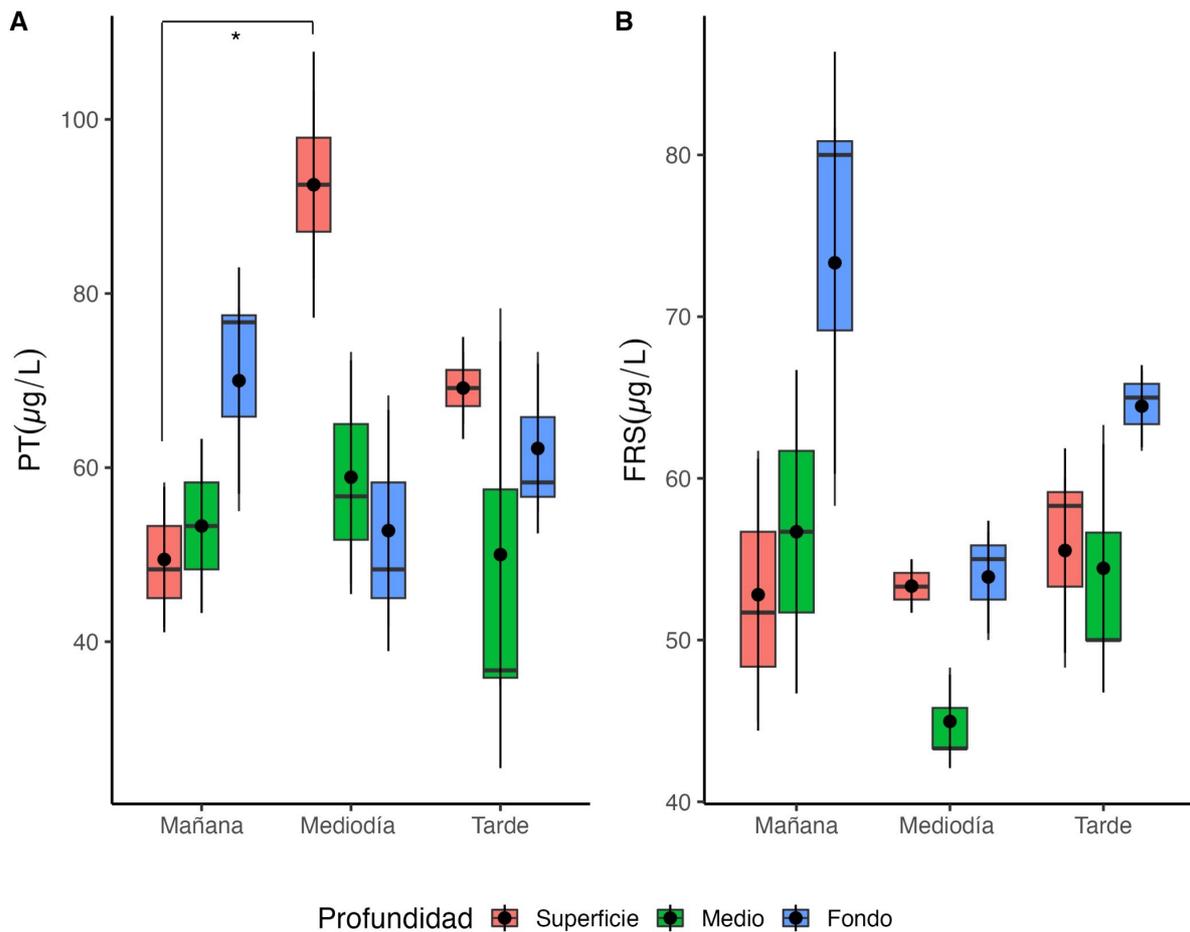


Figura 10: Ciclo diario de concentración de A) Fósforo Total (PT) en µg/l y B) Fósforo Reactivo Soluble (FRS) en µg/l. Se representa la mediana de los datos obtenidos (recta), la media (punto) y el desvío estándar asociado. Se representan con un asterisco los datos significativamente distintos en el eje temporal, según lo obtenido en el análisis estadístico.

En cuanto a la cuantificación de clorofila a lo largo de la columna, esta se representa visualmente en la Figura 11. En particular, se destacan valores iguales para medio y superficie al mediodía, pero comportamientos muy disímiles en otros momentos. Se pueden atribuir estos valores a la presencia de altas velocidades de viento, que generaron la mezcla del agua y la dispersión de organismos. Luego, las condiciones calmadas del resto de la tarde permitieron observar visualmente la presencia de blooms a las 19 hs y consecuentemente se obtuvieron los mayores valores registrados de clorofila a.

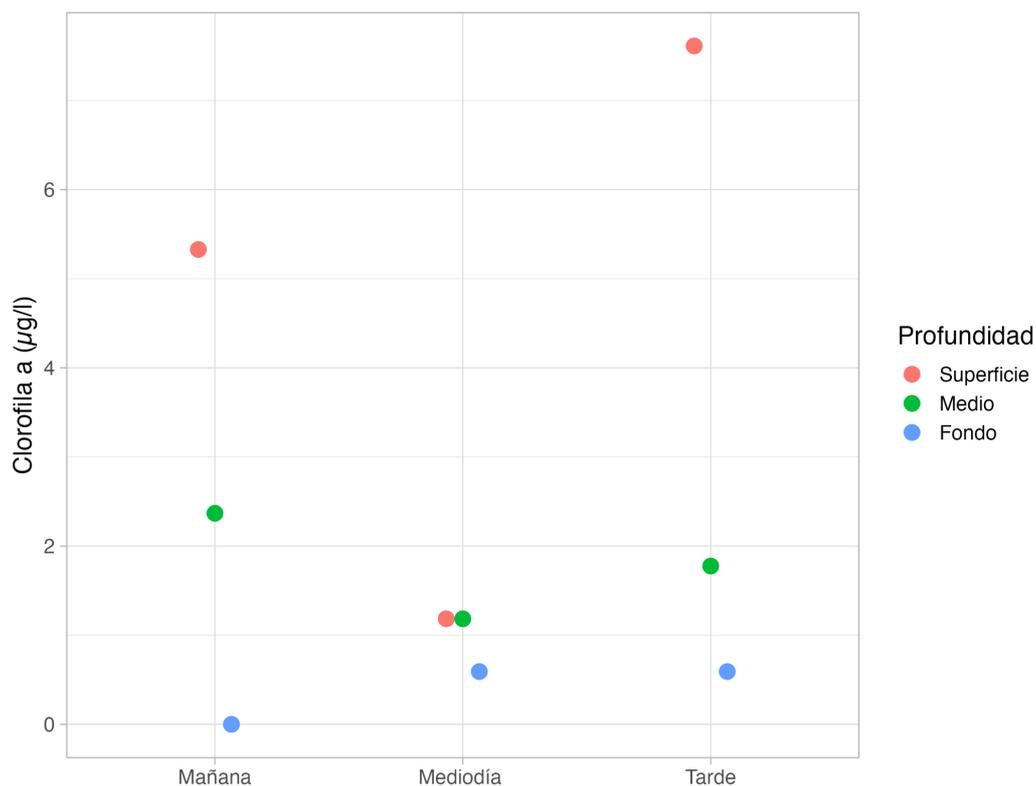


Figura 11: Ciclo diario de concentración de clorofila a en µg/l.

Finalmente se pueden aplicar los índices de estado trófico y calidad de agua aprovechando los valores obtenidos de nutrientes y demás parámetros fisicoquímicos. Los resultados son homogéneos a lo largo del ciclo diario y toda la columna de agua, se encuentra invariablemente como eutrófico y presenta valores del ICA similares, que indican buena calidad de agua (Tabla 6).

Tabla 6: Índice de estado trófico (TSI) e índice de calidad de agua (ICA) calculado para los distintos estratos monitoreados en un ciclo diario.

Momento	Sitio	TSI	ICA
Mediodía	Superficie	58,9	75
	Medio	57,7	77,5
	Fondo	56,4	77,5
Tarde	Superficie	57,1	80
	Medio	56,4	77,5
	Fondo	56,7	75
Mañana	Superficie	56,6	80
	Medio	57,3	77,5
	Fondo	57,8	75

Análisis molecular

Se llevó a cabo la misma metodología desarrollada para las muestras del método casero en la puesta a punto y los resultados de la concentración de ADN obtenida se presentan en la siguiente tabla. El volumen filtrado en todos los casos fue nuevamente de 120 ml.

Tabla 7: Concentración de ADN genómico correspondiente a cada muestra extraída medida con QUBIT. Las muestras FA, FB y FC, donde la F indica el mes en que se realizó la toma (Febrero), corresponden a la superficie del embalse. Mientras que FD, FE y FF corresponden a fondo.

Método de Extracción	Muestra	Concentración (ng/μl)
Método casero CTAB	Palmar- FA	4,56
	Palmar- FB	4,86
	Palmar- FC	5,4
	Palmar- FD	5,36
	Palmar- FE	4,47
	Palmar- FF	3,25

Como se observa en la Figura 12 se logró amplificar el 100% de las muestras para la región del gen 16S escogida. Se continuó el proceso de preparación de librerías con todas las muestras, incorporando el Mock como control positivo para la secuenciación.

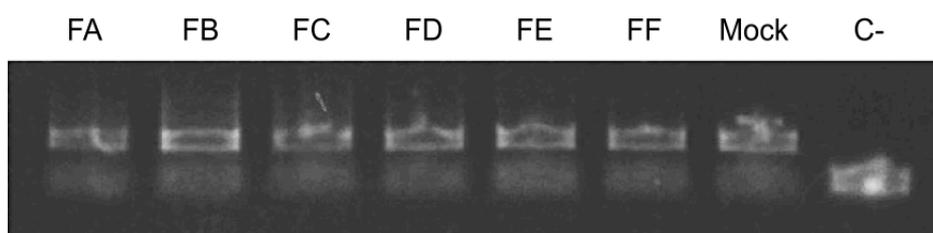


Figura 12: Corrida electroforética en Gel de Agarosa 0,8% visualizada con Bromuro de Etidio. Se observan bandas que corresponden a la obtención de amplicones luego de PCR en 7 carriles y debajo dímeros de primer.

Se obtuvieron entre 151593 y 236778 *reads* para las muestras de superficie, con promedios superiores a las muestras de fondo. Luego de filtrar, aparear y quitar quimeras se obtuvieron entre 55800 y 103659 *reads*. En el caso del mock se parte de 222137 *reads* y al finalizar permanecen 79430.

Tabla 8: *reads* obtenidos para cada muestra en cada etapa del procesamiento de datos.

Muestra	Input	Filtración	<i>Denoising R</i>	<i>Denoising F</i>	Merge	Remoción Quimeras
FA	236778	180601	176228	176979	141299	103659
FB	207649	195069	190215	191130	144661	83007
FC	223932	191867	186692	187841	144382	92265
FD	188602	176927	170803	172774	126101	64601
FE	211146	202690	196695	198829	155097	77999
FF	151593	144704	140000	141678	105611	55800

Las curvas de rarefacción arrojan que se logró obtener una profundidad adecuada para cada muestra y que por tanto se refleja correctamente la diversidad de las comunidades estudiadas (Figura 13). Por ello se procedió a trabajar con la base de datos rarefaccionada, en la que se iguala al menor esfuerzo de muestreo correspondiente a la muestra FF el resto de muestras.

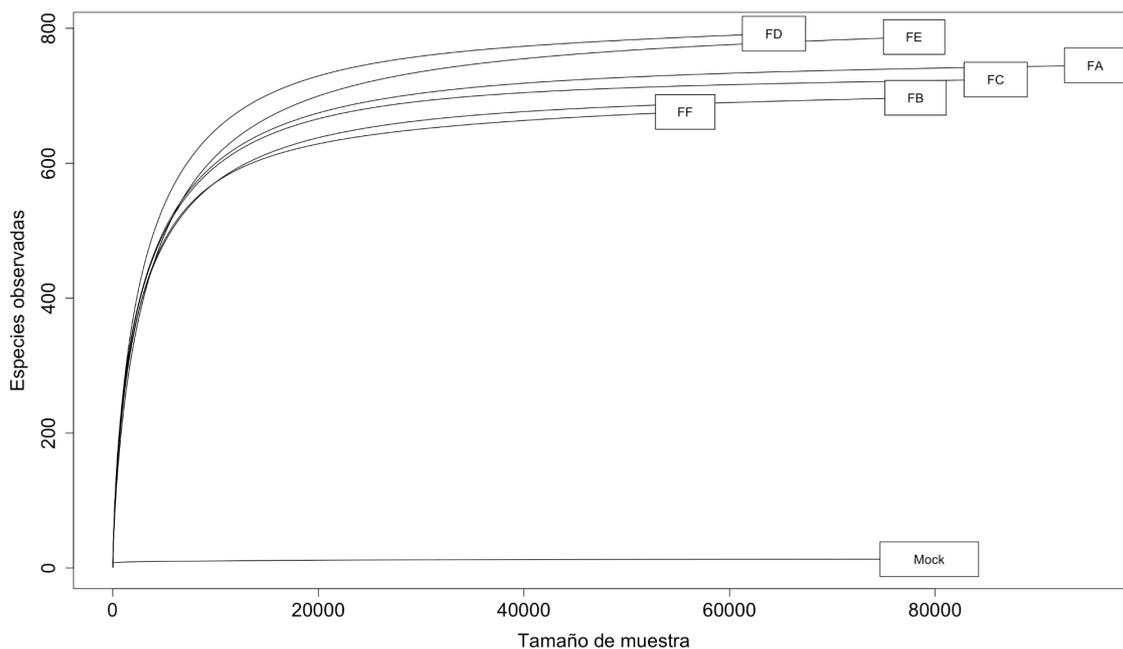


Figura 13: Curva de rarefacción correspondiente a las 6 muestras estudiadas y el Mock.

La secuenciación del control positivo de composición conocida colabora con la evaluación de la esterilidad de la preparación de librerías, y también contribuye a la observación de sesgos en los microorganismos detectados. Como se observa en la Tabla 9, la abundancia relativa proyectada difiere en menor o mayor medida para los distintos organismos evaluados. Adicionalmente, sólo un pequeño porcentaje (0,09%) no pudo ser asignado a ningún taxón luego de discriminar según el reino *Bacteria*.

Por otro lado, también se logra entrever una dificultad a la hora de asignar el género correcto para individuos de la familia *Enterobacteriaceae*. Este suceso está en acuerdo con la literatura, donde previamente se ha observado, para el mismo mock, la ineficacia de la secuenciación de amplicones cortos para la resolución de géneros y por supuesto de cepas (Callahan et al., 2019).

Tabla 9: Contenido teórico relativo de especies determinado por el fabricante del mock y porcentaje obtenido en la corrida de secuenciación con la clasificación taxonómica determinada a partir de ASVs.

Teórico		Obtenido	
Taxa	Teórico (%)	Taxa	Obtenida (%)
Lactobacillus fermentum	18,4	k__Bacteria p__Firmicutes c__Bacilli o__Lactobacillales f__Lactobacillaceae g__Limosilactobacillus	24,16
Staphylococcus aureus	15,5	k__Bacteria p__Firmicutes c__Bacilli o__Staphylococcales f__Staphylococcaceae g__Staphylococcus	15,27
Bacillus subtilis	17,4	k__Bacteria p__Firmicutes c__Bacilli o__Bacillales f__Bacillaceae g__Bacillus	13,86
Listeria monocytogenes	14,1	k__Bacteria p__Firmicutes c__Bacilli o__Lactobacillales f__Listeriaceae g__Listeria	11,94
Salmonella enterica	10,4	k__Bacteria p__Proteobacteria c__Gammaproteobacteria o__Enterobacteriales f__Enterobacteriaceae g__Salmonella	12,33
Escherichia coli	10,1	k__Bacteria p__Proteobacteria c__Gammaproteobacteria o__Enterobacteriales f__Enterobacteriaceae g__Escherichia-Shigella	12,68
Enterococcus faecalis	9,9	k__Bacteria p__Firmicutes c__Bacilli o__Lactobacillales f__Enterococcaceae g__Enterococcus	6,69
Pseudomonas aeruginosa	4,2	k__Bacteria p__Proteobacteria c__Gammaproteobacteria o__Pseudomonadales f__Pseudomonadaceae g__Pseudomonas	2,98
		k__Bacteria p__Bacteria c__Bacteria o__Bacteria f__Bacteria g__Bacteria	0,09
		k__Bacteria p__Proteobacteria c__Gammaproteobacteria o__Enterobacteriales f__Enterobacteriaceae g__Enterobacteriaceae	0,002

En cuanto a las muestras problema, el análisis de los datos de secuenciación y su alienación con bases de datos para la región V4 del gen 16s ARNr reveló que el filo más abundante para las tres réplicas de superficie es *Cyanobacteria* con 19,7%, 23,5% y 21,7% para las muestras FA, FB y FC, respectivamente (Figura 14). Sin embargo, discrepan las muestras FB y FC respecto al segundo filo más abundante, *Bacteroidota* (17,7% y 17,9%), con la muestra FA, donde este es *Proteobacteria* (18,5%). Se produce el contrario para el tercer puesto y a continuación en todos los casos lo siguen *Actinobacteriota* y *Verrucomicrobiota*. El filo más abundante del Dominio *Archaea* es *Crenarchaeota* que compone alrededor del 10% de la muestra en los tres casos.

En el caso de las muestras pertenecientes a fondo se observa el filo de Arqueas, *Crenarchaeota*, como el más abundante presente en la muestra FD (24,8%), mientras que en FE (23,2%) y FF (21,3%) se encuentra en segundo lugar. En las últimas dos el filo más abundante es *Bacteroidota* con 27,7% de la muestra FE y 22,1% de FF. *Actinobacteriota* es el segundo filo con mayor

presencia y el primero del dominio Bacteria en la muestra FD (18,9%), pero el tercero más abundante en FE (18,3%) y FF (20,1%).

En cuanto a las clases, en superficie prevalece *Cyanobacteria* en todas las muestras, y le sigue *Bacteroidia*. Consecuentemente, el género más abundante encontrado en las tres muestras es *Microcystis* PCC-7914 (12,9%, 18,0%, 16,0%).

En fondo *Nitrososphaeria* es la clase más abundante en las muestras FD y FF, pero *Bacteroidia* lo es en FE. La especie más abundante en las primeras es *Candidatus Nitrosotenuis*, mientras que en FF es *hgcl clade*.

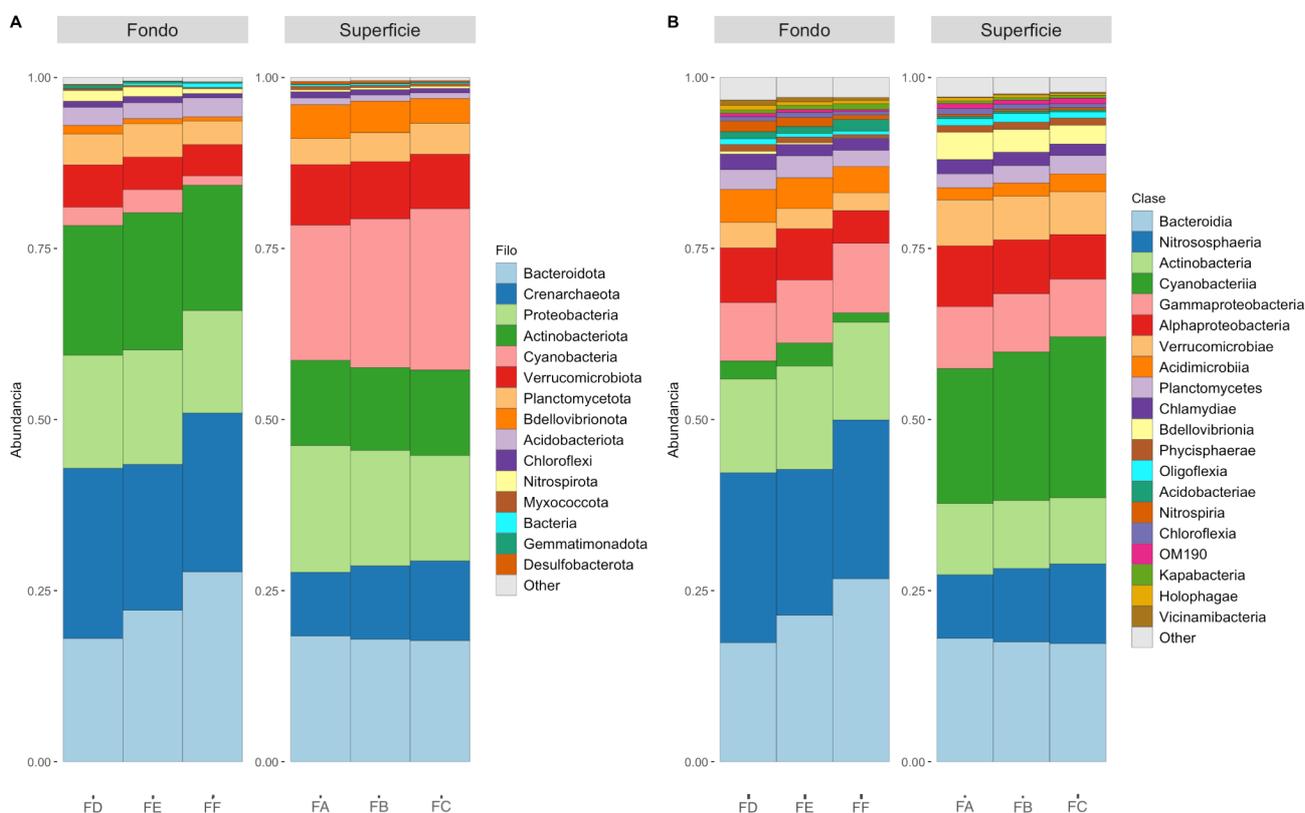


Figura 14: Clasificación taxonómica de reads del gen 16S ARNr a nivel de Filo (A) y Clase (B).

La diversidad alfa se evaluó con distintos descriptores de comunidad (Figura 15). En cuanto a la totalidad de especies encontradas, es decir, aquellas que han sido representadas por al menos un ASV en la muestra, se observa mayor riqueza en dos de las réplicas de fondo, pero también corresponde a esta profundidad la muestra con menor cantidad hallada de especies (FF). Las muestras de superficie se encuentran en valores intermedios.

En este caso, la riqueza estimada por índice de Chao estuvo levemente por encima de la observada en todos los casos. Aunque se debe tener en cuenta que se trabaja con una base de datos refaccionada que modera la diferencia en la presencia de ASV raros, el esfuerzo de muestreo más

parejo que en la puesta a punto deja entrever que en esta instancia los taxones raros permanecieron en la muestra luego de la rarefacción.

El índice “evenness” indicó que más allá de que en fondo se encuentren las muestras con mayor cantidad de especies, globalmente en sus muestras las especies se distribuyeron de forma menos equitativa que en superficie. Se mantiene además que el conjunto de muestras de fondo son menos diversas que dos de las pertenecientes a superficie.

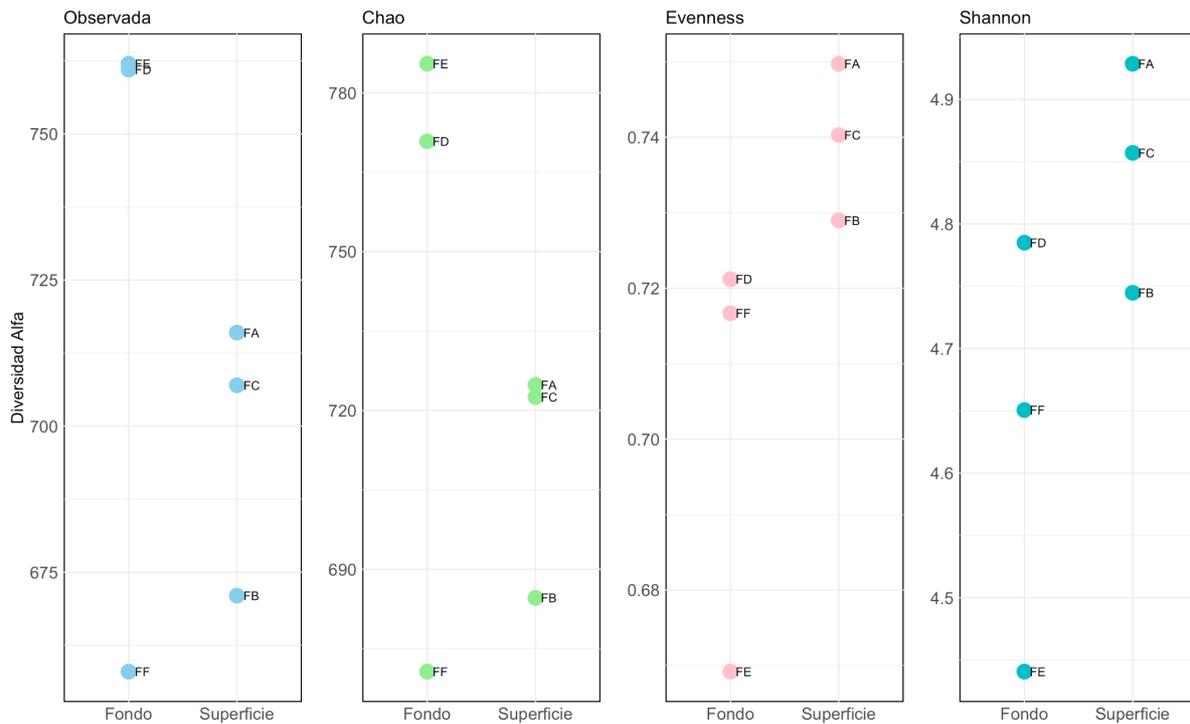


Figura 15: Índices de diversidad alfa calculados para las 6 muestras secuenciadas.

También se lleva a cabo la comparación de la diversidad entre muestras, clasificándolas según profundidad, conocido como cálculo de diversidad beta (Figura 16).

Al contar con un pequeño número de muestras secuenciadas se opta por analizar la dispersión según Bray Curtis y representarla utilizando análisis de coordenadas principales. Las muestras se ordenan en el eje principal (eje x) que explica la mayor variabilidad según su profundidad. En el segundo eje explicativo, de menor importancia, hay poca distancia entre réplicas de superficie, pero no así para las de fondo.

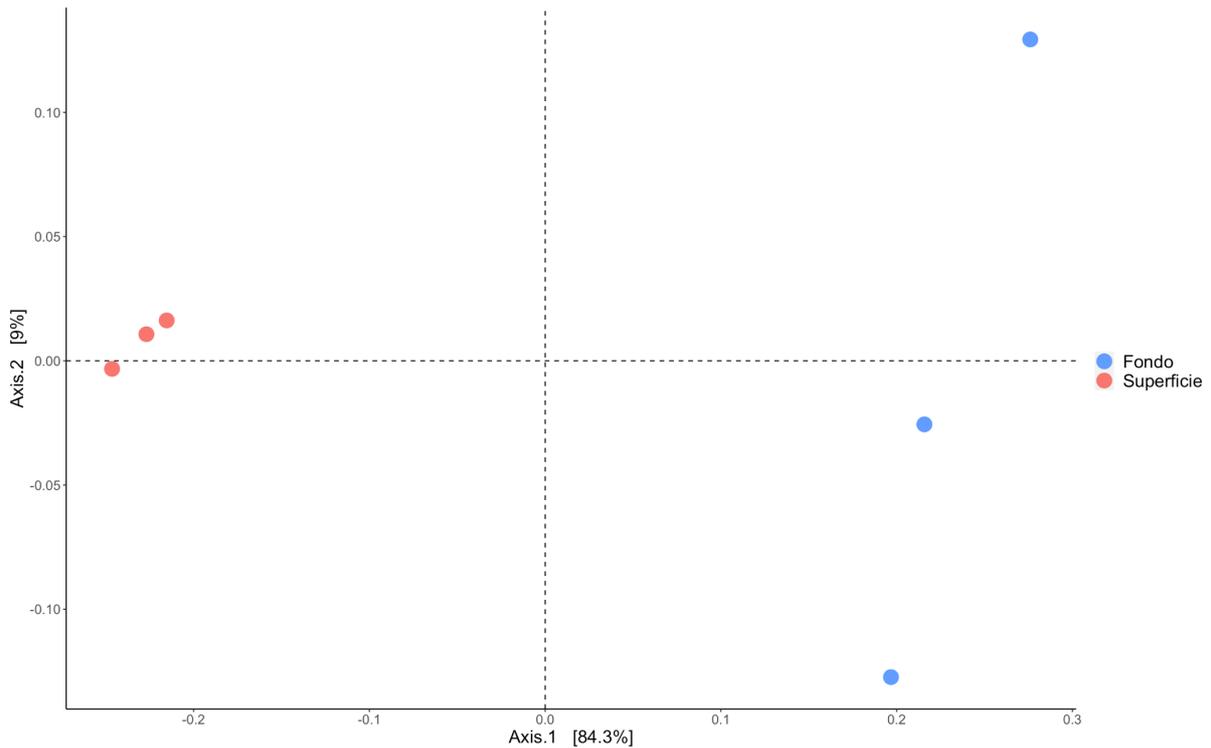


Figura 16: Diversidad beta en dos profundidades. Distancia de Bray Curtis representada por PCoA.

La utilización de la base de datos para clasificar de taxones por función, FAPROTAX reveló diferencias significativas en la abundancia relativa de funciones como metanotrofia, oxidación de metanol, metilotrofas, fijación de nitrógeno, bacterias patogénicas (Figura 17).

Debido a la importancia de algunos filos, dadas sus funciones y prevalencia en las comunidades estudiadas, finalmente se examinaron las diferencias en la abundancia relativa de *Cyanobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* y *Bacteriodota* en fondo y superficie. En la figura 18 se representa la abundancia relativa de cada grupo y los p valor obtenidos mediante una prueba t, previamente validada con el test Shapiro-Wilk.

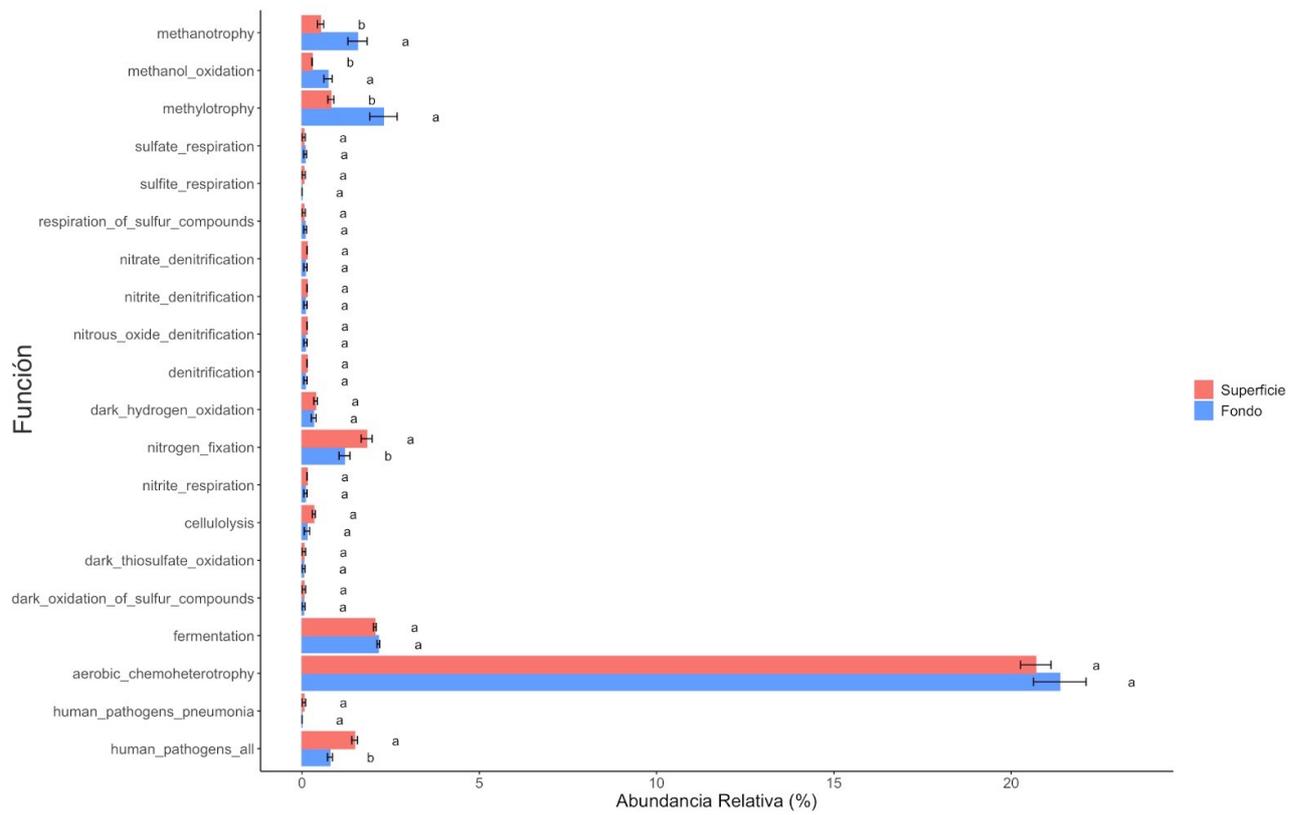


Figura 17: Abundancia relativa de funciones en superficie y fondo. Se representan diferencias significativas halladas entre profundidades con distinta letra (“a” y “b”) mediante ANOVA.

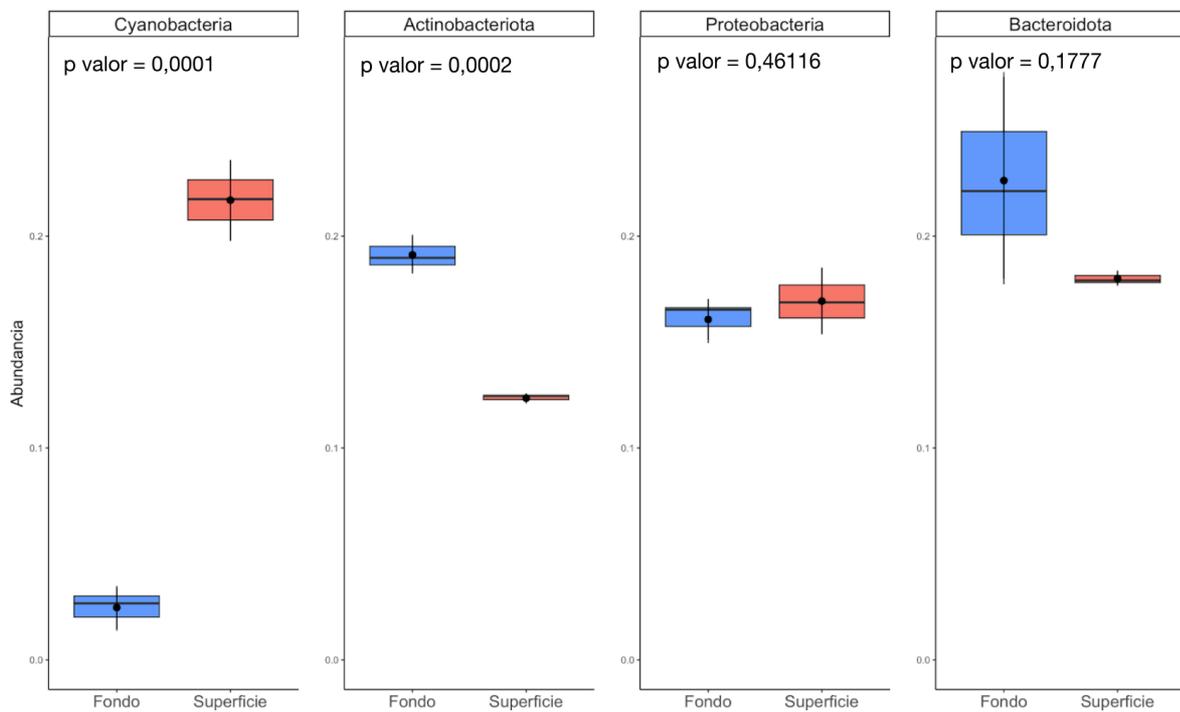


Figura 18: Abundancia relativa de filos en superficie y fondo y diferencias significativas según prueba t.

Discusión

Puesta a punto

Esta primera aproximación se centró en introducir al laboratorio en la utilización de técnicas moleculares con potencial aplicación en la gestión ambiental de ecosistemas acuáticos. Para ello, se realizó una exhaustiva búsqueda bibliográfica para poder definir desde el método de filtrado, a los controles a utilizar en los sucesivos procesamientos, hasta la elección entre OTU y ASV.

El estudio inicial de detección de microorganismos en muestras ambientales relevó que cada etapa repercute sobre los resultados finales de abundancia relativa taxonómica. Se trata de una comunidad vasta y heterogénea, por lo que pueden encontrarse diferencias intrínsecas al volumen de agua recolectado entre réplicas. Adicionalmente, las metodologías aplicadas previo y durante la preparación de librerías pueden condicionar los resultados de secuenciación, así que pueden presentar diferencias que cuestionan la utilización de réplicas (Gołębiewski & Tretyn, 2020; Zhang et al., 2018). Por ello otros autores sugieren cautela a la hora de concluir en base a diversidad beta y alfa debido a las grandes diferencias encontradas entre “réplicas” para secuenciación de amplicones de 16s ARNr (Zhou et al., 2011).

En cuanto al método de extracción con PowerWater Dneasy de la empresa Qiagen, se encontraron antecedentes provenientes de una investigación de Djurhuus y colaboradores (2017) en que este kit en conjunto con filtros de nitrocelulosa resultaba en una mayor concentración de ADN, comparado con otros kits y filtros utilizados. Por ello se incluyó en el presente trabajo un paso inicial adicional de ruptura mecánica del tejido con esferas de fibra de vidrio del mismo fabricante sugerido por los autores para este kit.

Sin embargo, no se logró detectar ADN genómico con este método, por lo que se considera el kit comercial como inadecuado para su utilización en este sistema acuático particular y por tanto se continuó en pasos subsiguientes utilizando únicamente las muestras extraídas satisfactoriamente con el método CTAB. Por costos y la imposibilidad de utilizar datos de diferentes campañas de muestreo no se pudo obtener nuevos filtros a los que aplicarle el método de extracción nuevamente.

Considerando que ambas muestras extraídas con el kit son réplicas de aquellas positivas para ADN en el método casero, es claro que si se encontraba material genético en esta matriz. El rendimiento de una extracción puede estar condicionado por la presencia de diversas sustancias provenientes del ambiente (Fukuzawa et al., 2023), que también pueden ser inhibidores de pasos sucesivos de la preparación de librerías, y que posiblemente afectaran el desempeño del kit. No se pudieron realizar nuevas pruebas para el método por falta de muestras, ya que la extracción se llevó a cabo luego de los muestreos realizados en verano de 2023 por la sección de Limnología de la Facultad de Ciencias.

De cualquier manera, la concentración obtenida por método casero para las demás muestras en esta primera instancia se considera baja para 3 de las 4 muestras (<1ng/μl según Brandt & Albertsen (2018)), de las cuales se pudo amplificar únicamente 3. La concentración de ADN genómica obtenida en la muestra DV es un orden mayor que la recuperada para DW, a pesar de tratarse de réplicas recolectadas de una misma profundidad. Posteriormente, se puede inferir que esto repercutió luego en la asignación de la taxonomía de las secuencias, ya que se obtuvo una cantidad mucho mayor de especies para la muestra DV y también mayor diversidad de Shannon, posiblemente en consecuencia a la mayor cantidad de material de partida. Por ello se hace relevante, la obtención de mecanismos de extracción robustos y reproducibles que reducen eventos como el descrito y que tienen como resultado una comunidad de bacterias muy distinta a la obtenida en otra “réplica”. Esta es una de las ventajas que presenta la utilización de kits por sobre el método casero, en el cual el proceso requiere modificaciones de protocolo según cantidades obtenidas de sobrenadante y la razón de solventes que se agregan en la extracción. Por otro lado, a favor del método CTAB está la reducción de costos, considerando que en plaza el valor de Power Water Dneasy es de 671 dólares americanos para 50 reacciones, sin tener en cuenta costos adicionales.

La muestra DP para la cual se obtuvo la segunda concentración más baja de las 4 muestras procesadas, si logró alta cantidad de *reads* pero que al ser emparejados resultaron en la menor cantidad de ASV obtenidos y cantidad de especies observadas. Menos recuperación resultó en una menor diversidad, pero mayor equitatividad, respecto a las otras muestras, lo que probablemente sea atribuible a la recuperación únicamente de los taxones principales y baja obtención de ASV raros.

En vistas de realizar una segunda aproximación a este flujo de trabajo y considerando que ya se contaba con los filtros correspondientes a la represa Palmar al extraer ADN por primera vez de las muestras de embalses, para obtener los resultados más confiables posibles se sugiere realizar un control de secuenciación para evaluar mejor la realización de réplicas. Por ejemplo, la secuenciación de un mock de composición conocida como control positivo aporta a la identificación de sesgos producto de los primers utilizados en la preparación de librerías y el proceso de secuenciación, ya que estos tienden a favorecer ciertos taxones (Brandt & Albertsen, 2018). Esta prueba se realizó en la segunda etapa de este trabajo.

Otros controles sugeridos por la literatura son controles de muestreo y extracción, como puede ser la filtración de agua ultrapura en paralelo a las muestras y la extracción de estos filtros (Brandt & Albertsen, 2018). Para mejorar los resultados de extracción también puede sugerirse la utilización de una filtración previa en tamaño de poro mayor, útil para depurar las muestras de otros organismos más grandes y posibles compuestos inhibidores (Forero-Pineda et al., 2021). Aunque esto restringe el estudio de la comunidad microbiana a los microorganismos de vida libre sin considerar parte de la población asociada a partículas.

Aplicación de la técnica en un caso de estudio: caracterización del embalse

La caracterización del embalse a partir de la fisicoquímica de su región central indicó que se trata de un ecosistema eutrófico, demostrado a partir tanto de datos de superficie como obtenidos al fondo de la columna (Tabla 5). Ello coincide con los antecedentes encontrados para el embalse en años anteriores (Bonilla et al., 2021; Nario, 2018).

Por otro lado, normalmente se encontraba en el ciclo diario la estratificación de la columna en años con tiempo despejado y una columna mezclada en años con lluvias cercanas o durante el muestreo (Chalar, 2022). En este caso, a pesar de no presentarse precipitaciones en la región según informe de INUMET, no se formó termoclina en los horarios estudiados, lo que causa la homogeneización de la columna de agua. Igualmente, se encontraron diferencias significativas entre los valores promediados de la columna.

La intensidad del viento probablemente influyó en la circulación del agua, provocando efectos asociados a la llamada circulación de Langmuir, hélices verticales a velocidades mayores de 11 km/h (Tundisi & Tundisi, 2011). Ellas producen una distribución heterogénea horizontalmente por agregación de partículas y pequeños organismos en el ambiente acuático, lo que también afecta eventos de depredación y que repercutiría a la hora del muestreo. Por ejemplo, la presencia de bajos valores de clorofila pueden estar dados por la perturbación de organismos fotoautótrofos al mediodía, en los que visiblemente no se presentaban. Una gran diferencia en relación a la tarde, donde sí se observó la acumulación de organismos verdes, y a lo encontrado anteriormente en el informe realizado en esta época del año para el mismo embalse (Chalar, 2022).

En campañas anteriores de muestreo del ciclo diario realizadas en el estudio anteriormente mencionado, los valores de nutrientes, para el mismo sitio, presentaban concentraciones de nitrato y FRS menores en superficie que en las otras profundidades estudiadas. En este caso se observó esta tendencia en FRS pero no así para nitrato. Sin embargo, si se mantiene para NO_3 altas concentraciones en fondo, lo que puede estar dado por sus propiedades químicas que lo hacen propenso a ser aportado a cuerpos de agua por vía subterránea (Addiscott, 2005). El fósforo total también se espera sea mayor en superficie a lo largo del ciclo, como se encuentra que ocurre en la tarde y la mañana. Al igual que en la mañana de febrero de 2020 en que se presentaron lluvias, en 2023 las concentraciones mayores de este nutriente no se encuentran en superficie al mediodía (Chalar, 2022).

Dadas las diferencias de nutrientes y condiciones fisicoquímicas a lo largo de la columna se esperaban encontrar diferencias en cuanto a la composición de la comunidad microbiológica.

Por ejemplo, se encontraron diferencias significativas en la población de *Actinobacteria* entre fondo y superficie, dominada por el género *hgcl-clade*. En investigaciones previas se ha observado para otros ecosistemas lacustres una correlación negativa de esta población con el oxígeno disuelto

(Sapkota, 2018) y ciertamente en este estudio se encuentra mayor abundancia de estos organismos en fondo. Asimismo, se encuentra un p valor menor a 0,05 para el filo *Cyanobacteria* entre profundidades, entendible debido a que se trata de un filo fotoautótrofo que requiere de la luz como fuente de energía y que se encuentra únicamente en el estrato superior de la columna. Adicionalmente, una investigación de Ji y colaboradores (2019) encuentra que ambos filos presentan una relación, dadas sus características, en la que la abundancia de cianobacterias implica baja abundancia de actinobacterias y teniendo en cuenta esta relación realizaron un índice de eutrofización (BEI) basado en el cociente de ambas comunidades. Para la sección superficial de este estudio el BEI obtenido fue 1,76 y 0,12 para fondo, indicando que la región superior según este índice se considera eutrofizada. Esto no está en acuerdo con lo encontrado con el cálculo TSI que informa la eutrofización homogénea de la columna.

Los individuos fotoautótrofos pertenecientes al filo *Cyanobacteria*, comúnmente asociados a la formación de *blooms* en presencia de luz son mayoritariamente del género *Microcystis* PCC-7914 en superficie (Paerl & Otten, 2013). Además se encontró, aunque en menor proporción la presencia de *Cyanobium* PCC-6307 y *Dolichospermum* NIES41 en superficie y menor abundancia aún en fondo. Coincidentemente, se trata de organismos que ya se han reportado como los principales taxones encontrados en el Río Negro por otros métodos (Bonilla et al., 2021; Chalar, 2022; Piana et al., 2011). Los organismos fotosintetizadores son una de las principales causantes del aumento de pH en aguas debido a esta ruta metabólica que lleva al consumo de hidrogeniones. En este caso se encuentran las condiciones de mayor alcalinidad en la superficie de la tarde, donde se encuentra al mismo tiempo los mayores valores de clorofila a.

Algunos individuos pertenecientes a *Cyanobacteria* también se asocian con la función de fijación de nitrógeno, que en esta represa al igual que los organismos, tiende a concentrarse en mayor medida en la superficie (Figura 16). Comúnmente se asocia este proceso a sistemas con bajas concentraciones de compuestos de nitrógeno o limitados por nitrógeno (Paerl, 2017), como se ha catalogado a los embalses de este río en años anteriores (Chalar, 2022). Por otro lado, según lo reportado por Chalar y colaboradores (2022) por métodos microscópicos, no se halló presencia de heterocistos que confieren la posibilidad de realizar la fijación, y esta es una información que no se puede adquirir mediante la secuenciación del 16S y que es importante considerar al utilizar bases de datos funcionales como FAPROTAX. Otras aproximaciones moleculares pueden incorporarse para evaluarlo a partir del ADN previamente extraído, como la detección y cuantificación de la expresión de genes asociados al proceso de fijación de nitrógeno por RT-qPCR (Zani et al., 2000). Al igual que para obtener datos reales sobre la producción de microcistinas (Lu et al., 2020).

Otros organismos con posibles efectos sobre la salud humana son los coliformes. La detección mediante el método tradicional indicó la indetectable o baja presencia de estos organismos y a su vez el abordaje molecular lo respalda, ya que el género *Escherichia-Shigella* se encontró en muy baja abundancia a lo largo de toda la columna de agua. Otras bacterias patogénicas presentes pero

en baja proporción en el volumen de agua, son *Legionella* y *Acinetobacter*. Aunque la resolución del método a nivel de género no permitiría concluir respecto a las especies asociadas o cepas y por tanto sobre su patogenicidad, en la figura 15 se hallan diferencias significativas para este tipo de bacterias, siendo mayores en superficie.

Respecto a los otros filos de mayor presencia como *Proteobacteria*, también denominado *Pseudomonadota* según la clasificación taxonómica actual, parece encontrarse de forma uniforme en regiones acuáticas con distinto grado de eutrofización (Wang et al., 2022a), y en este caso no se encontraron diferencias significativas en esta población a lo largo de la columna, al igual que para *Bacteroidetes*. De este último filo se encuentra que en promedio 3,8% de la abundancia en superficie pertenece al género *Microscillaceae*, y en fondo el 10,8%. Se trata de un parásito obligado de cianobacterias siendo su presa principal los individuos de *Microcystis* (Chun et al., 2020; Daft & Stewart, 1971).

Por último, constituyen el género de mayor presencia en fondo los individuos de *Candidatus Nitrosotenuis*, oxidadores de amonio a nitrito pertenecientes al reino *Archaea* (Sauder et al., 2018). En esta ocasión no se cuantificó la presencia de amonio en el agua por lo que no se puede relacionar el rol del organismo a la presencia o ausencia de amonio, aunque si se halla la mayor concentración de nitrato en fondo y este organismo contribuye en la vía de la nitrificación. Por otro lado, la vía metabólica que aporta amonio es la fijación de nitrógeno, que es significativamente mayor en superficie que en fondo. E igualmente, organismos eucariotas también influyen con sus vías metabólicas, por ejemplo consumiendo estos nutrientes, por lo que no se puede relacionar directamente la comunidad de microorganismos a los parámetros fisicoquímicos encontrados sin tener en cuenta esto.

El metabolismo de carbono es uno de los principales roles de la comunidad microbiológica devolviendo este recurso a la cadena trófica, conocido también como *loop* microbiano. En general, los individuos que procesan las formas más complejas de carbono se encuentran mayoritariamente en ambientes oligotróficos y también es donde las bacterias son más relevantes en la recuperación de carbono (Biddanda et al., 2001; Kiersztyn et al., 2019). En un estudio de lagos de distinto estado trófico realizado en China, los parámetros de principal influencia en la comunidad bacteriana fueron la materia orgánica particulada, es decir compuestos de carbono, junto con la clorofila a y el amonio (Wang et al., 2022a).

Se halla en fondo mayor proporción de bacterias metilotrofas, es decir, que utilizan compuestos de un solo carbono como única fuente de energía y carbono, que también se caracterizan por asociarse a las zonas pelágicas de lagos (Salcher et al., 2015). Una proporción de esta comunidad puede clasificarse como metanotrofas debido a que utilizan una forma particular de carbono, el metano. En el embalse Palmar se encontraron diferencias significativas para bacterias con esta función, siendo estas mayoritarias en fondo al igual que el grupo al que pertenecen.

A los lagos eutróficos se los asocia con la rutas metabólica de la metanogénesis, posiblemente debido al aumento de producción algal que aporta carbono al ambiente lábil para esta vía (Schwarz et al., 2007; Yang et al., 2020), y es una vía favorecida en condiciones de anoxia asociada más bien al sedimento de los lagos de agua dulce (Bastviken et al., 2008). Parte del metano producido es oxidado allí mismo por las metanotrofas, por lo que se trata de una población relevante para la reducción de emisión de este gas de efecto invernadero (Bastviken et al., 2003).

La estacionalidad, asociada intrínsecamente a cambios en la temperatura, es uno de los principales factores que modelan estas comunidades (Wang et al., 2016). En este estudio de microcosmos utilizando comunidades subtropicales y subárticas se encontró mayor incidencia de la temperatura sobre la riqueza de bacterias al hallarse concentraciones extremas de nutrientes, mientras que a temperaturas medias son los nutrientes los que inciden principalmente en la diversidad alfa de esta comunidad.

Por otro lado, en el presente trabajo se optó por analizar el embalse respecto a su longitudinalidad ya que se presentan grandes diferencias a lo largo de este eje en cuanto a fisicoquímica. Constituyó una forma sencilla de realizar esta primera aproximación al análisis de las comunidades, utilizando ambos extremos de la columna de un mismo punto y observando posibles efectos de estos cambios químicos, proyectando trasladar el conocimiento hacia relaciones más complejas de esta comunidad con la variabilidad fisicoquímica. Por ejemplo, abarcando más regiones del mismo embalse, observando el comportamiento a través del tiempo de una ubicación particular, ya que se reportan cambios relevantes en ese eje, o comparándolo con otros ecosistemas de características similares o cuenca.

El análisis de componentes principales (Figura 15) reveló la influencia de las distintas condiciones en la comunidad microbiana en el primer eje, también observado a nivel de equitatividad. Aunque las réplicas superiores no presentan grandes diferencias, en fondo, a pesar de encontrarse bien diferenciadas de aquellas en superficie en el primer eje, se encuentran diferencias composicionales de mayor relevancia entre las réplicas.

Esta segunda experiencia con la técnica de extracción y preparación de librerías permitió ahondar mejor sobre algunos de los aspectos discutidos en la sección anterior, por ejemplo respecto a la realización de réplicas. Se priorizó la realización de réplicas técnicas en este estudio para generar mayor cantidad de datos de partida para un punto, considerando que en un filtro se logran obtener entre 100 y 150 ml antes de la saturación. Ya en la puesta a punto se observó disimilitud entre las dos réplicas secuenciadas, además de la baja reproducibilidad sobre replicas teóricamente idénticas. Pero debido a la carencia de análisis estadísticos, no fue posible obtener conclusiones más que cualitativas. En esta siguiente etapa del trabajo se logró obtener resultados más homogéneos, donde los taxones que aportan mayor información presentan comportamientos similares entre las profundidades estudiadas.

Por otro lado, adicionar la secuenciación de un mock demostró diferencias en cuanto a la composición real sugerida por el fabricante y la obtenida por el método de secuenciación.

Aquí se hace evidente porque este tipo de análisis son particulares de cada sistema, y como no son comparables más allá de aspectos generales. Al mismo tiempo, destaca la importancia de utilizar este método para caracterizar un sistema en relación a distintas variables, ya que se trata de un método con valor comparativo y no absoluto.

Para lograr inferir relaciones más concretas entre nutrientes y la presencia/ausencia de taxones o su abundancia relativa, otros estudios comúnmente realizan análisis multivariados como análisis de redundancia (RDA) y análisis de correlación canónica (CCA) (ter Braak & Verdonschot, 1995; Wang et al., 2021a). Sin embargo en esta ocasión la ausencia de réplicas biológicas y baja cantidad de variables de agrupación y muestras no permitieron representar este vínculo. Esta aplicación es realmente relevante a la hora de relacionar las variables fisicoquímicas y presencia/ausencia de otros compuestos con la comunidad, para poder establecer vínculos específicos entre ellos, proyectando que la comunidad es una posible descriptora del estado trófico y la salud de los ecosistemas (Sun et al., 2012).

El desafío se encuentra en la aplicación de métodos que representen correctamente a la comunidad microbiana y en un diseño experimental que diferencie las comunidades según las variables fisicoquímicas presentes, permitiendo identificar taxones clave y su prevalencia según el estado de salud del ambiente acuático.

Conclusiones y perspectivas

El ecosistema en la región central del embalse fue caracterizado exitosamente en términos de su perfil microbiológico mediante la aplicación del método de extracción seleccionado y la metodología de preparación de librerías. Aunque el kit comercial no logró separar el ADN genómico de la matriz, el método casero CTAB resultó en una concentración suficiente para la amplificación por PCR en ambos pasos. Este enfoque permitió identificar organismos procariotas previamente detectados por medios tradicionales y asociar la comunidad a eventos fisicoquímicos del agua. Adicionalmente, se logró diferenciar, a partir de esta comunidad, las muestras por triplicado según su origen en el eje vertical.

Sin embargo, se encuentra cierta variabilidad entre triplicados, por lo que se sugieren alternativas para posteriores aplicaciones sobre estos cursos de agua, en la que se priorice observar variaciones inter e intra ecosistémicas, por sobre la implementación de réplicas técnicas. Especialmente si se espera utilizar la técnica para analizar la comunidad como potencial predictora y evaluadora de contaminación. El enfoque molecular, una vez optimizado, reúne información de la mayoría de organismos presentes y su proporción en la comunidad a través de un solo experimento, lo que sugiere su potencial para reemplazar otras técnicas tradicionales.

Bibliografía

- Amplicon, P. C. R., Clean-Up, P. C. R., & Index, P. C. R. (2013). 16S Metagenomic sequencing library preparation. *Illumina: San Diego, CA, USA*.
- Addiscott, T. M. (2005). *Nitrate, agriculture, and the environment*. CABI Pub.
- Alonso, C., Pereira, E., Bertoglio, F., De Cáceres, M., & Amann, R. (2022). Bacterioplankton composition as an indicator of environmental status: Proof of principle using indicator value analysis of estuarine communities. *Aquatic Microbial Ecology*, *88*, 1-18. <https://doi.org/10.3354/ame01979>
- Amon, R. M. W., & Benner, R. (1996). Bacterial utilization of different size classes of dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography*, *41*(1), 41-51. <https://doi.org/10.4319/lo.1996.41.1.0041>
- Amorim, C. A., & Moura, A. do N. (2021). Ecological impacts of freshwater algal blooms on water quality, plankton biodiversity, structure, and ecosystem functioning. *Science of The Total Environment*, *758*, 143605. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143605>
- APHA. (1995). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (19th Edition). American Public Health Association Inc. https://beta-static.fishersci.com/content/dam/fishersci/en_US/documents/programs/scientific/technical-documents/white-papers/apha-water-testing-standard-methods-introduction-white-paper.pdf
- Astudillo-García, C., Hermans, S. M., Stevenson, B., Buckley, H. L., & Lear, G. (2019). Microbial assemblages and bioindicators as proxies for ecosystem health status: Potential and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *103*(16), 6407-6421. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09963-0>
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J., Gray, J., Meyer-Reil, L., & Thingstad, F. (1983). The Ecological Role of Water-Column Microbes in the Sea. *Marine Ecology Progress Series*, *10*, 257-263. <https://doi.org/10.3354/meps010257>
- Bastviken, D., Cole, J. J., Pace, M. L., & Van de Bogert, M. C. (2008). Fates of methane from different lake habitats: Connecting whole-lake budgets and CH₄ emissions. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, *113*(G2). <https://doi.org/10.1029/2007JG000608>
- Bastviken, D., Ejlertsson, J., Sundh, I., & Tranvik, L. (2003). Methane as a Source of Carbon and Energy for Lake Pelagic Food Webs. *Ecology*, *84*(4), 969-981. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2003\)084\[0969:MAASOC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2003)084[0969:MAASOC]2.0.CO;2)
- Berry, M. A., Davis, T. W., Cory, R. M., Duhaime, M. B., Johengen, T. H., Kling, G. W., Marino, J. A., Den Uyl, P. A., Gossiaux, D., Dick, G. J., & Deneff, V. J. (2017). Cyanobacterial harmful algal blooms

are a biological disturbance to Western Lake Erie bacterial communities. *Environmental Microbiology*, 19(3), 1149-1162. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13640>

Bertoglio, F. (2016). *Respuesta de la comunidad bacteriana a alteraciones de la trama trófica planctónica en el Río de La Plata*. Universidad de la República (Uruguay).

Biddanda, B., Ogdahl, M., & Cotner, J. (2001). Dominance of bacterial metabolism in oligotrophic relative to eutrophic waters. *Limnology and Oceanography*, 46(3), 730-739. <https://doi.org/10.4319/lo.2001.46.3.0730>

Bonilla, S., Aubriot, L., Haakonsson, S., Illarze, M., Díaz, I., & Brena, B. (2021). Las floraciones de cianobacterias tóxicas comprometen el uso del agua del Río Negro, Uruguay. *INNOTECH*, 22. <https://doi.org/10.26461/22.08>

Brandt, J., & Albertsen, M. (2018). Investigation of Detection Limits and the Influence of DNA Extraction and Primer Choice on the Observed Microbial Communities in Drinking Water Samples Using 16S rRNA Gene Amplicon Sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.02140>

Callahan, B. J., Wong, J., Heiner, C., Oh, S., Theriot, C. M., Gulati, A. S., McGill, S. K., & Dougherty, M. K. (2019). High-throughput amplicon sequencing of the full-length 16S rRNA gene with single-nucleotide resolution. *Nucleic Acids Research*, 47(18), e103-e103. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz569>

Callahan, B., Mcmurdie, P., Rosen, M., Han, A., Johnson, A. J., & Holmes, S. (2015). *DADA2: High resolution sample inference from amplicon data*. <https://doi.org/10.1101/024034>

Campo, J., & Sancholuz, L. (1998). Biogeochemical impacts of submerging forests through large dams in the Río Negro, Uruguay. *Journal of Environmental Management*, 54(1), 59-66. <https://doi.org/10.1006/jema.1998.0222>

Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(supplement_1), 4516-4522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000080107>

Carlson, R. E. (1977). A trophic state index for lakes¹. *Limnology and Oceanography*, 22(2), 361-369. <https://doi.org/10.4319/lo.1977.22.2.0361>

CARU. (2019). *DIGESTO SOBRE EL USO Y APROVECHAMIENTO DEL RIO URUGUAY APROBADO POR RESOLUCION CARU NRO 28-19 DE 5-12-2019.pdf*. https://www.caru.org.uy/web/pdfs_publicaciones/DIGESTO/DIGESTO%20SOBRE%20EL%20USO%20Y%20APROVECHAMIENTO%20DEL%20RIO%20URU

GUAY%20APROBADO%20POR%20RESOLUCION%20CARU%20NRO%2028-19%20DE%205-12-2019.pdf

Chalar, G., Arocena, R., Pacheco, J. P., & Fabián, D. (2010). Trophic assessment of streams in Uruguay: A Trophic State Index for Benthic Invertebrates (TSI-BI). *Ecological Indicators*. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2010.06.004>

Chalar, G. (2021). Contenido de fosforo de los sedimentos de los embalses del Rio Negro y carga interna potencial. *Convenio entre el Ministerio de Ambiente y la Universidad de la República (Facultad de Ciencias)*.

Chalar, G. (2022). *Estado y evolución de la calidad del agua de los tres embalses del Río Negro: Informe 2018-2021*.

Chiarello, M., McCauley, M., Villéger, S., & Jackson, C. R. (2022). Ranking the biases: The choice of OTUs vs. ASVs in 16S rRNA amplicon data analysis has stronger effects on diversity measures than rarefaction and OTU identity threshold. *PLOS ONE*, *17*(2), e0264443. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264443>

Chorus, I. (2001). Introduction: Cyanotoxins — Research for Environmental Safety and Human Health. En I. Chorus (Ed.), *Cyanotoxins* (pp. 1-4). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-59514-1_1

Chun, S.-J., Cui, Y., Lee, J. J., Choi, I.-C., Oh, H.-M., & Ahn, C.-Y. (2020). Network analysis reveals succession of Microcystis genotypes accompanying distinctive microbial modules with recurrent patterns. *Water Research*, *170*, 115326. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115326>

Cordier, T., Alonso-Sáez, L., Apothéloz-Perret-Gentil, L., Aylagas, E., Bohan, D. A., Bouchez, A., Chariton, A., Creer, S., Frühe, L., Keck, F., Keeley, N., Laroche, O., Leese, F., Pochon, X., Stoeck, T., Pawlowski, J., & Lanzén, A. (2021). Ecosystems monitoring powered by environmental genomics: A review of current strategies with an implementation roadmap. *Molecular Ecology*, *30*(13), 2937-2958. <https://doi.org/10.1111/mec.15472>

Cunha, D. G. F., Calijuri, M. do C., & Lamparelli, M. C. (2013). A trophic state index for tropical/subtropical reservoirs (TSI_{tsr}). *Ecological Engineering*, *60*, 126-134. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2013.07.058>

Daft, M. J., & Stewart, W. D. P. (1971). Bacterial Pathogens of Freshwater Blue-Green Algae. *New Phytologist*, *70*(5), 819-829. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1971.tb02582.x>

Deiner, K., Walser, J.-C., Mächler, E., & Altermatt, F. (2015). Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. *Biological Conservation*, *183*, 53-63. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.018>

- Delgado-Baquerizo, M., Giaramida, L., Reich, P. B., Khachane, A. N., Hamonts, K., Edwards, C., Lawton, L. A., & Singh, B. K. (2016). Lack of functional redundancy in the relationship between microbial diversity and ecosystem functioning. *Journal of Ecology*, *104*(4), 936-946. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12585>
- Dennison, W. C., Orth, R. J., Moore, K. A., Stevenson, J. C., Carter, V., Kollar, S., Bergstrom, P. W., & Batiuk, R. A. (1993). Assessing Water Quality with Submersed Aquatic Vegetation. *BioScience*, *43*(2), 86-94. <https://doi.org/10.2307/1311969>
- Djurhuus, A., Port, J., Closek, C. J., Yamahara, K. M., Romero-Maraccini, O., Walz, K. R., Goldsmith, D. B., Michisaki, R., Breitbart, M., Boehm, A. B., & Chavez, F. P. (2017). Evaluation of Filtration and DNA Extraction Methods for Environmental DNA Biodiversity Assessments across Multiple Trophic Levels. *Frontiers in Marine Science*, *4*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2017.00314>
- Douterelo, I., Boxall, J. B., Deines, P., Sekar, R., Fish, K. E., & Biggs, C. A. (2014). 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>
- Dufrene, M., & Legendre, P. (1997). Species Assemblages and Indicator Species: The Need for a Flexible Asymmetrical Approach. *Ecological Monographs*, *67*(3), 345-366. <https://doi.org/10.2307/2963459>
- Eguren, G., Rivas-Rivera, N., García, C., Böcking, B., & Bandeira, S. (2018). Water quality index for agricultural systems in Northwest Uruguay. *Environmental Monitoring and Assessment*, *190*(12), 710. <https://doi.org/10.1007/s10661-018-7090-8>
- Fandino, L., Riemann, L., Steward, G., Long, R., & Azam, F. (2001). Variations in bacterial community structure during a dinoflagellate bloom analyzed by DGGE and 16S rDNA sequencing. *23*, 119-130. <https://doi.org/10.3354/ame023119>
- Farell, E. M., & Alexandre, G. (2012). Bovine serum albumin further enhances the effects of organic solvents on increased yield of polymerase chain reaction of GC-rich templates. *BMC Research Notes*, *5*, 257. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-257>
- Forero-Pineda, N., Marin-Suarez, J., Forero-Ulloa, F. E., & Gómez-Palacio, A. (2021). Extracción de ADN bacteriano a partir de cuerpos de agua de uso agrícola. *Ciencia y Agricultura*, *18*(1), 36-45.
- Fukuda, K., Ogawa, M., Taniguchi, H., & Saito, M. (2016). Molecular Approaches to Studying Microbial Communities: Targeting the 16S Ribosomal RNA Gene. *Journal of UOEH*, *38*(3), 223-232. <https://doi.org/10.7888/juoeh.38.223>

- Fukuzawa, T., Shirakura, H., Nishizawa, N., Nagata, H., Kameda, Y., & Doi, H. (2023). Environmental DNA extraction method from water for a high and consistent DNA yield. *Environmental DNA*, 5(4), 627-633. <https://doi.org/10.1002/edn3.406>
- Galizia Tundisi, J., & Matsumura Tundisi, T. (2011). *Limnology*. CRC Press.
- Geng, M., Zhang, W., Hu, T., Wang, R., Cheng, X., & Wang, J. (2022). Eutrophication causes microbial community homogenization via modulating generalist species. *Water Research*, 210, 118003. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.118003>
- Gołębiewski, M., & Tretyn, A. (2020). Generating amplicon reads for microbial community assessment with next-generation sequencing. *Journal of Applied Microbiology*, 128(2), 330-354. <https://doi.org/10.1111/jam.14380>
- Goyenola, G. (2016). *Effects of agricultural intensity on the dynamics of macronutrients in low order streams: An assessment under contrasting climatic / hydrological conditions* [Doctorado]. Universidad de la República (Uruguay).
- Grill, G., Lehner, B., Lumsdon, A., MacDonald, G., Zarfl, C., & Reidy Liermann, C. (2015). An index-based framework for assessing patterns and trends in river fragmentation and flow regulation by global dams at multiple scales. *Environmental Research Letters*, 10, 015001. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/10/1/015001>
- Han, X., Schubert, C. J., Fiskal, A., Dubois, N., & Lever, M. A. (2020). Eutrophication as a driver of microbial community structure in lake sediments. *Environmental Microbiology*, 22(8), 3446-3462. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15115>
- Heck, K.L., van Belle, G. & Simberloff, D. (1975). Explicit calculation of the rarefaction diversity measurement and the determination of sufficient sample size. *Ecology* 56, 1459–1461.
- Hernandez, D. J., David, A. S., Menges, E. S., Searcy, C. A., & Afkhami, M. E. (2021). Environmental stress destabilizes microbial networks. *The ISME Journal*, 15(6), Article 6. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00882-x>
- Hong, P., Schmid, B., De Laender, F., Eisenhauer, N., Zhang, X., Chen, H., Craven, D., De Boeck, H. J., Hautier, Y., Petchey, O. L., Reich, P. B., Steudel, B., Striebel, M., Thakur, M. P., & Wang, S. (2022). Biodiversity promotes ecosystem functioning despite environmental change. *Ecology Letters*, 25(2), 555-569. <https://doi.org/10.1111/ele.13936>
- Humbert, J., Dorigo, U., Cecchi, P., Le Berre, B., Debroas, D., & Bouvy, M. (2009). Comparison of the structure and composition of bacterial communities from temperate and tropical freshwater ecosystems. *Environmental Microbiology*, 11(9), 2339-2350. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01960.x>

Illarze, M. (2015). *Embalses como incubadoras de cianobacterias: Efecto de la residencia del agua y de la disponibilidad de nutrientes*. Universidad de la República (Uruguay).

Jeppesen, E., Moss, B., Bennion, H., Carvalho, L., DeMeester, L., Feuchtmayr, H., Friberg, N., Gessner, M. O., Hefting, M., Lauridsen, T. L., Liboriussen, L., Malmquist, H. J., May, L., Meerhoff, M., Olafsson, J. S., Soons, M. B., & Verhoeven, J. T. A. (2010). Interaction of Climate Change and Eutrophication. *Climate Change Impacts on Freshwater Ecosystems*, 119.

Ji, B., Liang, J., Ma, Y., Zhu, L., & Liu, Y. (2019). Bacterial community and eutrophic index analysis of the East Lake. *Environmental Pollution*, 252, 682-688. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.138>

Kiersztyn, B., Chróst, R., Kaliński, T., Siuda, W., Bukowska, A., Kowalczyk, G., & Grabowska, K. (2019). Structural and functional microbial diversity along a eutrophication gradient of interconnected lakes undergoing anthropopressure. *Scientific Reports*, 9(1), 11144. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47577-8>

Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41(1), e1-e1. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>

Kruk, C., Segura, A., Piñeiro, G., Baldassini, P., Pérez-Becoña, L., García-Rodríguez, F., Perera, G., & Piccini, C. (2023). Rise of toxic cyanobacterial blooms is promoted by agricultural intensification in the basin of a large subtropical river of South America. *Global Change Biology*, 29(7), 1774-1790. <https://doi.org/10.1111/gcb.16587>

Kruk, C., Suárez, C., Ríos, M., Zaldúa, N., & Martino, D. (2013). *Ficha: Análisis Calidad de Agua en Uruguay*. Vida Silvestre Uruguay. <http://vidasilvestre.org.uy/wp-content/uploads/2013/09/informeaguafinalcm1.pdf>

Lau, K. E. M., Washington, V. J., Fan, V., Neale, M. W., Lear, G., Curran, J., & Lewis, G. D. (2015). A novel bacterial community index to assess stream ecological health. *Freshwater Biology*, 60(10), 1988-2002. <https://doi.org/10.1111/fwb.12625>

Lear, G., Dopheide, A., Ancion, P., & Lewis, G. D. (2011). A comparison of bacterial, ciliate and macroinvertebrate indicators of stream ecological health. *Aquatic Ecology*, 45(4), 517-527. <https://doi.org/10.1007/s10452-011-9372-x>

Li, D., Chang, F., Wen, X., Duan, L., & Zhang, H. (2022a). Seasonal Variations in Water Quality and Algal Blooming in Hypereutrophic Lake Qilu of Southwestern China. *Water*, 14(17), 2611. <https://doi.org/10.3390/w14172611>

- Li, W., Wang, B., Liu, N., Yang, M., Liu, C.-Q., & Xu, S. (2022b). River damming enhances ecological functional stability of planktonic microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, *13*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.1049120>
- Lindström, E. S., Kamst-Van Agterveld, M. P., & Zwart, G. (2005). Distribution of Typical Freshwater Bacterial Groups Is Associated with pH, Temperature, and Lake Water Retention Time. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(12), 8201-8206. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8201-8206.2005>
- Liu, M., Dong, Y., Zhang, W., Sun, J., Zhou, F., Ren, J., Bao, S., & Xiao, T. (2013). Diversity of bacterial community during spring phytoplankton blooms in the central Yellow Sea. *Canadian Journal of Microbiology*, *59*(5), 324-332. <https://doi.org/10.1139/cjm-2012-0735>
- Louca, S., Parfrey, L. W., & Doebeli, M. (2016). Decoupling function and taxonomy in the global ocean microbiome. *Science (New York, N.Y.)*, *353*(6305), 1272-1277. <https://doi.org/10.1126/science.aaf4507>
- Lu, J., Struewing, I., Wymer, L., Tettenhorst, D. R., Shoemaker, J., & Allen, J. (2020). Use of qPCR and RT-qPCR for Monitoring Variations of Microcystin Producers and as an Early Warning System to Predict Toxin Production in an Ohio Inland Lake. *Water research*, *170*, 115262. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115262>
- Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1994). Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiology Reviews*, *15*(2-3), 155-173. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00132.x>
- Martínez de la Escalera, G., Antoniadou, D., Bonilla, S., & Piccini, C. (2014). Application of ancient DNA to the reconstruction of past microbial assemblages and for the detection of toxic cyanobacteria in subtropical freshwater ecosystems. *Molecular Ecology*, *23*(23), 5791-5802. <https://doi.org/10.1111/mec.12979>
- McKinney, M. L., & Lockwood, J. L. (1999). Biotic homogenization: A few winners replacing many losers in the next mass extinction. *Trends in Ecology & Evolution*, *14*(11), 450-453. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(99\)01679-1](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(99)01679-1)
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLOS ONE*, *8*(4), e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Ministerio de Ambiente. *Informe del Estado del Ambiente 2016-2019*. (2020).
- Monteiro, M. I. C., & Ferreira, F. N. (2003). Simplified version of the sodium salicylate method for analysis of nitrate in drinking waters. *Analytica Chimica Acta*.

- Montemurro, D. G. (2017). *Balance de nutrientes y eutrofización en ríos y embalses de la cuenca del Río Negro (Uruguay)*. Universidad de la República (Uruguay).
- Murphy, J., & Riley, J. P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analítica Chimica Acta*, 27, 31-36.
- Nario, I. Q. A. (2018). *Calidad Ambiental de la Cuenca del Río Negro 2009-2017*. Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, DINAMA.
- Neto, A. J. G., da Silva, L. C., Saggio, A. A., & Rocha, O. (2014). *Zooplankton communities as eutrophication bioindicators in tropical reservoirs*. 14(4): e20140018. <http://dx.doi.org/10.1590/1676-06032014001814>
- Newton, R. J., Jones, S. E., Eiler, A., McMahon, K. D., & Bertilsson, S. (2011). A Guide to the Natural History of Freshwater Lake Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 75(1), 14-49. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00028-10>
- Nusch, E. (1980). Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination. *Arch Hydrobiol Beih Ergebn Limnol*, 14, 14-36.
- Olano, H., Martigani, F., Somma, A., & Aubriot, L. (2019). Wastewater discharge with phytoplankton may favor cyanobacterial development in the main drinking water supply river in Uruguay. *Environmental Monitoring and Assessment*, 191(3), 146. <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7288-4>
- Paerl, H. (2017). The cyanobacterial nitrogen fixation paradox in natural waters. *F1000Research*, 6, 244. <https://doi.org/10.12688/f1000research.10603.1>
- Paerl, H. W., Fulton, R. S., Moisaner, P. H., & Dyble, J. (2001). Harmful Freshwater Algal Blooms, With an Emphasis on Cyanobacteria. *The Scientific World Journal*, 1, 76-113. <https://doi.org/10.1100/tsw.2001.16>
- Paerl, H. W., & Otten, T. G. (2013). Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences, and Controls. *Microbial Ecology*, 65(4), 995-1010. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0159-y>
- Paliy, O., & Shankar, V. (2016). Application of multivariate statistical techniques in microbial ecology. *Molecular ecology*, 25(5), 1032-1057. <https://doi.org/10.1111/mec.13536>
- Pawlowski, J., Kelly-Quinn, M., Altermatt, F., Apothéloz-Perret-Gentil, L., Beja, P., Boggero, A., Borja, A., Bouchez, A., Cordier, T., Domaizon, I., Feio, M. J., Filipe, A. F., Fornaroli, R., Graf, W., Herder, J., van der Hoorn, B., Iwan Jones, J., Sagova-Mareckova, M., Moritz, C., ... Kahlert, M. (2018). The future of biotic indices in the ecogenomic era: Integrating (e)DNA metabarcoding in biological assessment of aquatic ecosystems. *Science of The Total Environment*, 637-638, 1295-1310. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.002>

Pernthaler, J. (2013). Freshwater Microbial Communities. En E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, & F. Thompson (Eds.), *The Prokaryotes* (pp. 97-112). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30123-0_40

Piana, M., Fabian, D., Delbene, L., & Chalar Marquisá, G. (2011). Toxics blooms of *Microcystis aeruginosa* in three Río Negro reservoirs, Uruguay. *Harmful Algae News*, 43, 16-17.

Pinhassi, J., Sala, M. M., Havskum, H., Peters, F., Guadayol, Ò., Malits, A., & Marrasé, C. (2004). Changes in Bacterioplankton Composition under Different Phytoplankton Regimens. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(11), 6753-6766. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6753-6766.2004>

Pollock, J., Glendinning, L., Wisedchanwet, T., & Watson, M. (2018). The Madness of Microbiome: Attempting To Find Consensus “Best Practice” for 16S Microbiome Studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(7), e02627-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.02627-17>

Prodan, A., Tremaroli, V., Brolin, H., Zwinderman, A. H., Nieuwdorp, M., & Levin, E. (2020). Comparing bioinformatic pipelines for microbial 16S rRNA amplicon sequencing. *PLOS ONE*, 15(1), e0227434. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227434>

Qin, L., Lei, P., Lei, Q., Liu, H., Li, X., Zhang, H., & Lindsey, S. (2020). Evaluating the effect of dam construction on the phosphorus fractions in sediments in a reservoir of drinking water source, China. *Environmental Monitoring and Assessment*, 192(2), 99. <https://doi.org/10.1007/s10661-019-8053-4>

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(Database issue), D590-D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>

Rangel, L. M., Silva, L. H. S., Rosa, P., Roland, F., & Huszar, V. L. M. (2012). Phytoplankton biomass is mainly controlled by hydrology and phosphorus concentrations in tropical hydroelectric reservoirs. *Hydrobiologia*, 693(1), 13-28. <https://doi.org/10.1007/s10750-012-1083-3>

Revello, A. G. (2020). *Generación de métodos basados en genómica para detectar microorganismos nocivos en sistemas acuáticos*. Universidad de la República (Uruguay).

Rydin, E. (2000). Potentially mobile phosphorus in Lake Erken sediment. *Water Research*, 34(7), 2037-2042. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(99\)00375-9](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(99)00375-9)

Salcher, M. M., Neuenschwander, S. M., Posch, T., & Pernthaler, J. (2015). The ecology of pelagic freshwater methylotrophs assessed by a high-resolution monitoring and isolation campaign. *The ISME Journal*, 9(11), Article 11. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.55>

Sapkota, A. R. (2018). Agricultural Freshwater Pond Supports Diverse and Dynamic Bacterial and Viral Populations. *Frontiers in Microbiology*, 9.

- Sauder, L., Engel, K., Lo, C.-C., Chain, P., & Neufeld, J. (2018). Cultivation and characterization of *Candidatus Nitrosotenuis aquariensis*, an ammonia-oxidizing archaeon from a freshwater aquarium biofilter. *Applied and environmental microbiology*, 84. <https://doi.org/10.1128/AEM.01430-18>
- Schwarz, J. I. K., Lueders, T., Eckert, W., & Conrad, R. (2007). Identification of acetate-utilizing Bacteria and Archaea in methanogenic profundal sediments of Lake Kinneret (Israel) by stable isotope probing of rRNA. *Environmental Microbiology*, 9(1), 223-237. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01133.x>
- Shade, A., Read, J. S., Welkie, D. G., Kratz, T. K., Wu, C. H., & McMahon, K. D. (2011). Resistance, resilience and recovery: Aquatic bacterial dynamics after water column disturbance: Bacterial community recovery after lake mixing. *Environmental Microbiology*, 13(10), 2752-2767. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02546.x>
- Shi, L., Huang, Y., Zhang, M., Yu, Y., Lu, Y., & Kong, F. (2017). Bacterial community dynamics and functional variation during the long-term decomposition of cyanobacterial blooms in-vitro. *Science of The Total Environment*, 598, 77-86. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.115>
- Spatharis, S., Roelke, D. L., Dimitrakopoulos, P. G., & Kokkoris, G. D. (2011). Analyzing the (mis)behavior of Shannon index in eutrophication studies using field and simulated phytoplankton assemblages. *Ecological Indicators*, 11(2), 697-703. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2010.09.009>
- Stork, N. E., Samways, M. J., & Eeley, H. A. C. (1996). Inventorying and monitoring biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution*, 11(1), 39-40. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(96\)81070-6](https://doi.org/10.1016/0169-5347(96)81070-6)
- Sun, M. Y., Dafforn, K. A., Brown, M. V., & Johnston, E. L. (2012). Bacterial communities are sensitive indicators of contaminant stress. *Marine Pollution Bulletin*, 64(5), 1029-1038. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.01.035>
- ter Braak, C. J. F., & Verdonschot, P. F. M. (1995). Canonical correspondence analysis and related multivariate methods in aquatic ecology. *Aquatic Sciences*, 57(3), 255-289. <https://doi.org/10.1007/BF00877430>
- Thorton, K. W., Kennedy, R. H., Carroll, J. H., Walker, W. W., Gunkel, & Ashby, S. (1981). Reservoir sedimentation and water quality—An heuristic model. In Proceedings of the symposium on surface water impoundments. *American Society of Civil Engineers, Minneapolis*, 654-661.
- Trevors, J. T. (2011). Viable but non-culturable (VBNC) bacteria: Gene expression in planktonic and biofilm cells. *Journal of Microbiological Methods*, 86(2), 266-273. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.04.018>

- Uruguay. (1979, enero 31). Decreto N° 253/979: aprobación de normativa para prevenir la contaminación ambiental, a través del control de las aguas. <https://www.impo.com.uy/bases/decretos/253-1979>
- Valderrama, J. C. (1981). *The simultaneous analysis of total nitrogen and total phosphorus in natural waters*. 10, 109-122.
- Wang, C., Zhang, H., Liu, P., Wang, Y., Sun, Y., Song, Z., & Hu, X. (2021a). Divergent Patterns of Bacterial Community Structure and Function in Response to Estuarine Output in the Middle of the Bohai Sea. *Frontiers in Microbiology*, 12, 630741. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.630741>
- Wang, H., Xu, C., Liu, Y., Jeppesen, E., Svenning, J. C., Wu, J., ... & Xie, P. (2021b). From unusual suspect to serial killer: Cyanotoxins boosted by climate change may jeopardize megafauna. *The Innovation*, 2(2).
- Wang, J., Pan, F., Soininen, J., Heino, J., & Shen, J. (2016). Nutrient enrichment modifies temperature-biodiversity relationships in large-scale field experiments. *Nature Communications*, 7(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/ncomms13960>
- Wang, Y., Guo, M., Li, X., Liu, G., Hua, Y., Zhao, J., Huguet, A., & Li, S. (2022a). Shifts in microbial communities in shallow lakes depending on trophic states: Feasibility as an evaluation index for eutrophication. *Ecological Indicators*, 136, 108691. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.108691>
- Wang, Y., Li, X., Chi, Y., Song, W., Yan, Q., & Huang, J. (2022b). Changes of the Freshwater Microbial Community Structure and Assembly Processes during Different Sample Storage Conditions. *Microorganisms*, 10(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061176>
- Wemheuer, B., Wemheuer, F., Hollensteiner, J., Meyer, F.-D., Voget, S., & Daniel, R. (2015). The green impact: Bacterioplankton response toward a phytoplankton spring bloom in the southern North Sea assessed by comparative metagenomic and metatranscriptomic approaches. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.00805>
- Wetzel, Robert. G. (2001). *Limnology: Lake and River Ecosystems*. Gulf Professional Publishing,. <https://shop.elsevier.com/books/wetzels-limnology/jones/978-0-12-822701-5>
- Woodhouse, J. N., Kinsela, A. S., Collins, R. N., Bowling, L. C., Honeyman, G. L., Holliday, J. K., & Neilan, B. A. (2016). Microbial communities reflect temporal changes in cyanobacterial composition in a shallow ephemeral freshwater lake. *The ISME Journal*, 10(6), Article 6. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.218>
- Wu, T., Liu, G., Han, S., Zhou, Q., & Tang, W. (2015). [Impacts of algal blooms accumulation on physiological ecology of water hyacinth]. *Huan Jing Ke Xue= Huanjing Kexue*, 36(1), 114-120.

Yang, Y., Chen, J., Tong, T., Xie, S., & Liu, Y. (2020). Influences of eutrophication on methanogenesis pathways and methanogenic microbial community structures in freshwater lakes. *Environmental Pollution*, 260, 114106. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114106>

Zabaleta, B., Aubriot, L., Olano, H., & Achkar, M. (2023). Satellite assessment of eutrophication hot spots and algal blooms in small and medium-sized productive reservoirs in Uruguay's main drinking water basin. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(15), 43604-43618. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-25334-9>

Zani, S., Mellon, M. T., Collier, J. L., & Zehr, J. P. (2000). Expression of nifH Genes in Natural Microbial Assemblages in Lake George, New York, Detected by Reverse Transcriptase PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7), 3119-3124.

Zhang, J., Ding, X., Guan, R., Zhu, C., Xu, C., Zhu, B., Zhang, H., Xiong, Z., Xue, Y., Tu, J., & Lu, Z. (2018). Evaluation of different 16S rRNA gene V regions for exploring bacterial diversity in a eutrophic freshwater lake. *Science of The Total Environment*, 618, 1254-1267. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.228>

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. *The ISME Journal*, 5(8), 1303-1313. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.11>