

# Floraciones tóxicas del complejo *Microcystis aeruginosa* en la costa uruguaya: caracterización, distribución de ecotipos y sensoramiento remoto



Foto de portada: Floración de CMA en Piriápolis, imagen tomada por Marcelo Umpierrez en verano del 2019.

**Lic. Facundo Lepillanca**

Programa de posgrado PEDECIBA, área Biología, sub-área Microbiología.

Montevideo – Uruguay

Diciembre – 2024



# Floraciones tóxicas del complejo *Microcystis aeruginosa* en la costa uruguaya: caracterización, distribución de ecotipos y sensoramiento remoto

Licenciado Facundo Lepillanca

Tesis de Maestría presentada al programa de Posgrado PEDECIBA, área Biología, subárea Microbiología, Universidad de la República.

Tesis realizada en el Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones Clemente Estable y el Centro Universitario Regional Este (CURE) sede Rocha.

## **Orientadora de Tesis**

Dra. Claudia Piccini

Laboratorio de Ecología Microbiana Acuática

Departamento de Microbiología

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Ministerio de Educación y Cultura

## **Co-orientadora de Tesis**

Dra. Carla Kruk

Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales. Facultad de Ciencias, Universidad de la República

Departamento de Modelación Estadística de Datos e Inteligencia Artificial, Centro Universitario Regional Este (CURE), sede Rocha

Universidad de la República

## **Tribunal:**

### **Dr. Matias Arim.**

Departamento de Ecología y Gestión Ambiental del Centro Universitario Regional del Este (CURE) de la Universidad de la República.

### **Dra. Paula Huber.**

Universidad Federal de São Carlos (UFSCar, Brasil) e Instituto Nacional de Limnología (INALI, Argentina).

### **Dra. Inessa Lacativa.**

Universidad Federal de São Carlos (UFSCar, Brasil), Departamento de Botânica.

## RESUMEN

Las floraciones de cianobacterias son un problema socioambiental mundial y nacional. El aumento de estos eventos se ve favorecido por actividades antrópicas, principalmente prácticas agroindustriales que implican el uso intensivo de fertilizantes y pesticidas, lo que promueve la eutrofización de los ecosistemas acuáticos cuya expresión más negativa son las floraciones. Algunas especies de cianobacterias tienen la capacidad de producir sustancias que son tóxicas para animales y personas, conocidas como 'cianotoxinas'. Entre las cianotoxinas más frecuentemente detectadas a nivel mundial se encuentran las microcistinas, comúnmente producidas por organismos del complejo *Microcystis aeruginosa* (CMA). En Uruguay, esta problemática tiene al menos 20 años, afectando la conservación de los ecosistemas acuáticos y la calidad de su agua. Una de las estrategias ecológicas y evolutivas planteadas por nuestro grupo de investigación como responsable del éxito del CMA en diversos ecosistemas acuáticos es su diversificación en ecotipos. Los ecotipos son poblaciones pertenecientes a una especie que están adaptadas a condiciones ambientales particulares, asegurando el éxito de esa especie en diversas situaciones. Entre las interrogantes que surgen cuando ocurre una floración del CMA de grandes dimensiones y duración, como la ocurrida en verano de 2019, una es relativa a su origen (autóctono vs. alóctono) y otra a la posibilidad de predecir la aparición y toxicidad de las floraciones de manera temprana, rápida y sensible. Con el objetivo de conocer las principales contribuciones alóctonas y autóctonas del CMA en la generación de floraciones en las costas del río Uruguay y del Río de la Plata, en esta tesis se analizó la distribución de ecotipos de CMA productores de microcistinas en distintos escenarios de precipitaciones. Para ello, se realizaron muestreos en diversos ecosistemas acuáticos y abarcando diferentes años para evaluar la presencia de los distintos ecotipos tóxicos del CMA mediante la técnica de genotipado por qPCR y HRMA desarrollada por nuestro grupo. Una vez obtenidos los genotipos, se evaluó su presencia bajo distintas condiciones de precipitación. Los resultados mostraron que el aumento de caudal en los ríos (río Uruguay y río Negro) debido a valores altos de precipitación facilita la distribución de ecotipos del CMA hacia el estuario, constituyendo lo que llamamos floraciones de origen alóctono. Por otro lado, en condiciones de precipitación con valores normales o bajos predominan las floraciones autóctonas, es decir de ecotipos adaptados a las características locales de cada sitio. Asimismo, se ensayó un método de detección remota y cuantificación de organismos tóxicos del CMA empleando fotografías tomadas con un teléfono inteligente y la aplicación *HydroColor*. Se generaron modelos estadísticos (modelos lineales: LM) para explicar la abundancia de células tóxicas (determinada por qPCR del gen *mcyE*), empleando los valores de reflectancia de la luz y variables ambientales. Los modelos LM explicaron 42% - 48% de la varianza, demostrando que la relación de reflectancia  $Rrs(\text{rojo})/Rrs(\text{verde})$  constituye un buen predictor de la toxicidad. Los resultados obtenidos con esta herramienta son promisorios, constituyendo un método de monitoreo económico y fácil de aplicar, favoreciendo el monitoreo ciudadano y remoto continuo basado en imágenes. En suma, esta tesis contribuye a entender la distribución de ecotipos del CMA en sistemas acuáticos importantes para Uruguay bajo diferentes contextos meteorológicos e hidrológicos, mejorando la comprensión de la ecología de estos organismos y aportando a la detección y predicción de su presencia y abundancia en escenarios futuros de cambio climático.

## Abstract

Cyanobacterial blooms are a global and national socio-environmental problem. The increase in these events is favored by anthropogenic activities, mainly agro-industrial practices that involve the intensive use of fertilizers and pesticides, which promote the eutrophication of aquatic ecosystems, with the most negative expression being blooms. Some species of cyanobacteria have the ability to produce substances that are toxic to animals and humans, known as 'cyanotoxins.' Among the most frequently detected cyanotoxins worldwide are microcystins, commonly produced by organisms of the *Microcystis aeruginosa* complex (MAC). In Uruguay, this issue has been present for at least 20 years, affecting the conservation of aquatic ecosystems and the quality of their water. One of the ecological and evolutionary strategies proposed by our research group as responsible for the success of MAC in various aquatic ecosystems is its diversification into ecotypes. Ecotypes are populations belonging to a species that are adapted to particular environmental conditions, ensuring the success of that species in various situations. Among the questions that arise when a large-scale and long-lasting MAC bloom occurs, such as the one that happened in the summer of 2019, one concerns its origin (native vs. non-native), and another concerns the possibility of predicting the appearance and toxicity of blooms in a timely, rapid, and sensitive manner. To understand the main non-native and native contributions of MAC in generating blooms on the coasts of the Uruguay River and the Río de la Plata, this thesis analyzed the distribution of microcystin-producing MAC ecotypes under different precipitation scenarios. To do this, sampling was conducted in various aquatic ecosystems over different years to assess the presence of the different toxic MAC ecotypes using the qPCR and HRMA genotyping technique developed by our group. Once the genotypes were obtained, their presence was evaluated under different precipitation conditions. The results showed that the increased flow in the rivers (Uruguay River and Negro River) due to high precipitation levels facilitates the distribution of MAC ecotypes towards the estuary, constituting what we call non-native origin blooms. On the other hand, under normal or low precipitation conditions, native blooms predominate, meaning ecotypes adapted to the local characteristics of each site. Furthermore, a remote detection and quantification method for toxic MAC organisms was tested using photographs taken with a smartphone and the *HydroColor* application. Statistical models (linear models: LM) were generated to explain the abundance of toxic cells (determined by qPCR of the *mcyE* gene), using light reflectance values and environmental variables. The LM models explained 42% - 48% of the variance, demonstrating that the reflectance ratio  $Rrs(\text{red})/Rrs(\text{green})$  is a good predictor of toxicity. The results obtained with this tool are promising, constituting an economical and easy-to-apply monitoring method, favoring continuous citizen and remote monitoring based on images. In summary, this thesis contributes to understanding the distribution of MAC ecotypes in aquatic systems important to Uruguay under different meteorological and hydrological contexts, improving the understanding of the ecology of these organisms and contributing to the detection and prediction of their presence and abundance in future climate change scenarios.



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mis tutoras, Claudia Piccini y Carla Kruk por su orientación, paciencia y dedicación a lo largo de todo este proceso. Sus conocimientos y consejos han sido fundamentales para dar forma y enriquecer este trabajo.

Quiero agradecer a Paula Huber, Matías Arim e Inessa Lacativa por tomarse el tiempo de evaluar este trabajo y por sus aportes tan valiosos. Sus comentarios y sugerencias me ayudaron a mejorar este trabajo. De verdad, gracias por el compromiso.

A todos mis compañero/as y amigos del Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, en especial al grupo EMA: Lucía, Carolina, Paula, Gabriela, Florencia.

A mis compañeros del grupo del Departamento de Seguimiento de Componentes del Ambiente - Ministerio de Ambiente: Magdalena Hill, Carolina Ferrer, Natalie Corrales, Lucía Gómez, Belén Ocampo, Mathias Toledo, Mario Acosta y Javier Martínez.

A mis amigos más cercanos Hernán Juan, Romina Echagë, Natali Baz, Lucia Leites, Mathias Toledo, Lucia Gómez, Bruno Pannunzio, Alejandra Borba, Sebastián Andreoli, Mauro Martínez, Camila Ruiz, Inés Etchelet, me considero afortunado por haberlos conocido.

A mi madre, a mi hermana y mi sobrina que siempre estuvieron presente apoyándome en todo lo que necesite. También quería agradecerles a Angela, Hugo y Matías por el apoyo incondicional en todo este proceso. Agradezco a mi pareja Florencia no solo por el apoyo, sino por ser parte de este proceso, corrigiéndome la gramática, mejorando los párrafos y haciéndome el aguante en todo momento.

En especial me gustaría agradecer a mis abuelos, quienes no se encuentran físicamente conmigo, pero cuyos consejos y enseñanzas me continúan inspirando todos los días. Aunque no puedan estar aquí presenciando un logro más en mi vida, sé que estarían orgullosos. Este trabajo está dedicado a su memoria, en agradecimiento por todo lo que hicieron por mí.

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN GENERAL .....	7
1.1. Generalidades de cianobacterias.....	7
1.2. Floraciones de cianobacterias .....	8
1.3. Complejo <i>Microcystis aeruginosa</i> (CMA) .....	10
1.3.1 Ecología del CMA .....	10
1.3.2 Biosíntesis de microcistinas .....	12
1.4. Métodos de detección de CMA y cianotoxinas.....	13
1.5. Floraciones del CMA en el río Uruguay y Río de la Plata .....	14
1.6. Área de estudio.....	17
1.6.1. Río Uruguay .....	17
1.6.2. Río Negro .....	18
1.6.3. Río de la Plata .....	18
Capítulo I: Aportes alóctonos y autóctonos del CMA a las costas del estuario del Río de la Plata .....	20
2. INTRODUCCIÓN.....	20
2.1. HIPÓTESIS .....	24
2.2. OBJETIVO GENERAL.....	24
2.3. OBJETIVO ESPECIFICOS .....	24
2.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
2.4.1. Estrategia de investigación .....	25
2.4.2. Muestras de agua .....	25
2.4.3. Extracción de ADN.....	26
2.4.4. <i>High Resolution Melting Analysis</i> (HRMA) de amplicones de <i>mcyJ</i> .....	26
2.4.5. Análisis de datos.....	27
2.5. RESULTADOS .....	28
2.5.1. Ecotipos de CMA tóxicos: comparación entre los ecotipos teóricos predichos, modelo y observados .....	28
2.5.2. Distribución de ecotipos de CMA en diferentes condiciones de precipitaciones	32
2.6. DISCUSIÓN .....	35
2.7. CONSIDERACIONES FINALES .....	36
2.8. PERSPECTIVAS .....	37
Capítulo II: Sensoramiento remoto de células tóxicas del complejo <i>Microcystis aeruginosa</i>	38
2. INTRODUCCIÓN .....	38
3.1. Propiedades ópticas .....	38

3.1.1.	Sensoramiento remoto aplicado a calidad de agua.....	39
3.1.2.	Antecedentes .....	40
3.2.	HIPÓTESIS.....	41
3.3.	OBJETIVO GENERAL .....	41
3.3.1.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
3.4.	METODOLOGÍA .....	42
3.4.1.	Estrategia de investigación .....	42
3.4.2.	Muestras.....	42
3.4.3.	qPCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) .....	43
3.4.4.	Análisis de datos y modelos utilizados .....	44
3.5.	RESULTADOS .....	46
3.5.1.	Caracterización ambiental.....	46
3.5.3.	Caracterización biológica .....	48
3.5.4.	Modelos de predicción de células tóxicas de CMA en diferentes ecosistemas acuáticos de Uruguay .....	48
3.5.	DISCUSIÓN.....	51
3.6.	CONSIDERACIONES FINALES .....	53
3.7.	PERSPECTIVAS .....	53
	BIBLIOGRAFÍA.....	54
	ANEXOS.....	68
	I – BUFFER DE EXTRACCIÓN.....	68
	II – VARIABLES AMBIENTALES.....	69
	III - PROTOCOLO DE USO HYDROCOLOR.....	72

## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

### 1.1. Generalidades de cianobacterias

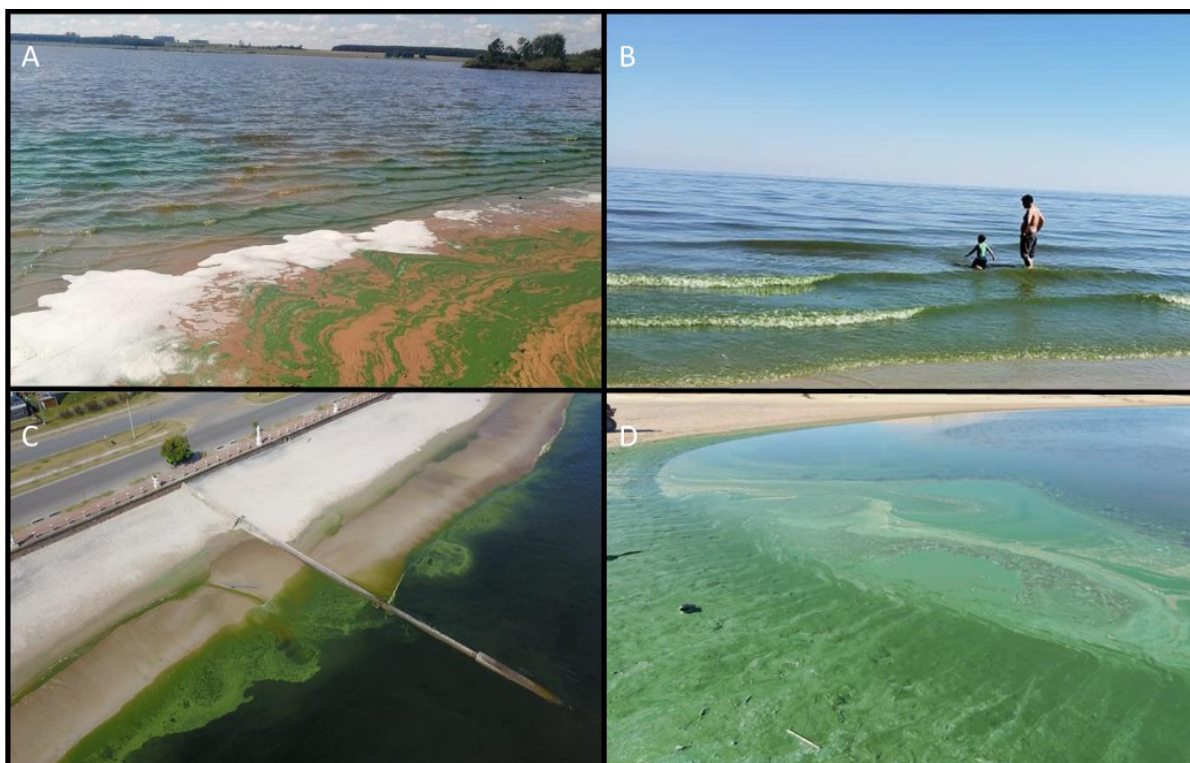
Las cianobacterias son microorganismos procariotas que realizan fotosíntesis oxigénica. Los registros fósiles de cianobacterias se remontan a hace aproximadamente 3500 millones de años y fueron los organismos responsables del aumento inicial de oxígeno atmosférico en la tierra hace 2300 millones de años, permitiendo la evolución de la vida tal como la conocemos (Kasting & Siefert, 2002; Whitton, 2012). Las cianobacterias se encuentran en diversidad de ecosistemas siendo especialmente importantes en ecosistemas acuáticos, como aguas continentales, estuarinas y oceánicas, habitando tanto el bentos como la columna de agua (Bonilla, 2009; Kruk et al., 2015; Whitton & Potts, 2007). Las cianobacterias son un grupo filogenéticamente y fisiológicamente muy diverso que presenta diferentes niveles de organización: unicelulares, coloniales, filamentosas y ramificadas (Saker et al., 2009). Aquellas que habitan en la columna de agua son parte del fitoplancton y juegan un rol muy importante en la producción primaria pelágica (Reynolds, 1984). En general, las células se encuentran rodeadas de una vaina de sustancias mucilaginosas que les proporcionan un ambiente protegido y una forma de relacionamiento con otros organismos. Las especies que viven en la columna de agua pueden presentar aerótopos (conjuntos de vacuolas de gas) que les permiten regular su posición y evitar así la sedimentación fuera de la zona eufótica (Visser et al., 2005). Algunas especies tienen la capacidad de secuestrar y almacenar fósforo internamente, pudiendo sobrevivir en condiciones de baja disponibilidad de fósforo (Saxton et al., 2012). Por otro lado, algunas especies filamentosas pueden presentar células especializadas en la fijación de nitrógeno atmosférico (heterocitos) por medio de la enzima nitrogenasa, permitiéndoles sobrevivir en ambientes pobres de este nutriente (Hoek et al., 1995). Asimismo, existen especies de cianobacterias sin estas células especializadas que son capaces de fijar nitrógeno (Lubus, Polerecky et al., 2021; Sandth, Xu and Bergman, 2012). Varias especies pueden presentar células de resistencia denominadas acinetes que les permiten permanecer durante largo tiempo en el sedimento y desarrollarse cuando las condiciones ambientales se vuelven favorables (Adams et al., 1981; Kaplan-Levy et al., 2010). Algunas especies de cianobacterias se encuentran en sitios de condiciones extremas como aguas termales a más de 60°C (Ward et al., 1994), en desiertos, habitando en penumbras de cavernas (Whitton & Potts, 2007), lagos hipersalinos o formando gruesas matas bentónicas en lagos de regiones polares (Bonilla, 2009; Vincent, 2002). En la actualidad las cianobacterias son ubicuas, siendo uno de los organismos más prevalentes en la tierra con estimaciones de biomasa global de más de mil millones de toneladas métricas de biomasa húmeda (Garcia-Pichel et al., 2019).



## 1.2. Floraciones de cianobacterias

Las floraciones son eventos donde se da un crecimiento abrupto y masivo de una o varias especies de cianobacterias, bajo condiciones ambientales de altas concentraciones de nutrientes, aguas calmas y temperaturas mayores de 10°C, aumentando notoriamente su biomasa (Paerl & Huisman, 2008; Reynolds, 1984; Vidal & Britos, 2012). En las últimas décadas el incremento de las actividades humanas como la agricultura, el tratamiento inadecuado de aguas residuales domésticas e industriales, la construcción de embalses para producción hidroeléctrica y riego, la destrucción de los paisajes y formaciones vegetales naturales, la extracción minera y el cambio climático, entre otros procesos, han favorecido el desarrollo de las floraciones de cianobacterias principalmente a través de la eutrofización de los ecosistemas acuáticos continentales (Burkholder et al., 2022; Che & Wan, 2022). En Uruguay, la eutrofización, asociada principalmente a la agricultura intensiva junto con la construcción de embalses, son los principales procesos que favorecen el desarrollo de floraciones de cianobacterias (Chalar, 2009; De Leon & Yunes, 2001; Mazzeo et al., 2002; Rodríguez-Gallego, 2011).

Las floraciones se producen en periodos de pocas horas a varios días, y pueden desaparecer en el mismo periodo de tiempo o semanas, meses e incluso algunas floraciones pueden permanecer todo el año (Kruk et al., 2002; Scasso et al., 2001). Se define una floración como un aumento en la abundancia de cianobacterias con densidades mayores a valores estandarizados, como por ejemplo  $2 \times 10^4$  células/ml (Oliver & Ganf, 2000). Las floraciones tienen un gran impacto sobre los ecosistemas acuáticos, ya que alteran el ciclado de los nutrientes, disminuyen la disponibilidad de luz y oxígeno, y causan una disminución de la biodiversidad y deterioro de la calidad del agua, siendo la expresión más negativa la producción de toxinas (Havens, 2008; Karjalainen et al., 2007). En nuestro país los primeros registros de floraciones de cianobacterias tóxicas fueron reportados en 1982 y desde entonces estos eventos son frecuentes en una gran diversidad de ecosistemas acuáticos (Figura 1) (Bonilla & Conde, 2000; Kruk et al., 2003; Kruk et al., 2019; Kruk & De León, 2002; Pérez et al., 1999, 1999; Vidal & Kruk, 2008).



**Figura 1.** Floraciones de CMA en diferentes sistemas acuáticos de Uruguay en 2019. (A) Embalse de Baygorria (Foto tomada por Facundo Lepillanca), (B) playa Real de San Carlos (Foto tomada por Facundo Lepillanca), (C) Piriápolis (Foto tomada por Marcelo Umpierrez) (D) Barra de Valizas (Foto tomada por Carla Kurk).

La principal preocupación asociada a la presencia de cianobacterias y sus floraciones es debida a su capacidad de producir sustancias que resultan ser tóxicas para los animales y las personas (Chorus & Welker, 2021). Estas sustancias, conocidas como cianotoxinas. Las cianotoxinas dependiendo de sus estructuras químicas se pueden clasificar en péptidos cíclicos (microcistinas, nodularinas), alcaloides (cilindrospermopsina, saxitoxinas, anatoxina-a, homoanatoxina-a), lipopolisacáridos y presentar diferentes efectos en la salud animal (Tabla 1). La OMS en 2011 identificó a las floraciones de cianobacterias tóxicas como la principal amenaza de la calidad del agua (WHO, 2011). Algunos estudios sugieren que las cianotoxinas son metabolitos secundarios, otros sugieren que su producción podría estar acoplada a la división celular y por lo tanto son un metabolito esencial (Orr & Jones, 1998). Se ha descrito que determinadas condiciones ambientales, como mayores temperaturas, nutrientes y conductividad, influyen sobre la producción de cianotoxinas pero hasta el momento no hay consenso sobre las posibles combinaciones de variables ambientales que estimulan la producción de toxinas (O’Neil et al., 2012; Paerl & Huisman, 2009).

**Tabla 1.** Cianotoxinas y modo de acción en animales.

<b>Cianotoxina</b>	<b>Modo de acción</b>	<b>Referencias</b>
Microcistinas	Inhibidores de las proteínas eucariotas fosfatasa 1 (PP1) y 2A (PP2A) lo que lleva a la destrucción de las células hepáticas y pérdida de células de soporte. Promotores de tumores cancerígenos.	(Dias et al., 2009; Humpage, 2008; MacKintosh et al., 1990; Svirčev et al., 2009)
Nodularinas		
Cilindrospermopsina	Inhibe la síntesis proteica. Efecto predominantemente hepatotóxico. Produce severas lesiones necróticas en hígado, riñón, pulmón, bazo e intestino de mamíferos.	(Cox et al., 2005; Funari & Testai, 2008)
Saxitoxina	Bloquea los canales de sodio presentes en las membranas de las células nerviosas, impidiendo la conducción del impulso nervioso.	(Wang et al., 2003)
Anatoxina-a y Homoanatoxina-a	Bloquea los receptores nicotínicos y colinérgicos postsinápticos neuromusculares. Mimetizan la acción de la acetilcolina.	(Carmichael et al., 1990; Carmichael & Falconer, 1993; Cook et al., 1988)

### 1.3. Complejo *Microcystis aeruginosa* (CMA)

#### 1.3.1 Ecología del CMA

El género *Microcystis* incluye organismos que forman colonias compuestas por células con forma de coco inmersas en mucílago con una distribución relativamente homogénea (Komárek & Komárková, 2002). Estas cianobacterias tienen una amplia distribución (Harke et al., 2016; Paerl & Otten, 2013) ya que están presentes en regiones templadas frías a regiones tropicales (Li et al., 2016). Las especies de *Microcystis* pueden adaptarse a una gama amplia de intensidades de luz (Zhang et al., 2011; Ibelings et al., 1994) y tienen adaptaciones para tolerar cierto rango de radiación ultravioleta (Sommaruga et al., 2009). Además, las colonias pueden regular su flotabilidad mediante vesículas de gas intracelular contenidas en aerotopos (Walsby et al., 1997). La formación de colonias se debe a dos mecanismos: el primero involucra la división celular, donde las células al dividirse permanecen contenidas dentro del mucílago (Kessel & Eloff, 1975), y el segundo es la adhesión, en las que las células o colonias de distintos tamaños se agregan y mantienen unidas por el mucílago (Yang et al., 2006). La formación de colonias en *Microcystis* responde a su ciclo de vida (Reynolds et al., 1981) y se considera un determinante fundamental de su ecología, pueden reducir la presión por herbívora del zooplancton, crear microambientes para el ciclo de los nutrientes (Jiang et al., 2007), resistir turbulencias del agua provocadas por vientos ligeros a moderados como consecuencia de su flotabilidad (Walsby et al., 1995) y brindar protección contra metales pesados (Wu et al., 2007) y sustancias tóxicas (Li et al., 2013). En este sentido, las especies del género *Microcystis* se desarrollan en un rango similar de condiciones ambientales y comparten diversas características, incluyendo la formación de floraciones superficiales y la potencial producción de cianotoxinas (Kruk et al., 2010; Reynolds et al., 2002). Siendo su tamaño y la presencia y densidad de su mucílago características que varían con los gradientes ambientales (Sampognaro et al., 2020).

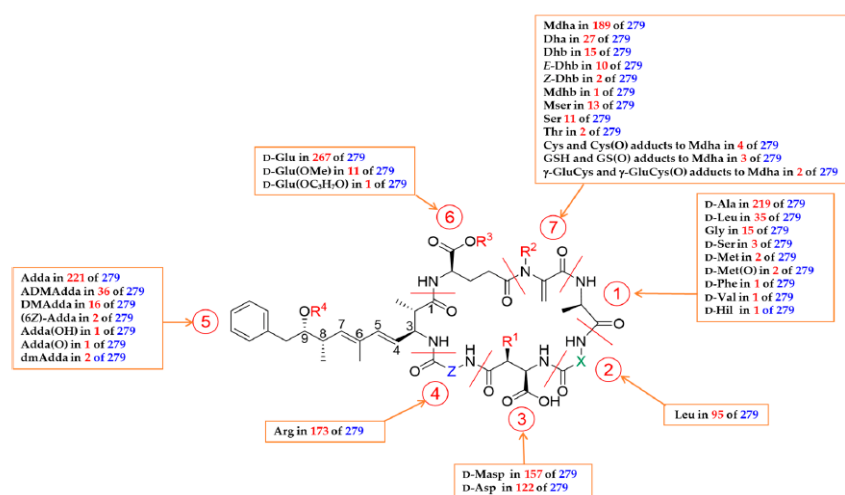
Dentro del género *Microcystis* existen varias especies que presentan diferencias en cuanto su morfología, denominadas también como “morfo-especies”, por ejemplo: *M. aeruginosa*, *M. botrys*, *M. firma*, *M. flos-aquae*, *M. ichthyoblabe*, *M. natans*, *M. novacekii*, *M. panniformis*, *M. smithii*, *M. viridis* y *M. wesenbergii* (Komárek & Komárková, 2002). Pérez-Carrascal et al. (2019) propusieron mediante estudios genómicos que la especie denominada *Microcystis aeruginosa* constituye un grupo parafilético, distribuido en diversos clados que muchas veces son confundidos morfológicamente con otras especies o distintos estados de crecimiento de las mismas (Reynolds et al., 1981). Por lo tanto, se define al complejo *Microcystis aeruginosa* (CMA), como aquel que comprende todas las especies del género *Microcystis* que se unificaron en base a las secuencias del operón ficocianina y al espaciador del transcripto intergénico (ITS) (Otsuka et al., 2001, 1999). Llegando a incorporar incluso a otros géneros (ej. *Sphaerocavum*) (Mituletu et al., 2013; Otsuka, Suda, Li, Watanabe, Oyaizu, Matsumoto, & Watanabe, 1999).

Las floraciones del CMA tienen un impacto significativo en el funcionamiento ecosistémico y en los usos del agua. Afectan su calidad para el consumo y la potabilización, disminuyen la transparencia e influyen indirectamente en la concentración de oxígeno. Además, generan olor y sabor desagradable, reducen la biodiversidad y afectan gran parte de los usos humanos de los ecosistemas acuáticos (Chorus, 2012; Bonilla, 2009; Huisman et al., 2005). La producción de cianotoxinas es la principal causante de la pérdida de calidad de agua a las cuáles las personas pueden exponerse por contacto en la piel, consumo directo o aspiración generando diversos problemas agudos y crónicos (Falconer, 1991; Fleming et al., 2002; Giannuzzi et al., 2011; Vidal et al., 2017). Las floraciones tóxicas también generan costos económicos debido a la necesidad de tratamientos de agua más estrictos, a la disminución de los ingresos por turismo y la limitación de los usos recreativos de los ecosistemas (Hamilton et al., 2014).

En nuestro país los primeros registros de floraciones del CMA fueron en el embalse de Salto Grande y el Río de la Plata (De Leon & Yunes, 2001; Quirós & Luchini, 1982). En la actualidad se siguen registrando floraciones del CMA en todas las estaciones del año en el embalse de Salto Grande (Bordet et al., 2017). Son también frecuentes en gran parte de los ecosistemas acuáticos de Uruguay incluyendo lagos someros (Bonilla et al., 1995), aguas continentales (Bonilla et al., 2021; Haakonsson et al., 2017; Kruk et al., 2017) y en el Río de la Plata (Aubriot et al., 2020; De Leon & Yunes, 2001; Kruk et al., 2019; Quirós & Luchini, 1982; Sienna & Ferrari, 2006). Kruk et al. (2015) detectaron la presencia de floraciones de especies de *Microcystis* en el río Uruguay tanto en verano como en invierno, sugiriendo que, dadas las elevadas concentraciones de nutrientes, la existencia de embalses y la ausencia de temperaturas suficientemente bajas para generar la muerte del CMA estos organismos son capaces de proliferar durante todo el año.

### 1.3.2 Biosíntesis de microcistinas

Las microcistinas son las toxinas más frecuentes en aguas continentales, pertenecen a una familia de más de 279 variantes de heptapéptidos cíclicos estables (Vesterkvist et al., 2012) (Figura 2). Las microcistinas son potentes inhibidores de las proteínas eucariotas fosfatasa 1 (PP1) y 2A (PP2A) lo que lleva a la destrucción de las células hepáticas y a la pérdida de células de soporte (MacKintosh et al., 1990). Las proteínas PP1 y PP2A presentes en células eucariotas, están implicadas en muchos procesos celulares como la división celular, la síntesis de proteínas, la señalización celular, la contracción muscular y el transporte de calcio (Wera & Hemmings, 1995).



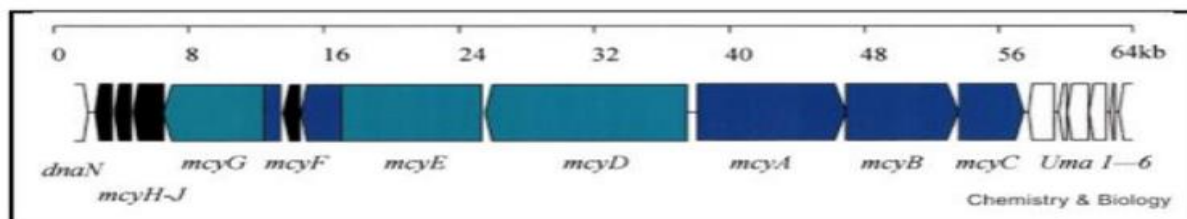
**Figura 2.** Estructura general de microcistinas y descripción general de su diversidad estructural observada (Bouaïcha et al., 2019).

Se ha descrito que en una floración del CMA conviven poblaciones tóxicas (células que contienen los genes vinculados con la producción de toxinas, *mcyA-Z*) y no tóxicas (células que no contienen los genes para la síntesis), siendo la presencia de los genes involucrados en la síntesis de microcistinas el determinante de su toxicidad (Rinta-Kanto et al., 2009). La biosíntesis de las microcistinas en el CMA es realizada por dos complejos enzimáticos, el complejo poliquétido sintasa (KPS) en conjunto con el complejo péptido sintetiza (NRPS) (Tillett et al., 2000) que están codificados en el *cluster mcy* que contiene de 9 a 10 genes (*mcyA-J*) dependiendo de la especie (Figura 3). Los genes del *cluster mcy* son empleados para detectar, diferenciar e identificar cianobacterias productoras de microcistinas mediante métodos moleculares (Martínez de la Escalera et al., 2017; Sipari et al., 2010). En este sentido, se han aplicado técnicas de qPCR para detectar los genes *mcyA*, *mcyB*, *mcyE* y *mcyJ* y cuantificar la presencia de cianobacterias productoras de microcistinas (Furukawa et al., 2006; Kim et al., 2010; Neilan et al., 1995; Rinta-Kanto & Wilhelm, 2006; Vaitomaa et al., 2003).

Para estudios de diversidad genética se propone utilizar el gen *mcyJ*. En base a evidencias que indican que no sufre recombinación (a diferencia de *mcyA, B, C*) y por lo tanto su secuencia presenta un mayor grado de conservación que los genes del *cluster mcy*. Estas características lo convierten en candidato para estudios



filogenéticos (Kim et al., 2010; Lepillanca et al., 2018; Martínez de la Escalera et al., 2022; Tanabe et al., 2009).



**Figura 3.** Cluster de microcistina de CMA, genes involucrados en la síntesis: *mcyA-J* (Tillet et al., 2000).

Se ha descrito que la producción de microcistinas está influida por factores tales como la concentración de nutrientes (Li et al., 2023) y la temperatura del agua (Cordeiro-Araújo et al., 2022; Godoy et al., 2023; Li et al., 2023). Otros estudios resaltan la importancia de la luz en la producción de microcistinas y la tasa de crecimiento de *Microcystis aeruginosa* (Cordeiro-Araújo et al., 2022; Dziallas & Grossart, 2011; Kaebernick et al., 2000; Li et al., 2023). Cabe mencionar que los estudios basados en cultivos generalmente usan cepas unicelulares las cuales no tienen el mismo desempeño ecológico que el CMA, debido a que es muy difícil mantener las colonias de CMA en experimentos de laboratorio (i.e. Kruk et al., 2017).

#### 1.4. Métodos de detección de CMA y cianotoxinas

Dentro de las metodologías más tradicionales para monitorear la presencia y abundancia de cianobacterias se encuentra la microscopía para el conteo de células y organismos, y las mediciones de clorofila-*a* como medida indirecta de su biomasa, esto cuando las cianobacterias representan una alta proporción del fitoplancton (Kruk et al., 2009). En las últimas décadas las tecnologías de sensoramiento remoto han tenido un gran avance para la investigación de calidad de agua, permitiendo estudiar la biomasa de cianobacterias a mayores escalas mediante la medición de los pigmentos de clorofila-*a* y ficocianina (Hu et al., 2010; Kutser, 2004; Matthews et al., 2012; Mishra et al., 2013; Shi et al., 2015). En este sentido, las floraciones de cianobacterias pueden ser detectadas y diferenciadas de otro tipo de organismos del fitoplancton por sus pigmentos como: la clorofila-*a* la cual está presente en todos los organismos fotosintetizadores (absorbe la luz en el rango de longitudes de ondas de 440 – 675 nm) y la ficocianina característica de cianobacterias (absorbe la luz en el rango de longitudes de ondas de 620 – 630 nm) (Brewin et al., 2015; Gons et al., 2008; Mishra & Mishra, 2014). Los métodos de detección remota desarrollados para la cuantificación de la biomasa de cianobacterias se basan en algoritmos que detectan las concentraciones de ambos pigmentos, permitiendo diferenciarlos de otros productores primarios (Kutser, 2004; Li et al., 2012; Mishra et al., 2013). El uso de satélites y otras plataformas aerotransportadas con sensores radiométricos demostraron resultados muy confiables en el campo de la teledetección de la calidad de agua para océanos y grandes cuerpos de agua desde hace décadas (van der

Meer, 2011). Estas metodologías tienen como problemática largos tiempos de revisión de una gran cantidad de imágenes satelitales, baja resolución espectral e incapacidad para acceder e interpretar fácilmente los datos, así como también que gran parte de las imágenes son descartadas por presencia de nubes (Yang et al., 2022). Además, no permiten estimar o predecir la producción de toxinas, una vez detectada la presencia de cianobacterias potencialmente tóxicas se deben aplicar otro tipo de ensayos para confirmar y/o cuantificar las concentraciones de cianotoxinas.

En cuanto a los métodos de detección de cianotoxinas, unas de las técnicas más utilizadas son el test de inhibición de la proteína-fosfatasa (PPI), ensayos inmunológicos (ELISA), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Las desventajas de éstos son la reactividad cruzada que puede ocurrir en los ensayos de ELISA y PPI, y en el caso de la HPLC la desventaja radica en que la detección y precisión depende del método utilizado (Bonilla et al., 2009). No obstante, la implementación de los métodos moleculares basados en la técnica de PCR presenta una ventaja frente a los anteriores ya que son rápidos, eficaces, extremadamente sensibles y específicos y permiten el análisis de varios productos a la vez. La PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) es una herramienta que permite realizar estudios de monitoreos cuantitativos de especies dentro de las floraciones de cianobacterias (Kruk et al., 2015; Rantala et al., 2006).

Por otro lado, la técnica de HRMA (*High Resolution Melting Analysis*) fue desarrollada para la detección de variantes en la secuencia de ADN, tiene aplicaciones en el campo de la medicina para el diagnóstico clínico (Vossen et al., 2009). También es utilizada para la detección de mutaciones y polimorfismos en poblaciones bacterianas (Hjelmsø et al., 2014; Hofinger et al., 2009; Thomsen et al., 2012; Zeyoudi et al., 2015). Por otro lado, se puede implementar para estudios de diversidad genética en poblaciones de CMA (Lepillanca et al., 2018; Manali et al., 2017; Martínez de la Escalera et al., 2022). Esta técnica se basa en la realización de qPCR y una posterior desnaturalización a alta resolución (variando la temperatura 0,1 °C) que produce un perfil característico de *melting*. Las curvas de *melting* varían dependiendo del contenido G-C, longitud y secuencia del fragmento amplificado.

### **1.5. Floraciones del CMA en el río Uruguay y Río de la Plata**

Las floraciones de cianobacterias son favorecidas por las actividades antrópicas, principalmente las agroindustriales que incorporan desde hace décadas el uso intensivo de fertilizantes y plaguicidas, las cuales facilitan la eutrofización de los ecosistemas acuáticos (Kruk et al., 2023). Asimismo, las construcciones de represas favorecen las floraciones de cianobacterias, debido a que aumentan el tiempo de residencia del agua (Massey et al., 2022; Paerl & Huisman, 2009), que en combinación con las altas temperaturas promueven el rápido crecimiento y acumulación de estos organismos y la estimulación de su producción de toxinas (Martínez de la Escalera et al., 2017; Massey et al., 2022). En Uruguay la

problemática de las floraciones de cianobacterias tóxicas del CMA tiene ya al menos 20 años de historia. Estas vienen afectando la conservación de los ecosistemas y su calidad de agua para diversos usos debido a los altos valores de producción de microcistinas, llegando desde los embalses y lagos, incluso hasta el océano atlántico, los ríos y sus playas (Aubriot et al., 2020; Kruk et al., 2019; Kruk et al., 2021).

En estudios anteriores de nuestro grupo de investigación, se comprobó que a lo largo del gradiente ambiental comprendido por el río Uruguay y el Río de la Plata existen poblaciones de organismos del CMA con diferentes genotipos tóxicos identificados de acuerdo a las variaciones en las secuencias nucleotídicas del gen *mcyJ* (Martínez de la Escalera et al., 2022). En este contexto, se demostró que los genotipos corresponden a poblaciones adaptadas a distintas condiciones ambientales en cuanto a temperatura, salinidad y turbidez del agua, lo que evidencia la existencia de una gran diversidad dentro del complejo que sería crucial para el éxito y proliferación de estos organismos (Martínez de la Escalera et al., 2022).

Estas poblaciones corresponden a ecotipos, de acuerdo a la teoría desarrollada por Cohan (Cohan, 2002; Cohan & Perry, 2007; Ward et al., 1994). Esta teoría define a un ecotipo como un *clado* de microorganismos relacionados filogenéticamente, que comparten características ecológicas y que se pueden generar como resultado de una mutación o recombinación que cambia su ecología, permitiendo su utilización de un nuevo conjunto de recursos o su éxito en nuevas condiciones ambientales (Cohan, 2002). En este marco teórico, los ecotipos bacterianos corresponden a especies.

Para el CMA en el río Uruguay y Río de la Plata se identificaron seis ecotipos en base a las condiciones ambientales que favorecen su desarrollo (Martínez de la Escalera et al., 2022). De esta manera, se plantea que los ecotipos de CMA se encuentran adaptados a ambientes acuáticos bien definidos, por ejemplo, en ecosistemas de agua dulce (embalses y ríos) se encuentran los ecotipos B, C, F y lo mismo ocurre para los ecosistemas más salobres (estuario del Río de la Plata y costa oceánica) donde se observan los ecotipos A, D y E (Martínez de la Escalera et al., 2022).

### **Objetivo general de la tesis**

Analizar la distribución de distintos ecotipos de CMA productoras de microcistinas en las costas del río Uruguay y del Río de la Plata en distintos escenarios de precipitaciones con la meta de generar información, herramientas de monitoreo y modelos de predicción de floraciones tóxicas de estos organismos.

### **Estrategia de la investigación**

Para lograr el objetivo, se realizaron campañas de monitoreo en varios sitios del río Uruguay, río Negro y Río de la Plata en distintos momentos representativos de distintas situaciones hidrológicas, incorporando análisis genéticos de muestras de

agua, medidas de variables fisicoquímicas y meteorológicas, se tomaron medidas de reflectancia del agua en tres bandas del espectro (rojo, azul y verde). Los enfoques metodológicos para cada objetivo y sus capítulos de la tesis correspondiente se muestran en la Figura 4.

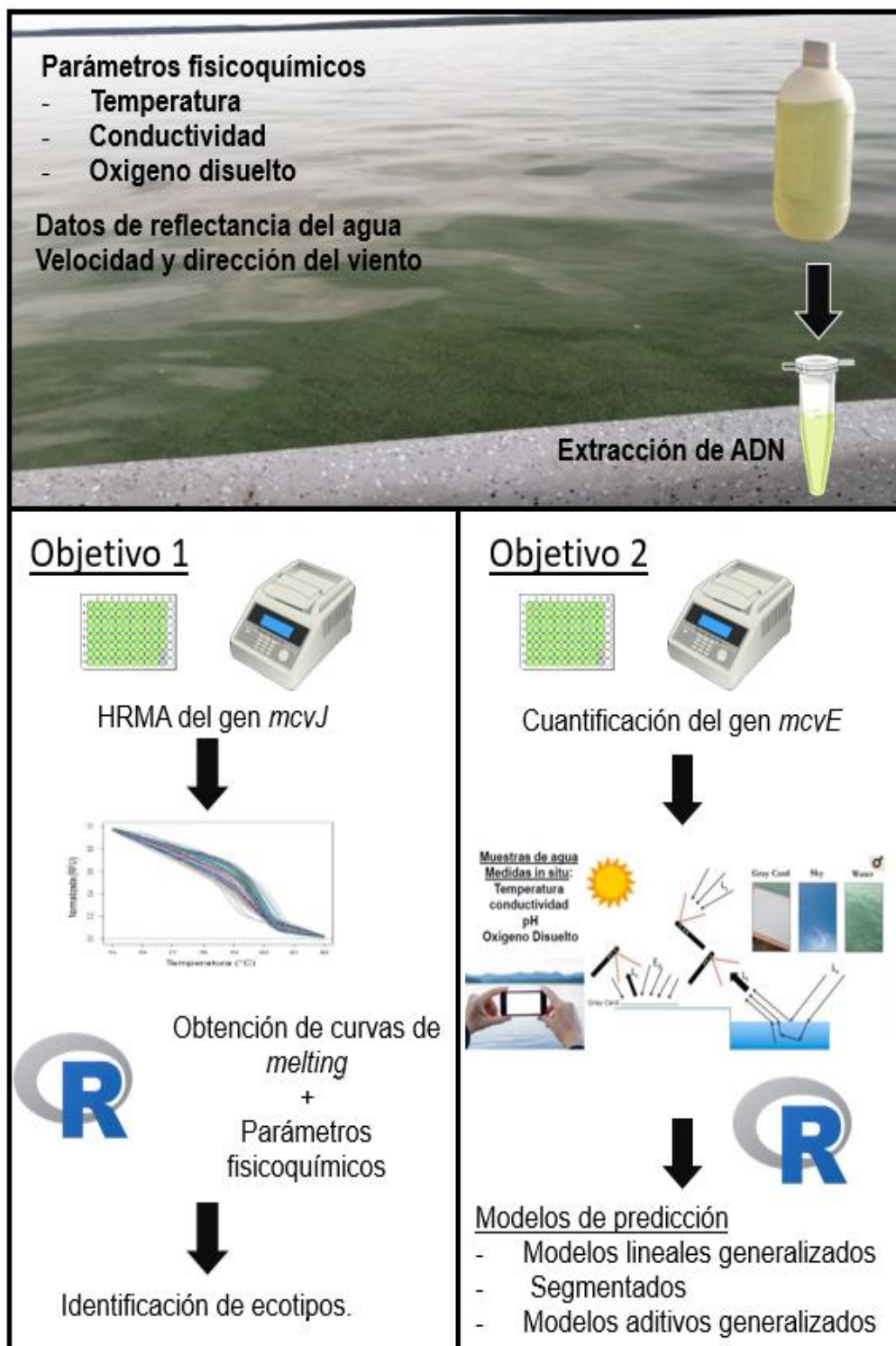


Figura 4. Técnicas empleadas en cada uno de los capítulos para lograr los objetivos planteados.

## 1.6. Área de estudio

La selección de los sitios de estudios se basó en los antecedentes de floraciones de CMA buscando seleccionar sitios con alta frecuencia de floraciones. Los sitios seleccionados fueron: embalses del río Negro (Rincón del Bonete, Baygorria y Palmar), río Uruguay (embalse de Salto Grande, Fray Bentos y Las Cañas) y el estuario del Río de la Plata (playas de Colonia, Ramírez y costa argentina) (Figura 5). Todos estos ecosistemas acuáticos forman parte de la Cuenca del Plata, que alimenta al Río de la Plata y descarga en el océano Atlántico. Esta es la segunda cuenca en extensión de América del Sur, luego de la del Amazonas, y abarca aproximadamente  $3.2 \times 10^6$  km<sup>2</sup> (Guerrero et al., 1997) incluyendo una diversidad de servicios, valores para conservación y recibiendo en ella diversos efluentes de actividades antrópicas que se desarrollan en el territorio de los 5 países que la integran (ej. Kruk et al., 2023)

### 1.6.1. Río Uruguay

El Río Uruguay (27°36'30"S 51°27'21"O) es uno de los ríos más caudalosos de América del sur y desemboca en el estuario del Río de la Plata. Los usos en su cuenca son diversos incluyendo la cría extensiva de ganado y el cultivo de soja, arroz y maíz, entre otros (O'farrell & Izaguirre, 2014; Kruk et al., 2023) A lo largo del río Uruguay se presentan más de 20 represas hidroeléctricas, una de ellas entre Argentina y Uruguay (Ferrari et al., 2011). La represa de Salto Grande se ubica en el Departamento de Salto (31°16'30"S, 57°56'19"O), fue creada para la generación de energía hidroeléctrica pero también es utilizado con fines domésticos, sanitarios, navegación y riego. Dentro del embalse se distinguen dos zonas, una central que abarca el 70% de la superficie total y otra que incluye cinco brazos laterales con distintas características (Quirós & Luchini, 1982). Se clasifica como un sistema eutrófico según la concentración media anual de fósforo total (Chalar et al., 1993). Luego del embalse, desde el departamento de Paysandú hasta el Departamento de Río Negro, el río Uruguay contiene en su cauce grandes sistemas de islas. Luego de la ciudad de Fray Bentos (Departamento de Río Negro), las islas desaparecen y el río se ensancha hasta su desembocadura. Es a esta altura que se encuentra una gran planta papelera desde hace ya 10 años. De acuerdo a estudios previos, las floraciones de CMA que se desarrollan en el embalse de Salto Grande, pueden ser transportadas aguas abajo a lo largo del río Uruguay llegando hasta el Río de la Plata e incluso la costa oceánica (Kruk et al., 2021; Martínez de la Escalera et al., 2022; Martínez de la Escalera et al., 2017). Es amplia la bibliografía donde se reportan floraciones de cianobacterias del CMA en todo este sistema (Chalar, 2009; Giannuzzi et al., 2011; Kruk et al., 2021; Martínez de la Escalera et al., 2022; Martínez de la Escalera et al., 2017; O'Farrell et al., 2012; O'farrell & Izaguirre, 2014).

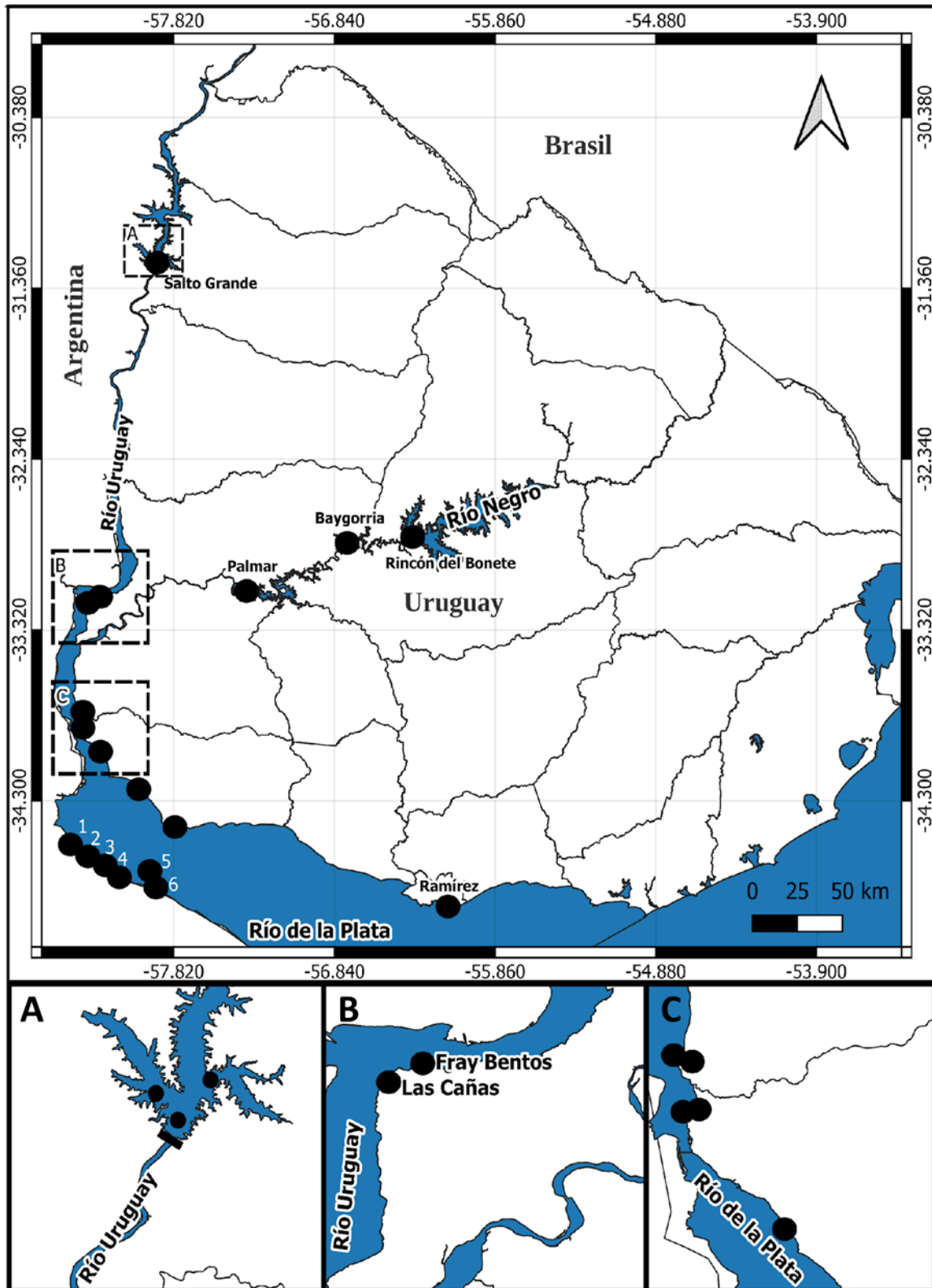


### 1.6.2. Río Negro

El río Negro ( $31^{\circ}20'54''\text{S } 53^{\circ}48'40''\text{O}$ ) nace en Brasil y atraviesa Uruguay de este a oeste, desembocando en el río Uruguay. Los principales usos de la cuenca del río Negro incluyendo la generación de energía hidroeléctrica, la ganadería extensiva, la agricultura, pesquería piscicultura (cría de esturiones – represa de Baygorria), forestación, extracción de áridos, y otros fines como recreacionales, pesca artesanal y deportiva (*Informe Calidad Ambiental del Río Negro, 2009 - 2017*, MVTOMA.). Hoy en día se ha instalado además una planta papelera. Sobre el río se destacan tres grandes represas: Rincón del Bonete, Baygorria y Palmar, las cuales generan el 38% de la energía hidroeléctrica del país. Por la concentración de nutrientes en el agua, se clasifican a los tres embalses como sistemas hipertróficos (Alonso et al., 2019; Cunha et al., 2013). En todos los embalses del río Negro y sus playas se registraron floraciones de cianobacterias tóxicas (Aubriot et al., 2020; Chalar et al., 2014; González-Piana et al., 2017, 2018).

### 1.6.3. Río de la Plata

El estuario del Río de la Plata ( $34^{\circ}52'59''\text{S } 56^{\circ}42'49''\text{O}$ ), es extenso y poco profundo, es el quinto más grande del mundo y drena la segunda cuenca más grande de América del Sur, sus principales afluentes son los ríos Paraná-Paraguay y Uruguay (Framiñan & Brown, 1996; Nagy et al., 1998). Presenta forma de embudo que se extiende por más de 280 km desde la cabecera (25 km de ancho) y hasta la desembocadura entre Punta del Este (Uruguay) y Cabo San Antonio (Argentina) (230 km de ancho), con una superficie aproximada de 38000 km<sup>2</sup>. El estuario se puede dividir en tres zonas, la zona superior interna, que corresponde aproximadamente al límite entre los departamentos de Colonia y San José. Luego le sigue la zona media caracterizada por un régimen fluvial y mareal que se extiende hasta el delta fluvio-mareal progresivo llamado la Barra del Indio (Nagy et al., 1998). Por último, la zona exterior que se extiende hasta la línea imaginaria que une Punta Rasa y Punta del Este, se caracteriza por tener agua de salinidad variable según la mareas, vientos y aportes de agua dulce de la cuenca (Boschi, 1988). El estuario del Río de la Plata se utiliza para diversos fines, como pesca, agua potable, actividades recreativas y de navegación. También recibe escorrentías agrícolas, descargas industriales y efluentes cloacales. A lo largo del estuario del Río de la Plata se registraron floraciones de cianobacterias tóxicas (Kruk et al., 2017, 2021, 2023; Aubriot et al., 2020; Bonilla et al., 2021; Martínez de la Escalera et al., 2017; Segura et al., 2017).



**Figura 5.** Mapa de Uruguay con los sitios evaluados en este trabajo. A: Embalses de Salto Grande: Salto Grande, Guleguaycito, Itapebí; B: Fray Bentos, Las Cañas (Río Negro); C: Playas de Colonia y Playa Ramírez (Montevideo).

## Capítulo I: Aportes remotos (alóctonos) y locales (autóctonos) del CMA a las costas del estuario del Río de la Plata

### 2. INTRODUCCIÓN

La cuenca del Plata es una de las más grandes del mundo ( $3.2 \times 10^6 \text{ km}^2$ ) y drena en el estuario del Río de la Plata y este descarga en el océano Atlántico (Guerrero et al., 1997). Su territorio incluye a cinco países y zonas con intensa producción agroindustrial asociada al uso elevado de fertilizantes y plaguicidas que aportan a la eutrofización de sus aguas y al desarrollo de floraciones de cianobacterias (García-Alonso et al., 2017; Kruk et al., 2023). Asimismo, esta cuenca ha registrado cambios en sus precipitaciones durante los últimos 50 años en dicha cuenca (Barros et al., 2015). Cambios en las lluvias y sumados a las modificaciones en el uso de suelo, en detrimento de la vegetación nativa, han determinado importantes cambios en los caudales de sus principales tributarios incluyendo el aumento de los caudales del río Uruguay (Barros et al., 2015). Asimismo, la cuenca cuenta con un gran número de embalses construidos (Achkar et al., 2015; Kruk et al., 2023), donde el agua con alta carga de nutrientes queda retenida favoreciendo el desarrollo y la acumulación de las floraciones de cianobacterias (Bordet et al., 2017; González-Piana et al., 2017; Kruk et al., 2015, 2021; Lepillanca et al., 2018; Martínez de la Escalera et al., 2017). En este contexto, los embalses y los cuerpos de agua que registran más floraciones en la cuenca del Plata, en particular en el área de influencia de la costa de Uruguay, son aquellos cuyas cuencas de drenaje incluyen una producción agrícola intensiva (Debastiani et al., 2016).

#### ***Floraciones en la cuenca baja del Plata***

Gran parte de los ecosistemas de la cuenca del Plata, como el río Uruguay, el Río de la Plata y el río Negro, presentan condiciones de elevada concentración de nutrientes y embalses con alto tiempo de residencia. En estos sistemas, dadas las altas concentraciones de nutrientes, la temperatura y la salinidad en el estuario, son los principales moduladores ambientales de la distribución, diversidad específica, biomasa, actividad celular y producción de toxinas del CMA (Martínez de la Escalera et al., 2017; Kruk et al., 2017; Kruk et al., 2015; Segura et al., 2017). Este es el caso de los embalses en los tributarios del Plata, como por ejemplo el río Uruguay (Salto Grande: Bordet et al., 2017), Río Negro (González-Piana et al., 2017) y río Paraná (Adloff et al., 2018). Las condiciones en las que se desarrollan estas floraciones han sido asociadas a condiciones de bajo caudal y altas temperaturas en el río Uruguay (Berón, 1990; Ferrari et al., 2011), mientras que en el Río de la Plata han sido asociadas a altas descargas del río Uruguay (cercas a  $10.000 \text{ m}^3/\text{s}$ ), provocando un descenso de la salinidad del agua y permitiendo la dispersión de CMA (Kruk et al., 2019; Kruk et al., 2021, 2023; Pérez et al., 2013). Asimismo, los cambios en la

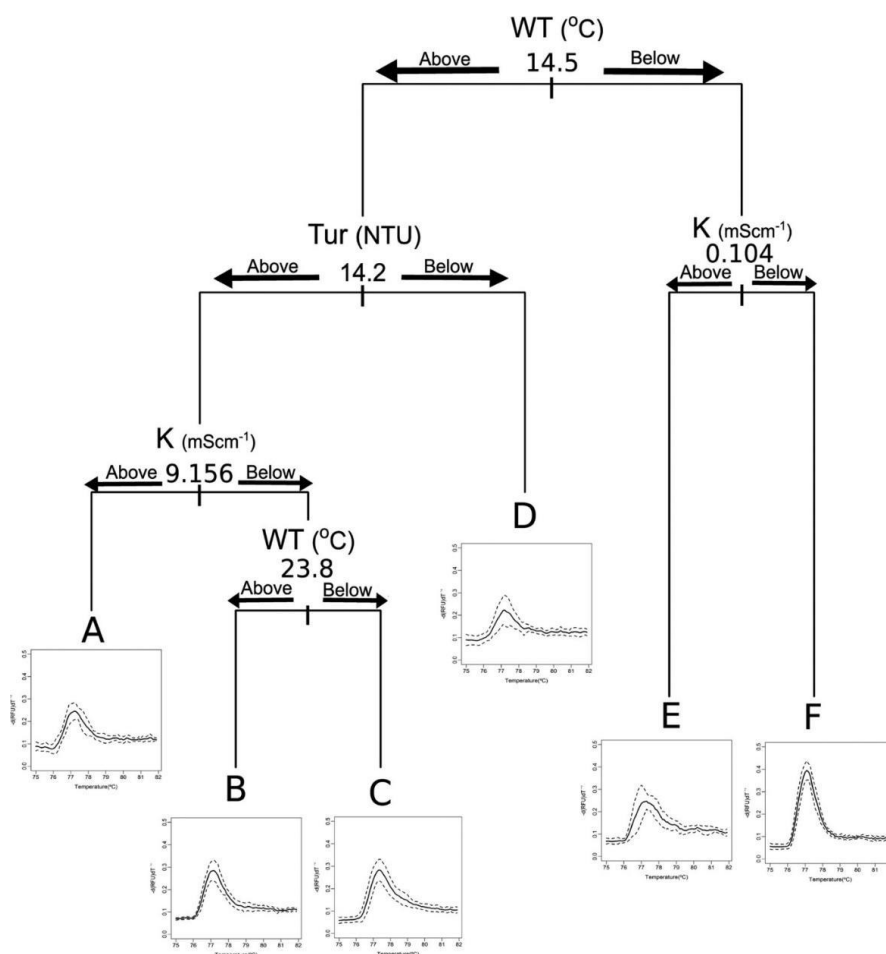
precipitación modifican el tiempo de residencia del agua y la distribución geográfica de las floraciones de cianobacterias (Kruk et al., 2021; Massey et al., 2022).

### ***Evento extremo 2019***

Durante el verano del año 2019 en nuestro país se registró una floración excepcional de CMA que abarcó más de 500 km de costa, desde Colonia hasta Rocha, con una duración de aproximadamente cuatro meses (Aubriot et al., 2020; Kruk et al., 2019; Kruk et al., 2021). La gran extensión de estas floraciones de organismos estuvo favorecida por precipitaciones extremas, en la cuenca baja del río Uruguay, promoviendo un alto flujo y descarga de agua dulce que llevó a estos organismos a la costa del Río de la Plata y costa oceánica (Kruk et al., 2021). Debido a la similitud entre los organismos del CMA presentes en la floración en las áreas afectadas se sugiere que esta se originó en los embalses ubicados tanto en el río Uruguay (Kruk et al., 2021) como en los embalses del río Negro (Aubriot et al., 2020).

### ***Ecotipos de CMA***

Estudios más recientes, muestran que a lo largo del gradiente ambiental comprendido por el río Uruguay y el Río de la Plata existen diferentes genotipos tóxicos de CMA identificados de acuerdo a las variaciones en las secuencias nucleotídicas del gen *mcyJ* (Martínez de la Escalera et al., 2022). Estas variaciones se asocian con ecotipos, definidos como un grupo de organismos del CMA estrechamente relacionados filogenéticamente que comparten las mismas preferencias ambientales. Martínez de la Escalera et al. (2022) utilizando un CART multivariado pudieron predecir los ecotipos favorecidos en distintas condiciones ambientales de acuerdo a valores de temperatura, conductividad (salinidad) y turbidez del agua (Figura 6, Tabla 2) (Martínez de la Escalera et al., 2022).



**Figura 6.** Modelo de ecotipos de CMA y variables ambientales asociados a estos (tomado de: Martínez de la Escalera et al., 2022). WT: temperatura del agua (°C), Tur: turbidez del agua (NTU) y K: conductividad del agua (mS cm<sup>-1</sup>).

**Tabla 2.** Descripción de nicho y rasgos principales de cada ecotipo de CMA tóxico. Valores medios y rangos de variables ambientales asociadas a cada ecotipo: temperatura (°C), conductividad (mS cm<sup>-1</sup>) y turbidez (NTU)

Ecotipo	Zonas	Temperatura (°C)	Conductividad (mS cm <sup>-1</sup> )	Turbidez (NTU)
A	Estuario medio y exterior	19.1 (14.8–22.9)	36.4 (18.2–52.0)	40.9 (15.4–89.6)
B	Embalses y ríos	27.2 (24.3–33.6)	0.041 (0.023–0.054)	28.5 (14.3–47.9)
C	Embalses y ríos	20.5 (15.6–23.4)	0.074 (0.033–0.113)	56.0 (19.9–127.0)
D	Estuario interno y medio	20.9 (16.1–25.9)	14.02 (0.048–52.7)	7.6 (BDL–14.2)
E	Estuario medio y exterior	11.9 (11.2–12.3)	29.13 (0.113–55.8)	20.8 (BDL–49.0)
F	Embalses y ríos	12.7 (11.0–14.2)	0.061 (0.036–0.095)	17.5 (0.9–42.2)



En este sentido, se demostró que existen distintas poblaciones de CMA adaptadas a distintas condiciones ambientales (ecotipos de CMA) en cuanto a temperatura, conductividad (salinidad) y turbidez del agua. Esta gran diversidad intraespecífica sería crucial para el éxito y proliferación de estos organismos en diferentes condiciones ambientales (Martínez de la Escalera et al., 2022). Este análisis se realizó durante condiciones heterogéneas del río Uruguay y Río de la Plata. Por lo cual, resulta fundamental estudiar la dinámica de estos organismos frente a diferentes condiciones de precipitaciones y distribución de las aguas, como resultó en el evento 2019.

Las condiciones locales de los ecosistemas acuáticos, especialmente los grandes ríos y los ecosistemas costeros, están fuertemente determinados por la variabilidad climática principalmente a través de sus efectos en la hidrología. Por ejemplo, el aumento de las precipitaciones y las lluvias extremas pueden llevar a caudales extremos y al movimiento del agua y sus componentes rápidamente largas distintas (Kruk et al., 2021) (Berri et al., 2002). En la región el evento de La Niña se caracteriza por déficits de lluvias y durante la fase neutra se registran los valores de precipitaciones esperables (Penalba & Rivera, 2016). Estas condiciones favorecen las floraciones autóctonas de CMA, mientras que durante El Niño se observan un aumento de las lluvias (Barreiro, 2010; García-Rodríguez et al., 2013), lo que llevaría a la dispersión de estos organismos incrementándose la importancia de los aportes de especies alóctonas en las floraciones.

## 2.1. HIPÓTESIS

Durante los fenómenos de La Niña y fase neutra se producen pocas precipitaciones y caudales, determinando esto bajas tasas de colonización de CMA por poblaciones alóctonas. Proliferan así las poblaciones con ecotipos adaptados a las condiciones ambientales locales, observándose floraciones autóctonas en embalses, ríos y en las diferentes porciones del estuario del Río de la Plata. Por otro lado, durante el fenómeno de El Niño, los caudales aumentan con las mayores lluvias, favoreciendo la dispersión de estos organismos en todo el gradiente ambiental, generando floraciones de origen alóctono que llegarían desde embalses y ríos hacia el estuario.

Para evaluar estos mecanismos, trabajaremos con floraciones representativas de escenarios de alta conectividad y dispersión asociados a lluvias en la cuenca y caudales altos en los ríos, versus floraciones en escenarios de bajas lluvias y caudales, con baja o moderada conectividad y baja o moderada dispersión, donde los procesos locales son los determinantes de la estructuración de las comunidades de CMA. En situaciones de baja conectividad esperamos encontrar ecotipos diversos y característicos de cada zona, mientras que en situaciones de alta conectividad esperamos encontrar una mayor homogeneidad de ecotipos y la presencia de representantes de embalses y ríos de agua dulce en la costa del Río de la Plata.

## 2.2. OBJETIVO GENERAL

Identificar los mecanismos que determinan la formación de floraciones del complejo *Microcystis aeruginosa* (CMA) en embalses del río Uruguay y del río Negro, así como en la costa del Río de la Plata en distintas condiciones de conectividad, evaluando los principales aportes alóctonos y autóctonos de estos organismos a través del análisis de su diversidad genotípica.

## 2.3. OBJETIVO ESPECIFICOS

1. Evaluar la importancia relativa de orígenes autóctonos y alóctonos, así como su relación las con las condiciones ambientales que las promueve.

## 2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.4.1. Estrategia de investigación

Se realizaron diferentes campañas de monitoreo donde se obtuvieron muestras de agua y midieron variables fisicoquímicas del agua. Se realizó la extracción de ADN presente en las muestras de agua y se realizó un análisis de *melting* de alta resolución (*high resolution melting analysis* HRMA). Este análisis implica la utilización de un marcador especial de alta saturación del ADN que emite fluorescencia al unirse al ADN doble hebra. Durante este proceso y a medida que aumenta la temperatura (en 0.1 °C), el ADN doble hebra se desnaturaliza y provoca el decaimiento de la fluorescencia dada por el marcador del ADN generando las curvas características de *melting* (Martínez de la Escalera et al., 2022; Lepillanca et al., 2018; Manali et al., 2017). Una vez obtenidos las curvas de *melting*, en conjunto con la información de los parámetros fisicoquímicos se identificaron los diferentes ecotipos de CMA presentes (Martínez de la Escalera et al., 2022).

### 2.4.2. Muestras de agua

En este estudio se incluyeron muestras de agua pertenecientes a diferentes sitios de los ríos Uruguay y Negro, y del Río de la Plata (Tabla 3). En el río Uruguay se analizaron muestras pertenecientes al embalse de Salto Grande (2015), y a playas de Las Cañas y Fray Bentos (2019 – 2020). En el río Negro se incluyeron muestras de los embalses Rincón del Bonete, Baygorria y Palmar de distintos años (2013 - 2014 y 2019 – 2020). También se contó con muestras de agua del Río de la Plata, de playa Ramírez (2019, 2020 y 2021), y de playas de Colonia (2021). Por último, se analizaron muestras provenientes pertenecientes a la costa de Buenos Aires sobre el Río de la Plata (2020 - 2021). Las muestras fueron tomadas de forma superficial, y fueron acompañadas de la medida de variables fisicoquímicas del agua (i.e. temperatura, conductividad, turbidez, oxígeno).

**Tabla 3.** Ecosistemas acuáticos evaluados, número de muestras (N), año de obtención de muestras y referencias cuando corresponde.

Sistema	Sitio	N	Fecha	Origen de las muestras
Río Uruguay	Salto Grande	30	2015 - 2016 - 2017	Deus et al 2015
	Las Cañas	3	2019 - 2020	Datos de esta tesis
	Fray Bentos	3	2019 - 2020	Datos de esta tesis
Río Negro	Rincón del Bonete	12	2013 - 2014 -2019 - 2020	Chalar et al., 2014; González-Piña et al., 2017;2018
	Baygorria	10	2013 - 2014 -2019 - 2020	
	Palmar	9	2013 - 2014 -2019 - 2020	Datos de esta tesis
Río de la Plata	Playa Ramírez	19	2019 - 2021	Kruk et al 2019; 2020
	Playas de Colonia	9	2021	Datos de esta tesis
	Costa Argentina	12	2021	Datos de esta tesis

### 2.4.3. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN de muestras ambientales se utilizó un método puesto a punto en nuestro laboratorio para muestras de agua (Martínez De La Escalera et al., 2014) con modificaciones. Se filtraron entre 150 a 200 mL de cada muestra empleando filtros estériles de membrana de celulosa de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Los filtros fueron colocados en tubos de lisis con 800 mL de buffer de extracción (Anexo I) y una matriz de lisis de esferas de cerámica (diámetro 1.4  $\mu\text{m}$ ). Se homogeneizó en el equipo FastPrep (MpBiomedicals) durante 40 segundos a 6.0  $\text{m s}^{-1}$  y luego se centrifugó durante 1 minuto a 6000 g. Se transfirió el sobrenadante a tubos eppendorf de 2 mL estériles, registrando su volumen. Luego fue agregado el mismo volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 8000 g durante 10 minutos. La fase acuosa fue recolectada y transferida a tubos eppendorf estériles registrando su volumen (este paso se realizó como mínimo 2 veces). Se precipitó el ADN con 0.6 volúmenes de isopropanol y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 1 hora para luego centrifugar a 13000 g por 45 minutos. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 200 mL de Etanol 70% frío y se centrifugó a 13000 g por 15 minutos a temperatura ambiente. El pellet se dejó secar por 15 minutos en cámara de flujo laminar y luego se resuspendió en agua miliQ. Por último, fue confirmada su calidad por espectrofotometría para micro-volúmenes (nanodrop). El ADN se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su empleo en el estudio de HRMA.

### 2.4.4. High Resolution Melting Analysis (HRMA) de amplicones de *mcyJ*

Para el análisis de HRMA primeramente se obtuvieron los amplicones del gen *mcyJ* (Tabla 4) también pertenecientes al cluster *mcy* y luego se analizaron mediante la técnica de HRMA (Lepillanca et al., 2018; Martínez de la Escalera et al., 2022). Para ellos, se empleó el kit MeltDoctor HRMA (Invitrogen) con un volumen final de reacción de 20  $\mu\text{L}$ . Cada reacción contenía: 9.50  $\mu\text{L}$  de agua, 0.50  $\mu\text{L}$  de BSA ( $30\text{ mg mL}^{-1}$ ), 7.76  $\mu\text{L}$  de mix MeltDoctor HRMA, 0.12 de cada primer (10 nmol) y 2.00  $\mu\text{L}$  del ADN muestra. Se utilizó el termociclador CFX96 Real Time System (BIORAD) y el software Bio-Rad *Precision Melt Analysis*. Las condiciones de ciclado fueron 2 min a  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 15 min a  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  y 40 ciclos de 15 seg a  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 30 seg a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  y 30 seg a  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para realizar los perfiles de *melting* de HRMA se registraron los valores de las unidades relativas de fluorescencia (RFU) dentro de la región de *melting* de  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  con aumentos de  $0.02\text{ }^{\circ}\text{C seg}^{-1}$ . Los datos de HRMA se obtuvieron y analizaron utilizando el Bio-Rad *Precision Melt Analysis* (Bio-Rad), cada muestra se procesó por duplicado. La curva de *melting* se normalizó al mismo nivel de fluorescencia usando las regiones pre y post *melting*. La región pre y post *melting* se seleccionó en función de la región de *melting* específica del amplicón *mcyJ* (de  $75\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $82\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $T_m = 79.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Los valores de RFU normalizados se utilizaron para el posterior análisis estadístico.

**Tabla 4.** *Primers* utilizados para el análisis de HRMA.

Gen	Secuencia (5' - 3')	TM (°C)	Tamaño esperado (pb)	Referencia
<i>mcyJ FW</i>	TAGCTAAAGCAGGGTTATCG	51.7	242	Kim et al., 2010
<i>mcyJ REV</i>	TCTTACTATTAACCCGCAGC	51.9	242	Kim et al., 2010

#### 2.4.5. Análisis de datos

Para el procesamiento de datos fue empleado el modelo propuesto por Martínez de la Escalera et al. (2022). A partir del modelo de ecotipos de CMA (Figura 6, Tabla 2) y utilizando las variables fisicoquímicas pertenecientes a los sitios utilizados en este estudio, se realizó una predicción teórica de los posibles ecotipos que se podrían llegar a encontrar en dichas muestras, estos se denominaron “ecotipos teóricos predichos”.

Posteriormente, se realizó el cálculo de la primera derivada de la fluorescencia en función del tiempo ( $-d(\text{RFU})/dt$ ), para cada una de las curvas normalizadas obtenidas en el análisis de HRMA. Luego, se corrió el modelo de ecotipos y se obtuvieron los promedios ponderados de las curvas características de *melting* para cada uno de los ecotipos descritos, le denominamos “perfiles modelo” (Martínez de la Escalera et al., 2022). Finalmente, se compararon los ecotipos teóricos predichos con los ecotipos observados en este estudio.

Los años correspondientes a cada muestra fueron clasificados en las diferentes fases (neutro, El Niño y La Niña) utilizando la base de datos de *National Oceanic and Atmospheric Administration* (NOAA, [https://origin.cpc.ncep.noaa.gov/products/analysis\\_monitoring/ensostuff/ONI\\_v5.php](https://origin.cpc.ncep.noaa.gov/products/analysis_monitoring/ensostuff/ONI_v5.php)). Se obtuvieron los valores de caudal del río Uruguay (Paso de los Libres; <https://snih.hidricosargentina.gob.ar/>) y del río Negro (<https://www.ute.com.uy/institucional/ute/utei>). Se analizó si las distintas fases según el NOAA diferían en los valores de caudales medios mensuales mediante pruebas de Wilconx.

Todo el procesamiento de datos fue realizado en el software libre R versión 4.1.3 utilizando los paquetes {ggplot2}, {ggpubr}, {fda}, {rpart}, {nlme} y {PMCMR} (Pinheiro et al., 2007; Pohlert, 2014; R Core Team, 2013; Ramsay et al., 2014; Therneau et al., 2015). Los mapas se desarrollaron en el software QGIS versión 3.30.1 (Hertogenbosch) a partir de datos geográficos de acceso libre disponibles en el Observatorio Nacional Ambiental (OAN) del Ministerio de Ambiente (<https://www.ambiente.gub.uy/geoservicios/>).

## 2.5. RESULTADOS

### 2.5.1. Ecotipos de CMA tóxicos: comparación entre los ecotipos teóricos predichos, modelo y observados

En base a los valores de las variables ambientales utilizadas por el modelo de ecotipos, se identificaron los ecotipos esperables en las muestras (Tabla 6). El modelo permitió asignar un ecotipo teórico esperado a cada muestra independientemente del sitio del cual provino, abarcando los diferentes valores registrados de conductividad, temperatura y turbidez (Tabla 5). No quedó ninguna condición sin ser asociada a un ecotipo pre-existente. Las variables ambientales obtenidas en cada estación de monitoreo se encontraron dentro del rango histórico para la época del año y la estación de monitoreo (Anexo II).

**Tabla 5.** Valores de temperatura, conductividad, turbidez, pH y oxígeno disuelto en los diferentes sitios evaluados. Se indica valor máximo, mínimo y promedio para cada variable.

Sitio	Temperatura (°C)	Conductividad ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	Turbidez (NTU)	pH	Oxígeno disuelto ( $\text{mg L}^{-1}$ )
	Máx - Mín (Promedio)	Máx - Mín (Promedio)	Máx - Mín (Promedio)	Máx - Mín (Promedio)	Máx - Mín (Promedio)
Salto Grande	24,0 - 22,6	58,4 - 39,7	81,7 - 36,6	9,5 - 7,5	9,1 - 8,5
	23,4	44,6	51,2	8,8	8,9
Río Uruguay	26,7 - 16,8	104,7 - 83,9	26,8 - 18,2	8,3 - 7,4	9,9 - 7,8
	24,0	95,9	22,5	7,8	8,9
Río Negro	27,0 - 14,3	113,5 - 72,3	30,8	9,4 - 6,7	10,6 - 6,5
	21,6	96,5	-	7,9	7,9
Río de la Plata	32,3 - 12,8	27130 - 80,0	313,0 - 9,1	10,4 - 6,3	18,9 - 3,9
	25,2	2523,9	90,5	7,7	9,2

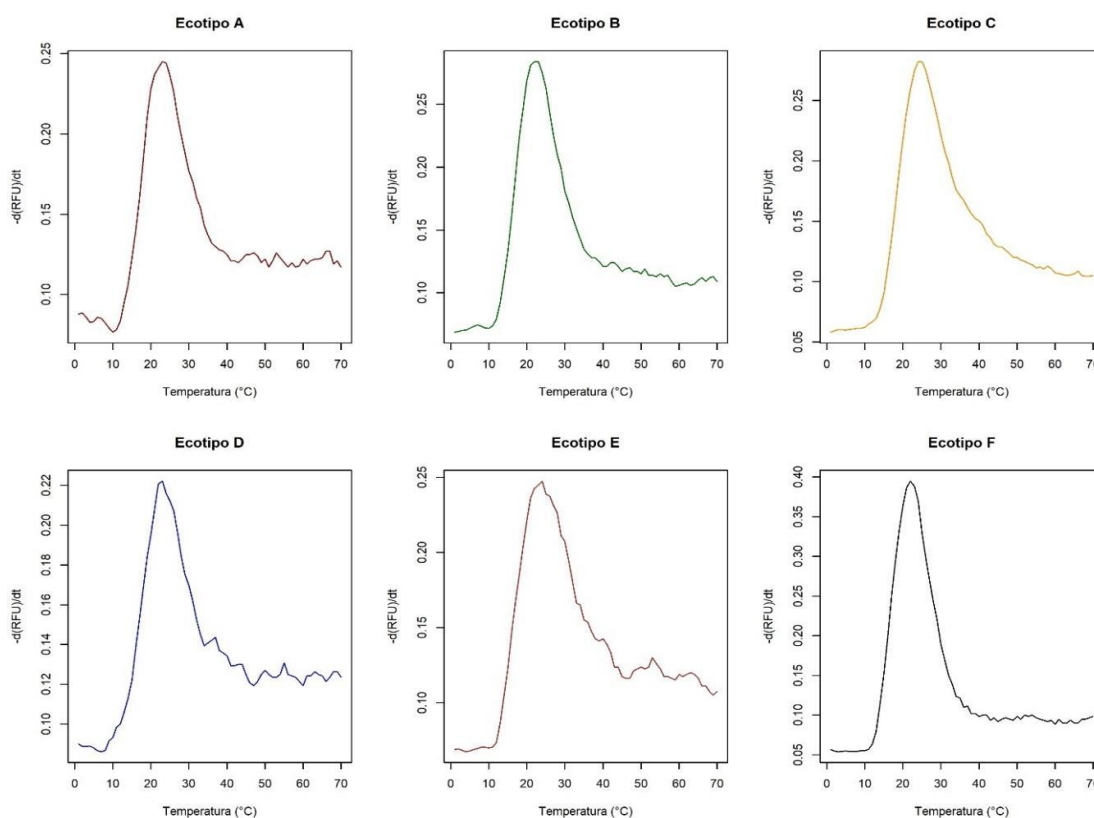
Tabla 6. Ecotipos teóricos predichos por el modelo en diferentes sitios, zonas, meses y años.

	Sitio	Ecotipos teóricos predichos	Zonas	Mes y año
Río de la Plata	Colonia	B	Ríos y embalses	Febrero 2021
	Playa Ramírez	A	Estuario medio y exterior	Noviembre 2019 Marzo 2022
		B	Ríos y embalses	Febrero 2019 Marzo 2019
		C	Ríos y embalses	Marzo 2019 Abril 2019
		E	Estuario medio y exterior	Marzo 2019
		D	Estuario interno y medio	Marzo 2019
	Argentina Costa	B	Ríos y embalses	Febrero 2021 Diciembre 2021
		C	Ríos y embalses	Diciembre 2021
Río Negro	Rincón del Bonete	B	Ríos y embalses	Febrero 2013
		C	Ríos y embalses	Septiembre 2013 Mayo 2020
	Baygorria	B	Ríos y embalses	Febrero 2013 Enero 2020
		C	Ríos y embalses	Diciembre 2013 Octubre 2019 Mayo 2020
		F	Ríos y embalses	Septiembre 2013



Río Uruguay	Palmar	B	Ríos y embalses	Febrero 2013 Diciembre 2013 Febrero 2014 Marzo 2014 Febrero 2019
		C	Ríos y embalses	Octubre 2019
	Salto Grande	B	Ríos y embalses	Septiembre 2015
		B	Ríos y embalses	Mayo 2020
	Fray Bentos	C	Ríos y embalses	Septiembre 2019 Noviembre 2019
		B	Ríos y embalses	Mayo 2020
Las Cañas	C	Ríos y embalses	Septiembre 2019 Noviembre 2019	

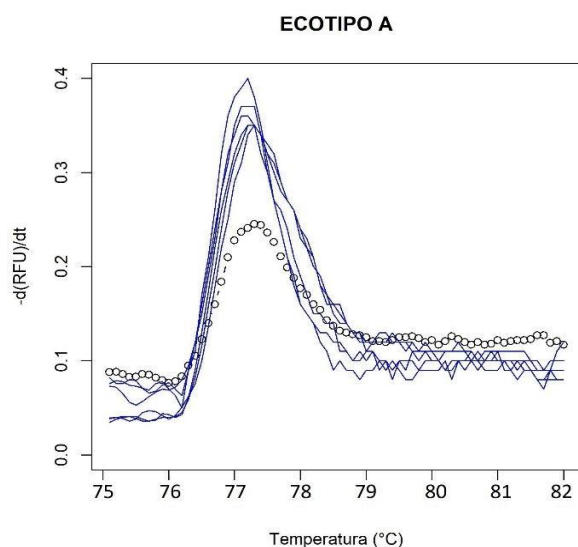
Para verificar los ecotipos teóricos predichos, se volvió a correr el modelo de Martínez de la Escalera et al., (2022) con el fin de obtener los coeficientes de las curvas características de cada ecotipo (perfiles de *melting*), denominadas “perfiles modelo” (Figura 7). Por otro lado, se obtuvieron los perfiles de *melting* de las muestras analizadas en este trabajo (ecotipos observados), con el fin de comparar estas con las curvas provenientes del modelo y ver si coinciden con los ecotipos teóricos predichos por el mismo.



**Figura 7.** Curvas de *melting* (perfiles modelo) promedio ponderados de cada ecotipo de CMA tóxico provenientes del modelo de Martínez de la Escalera et al. (2022).

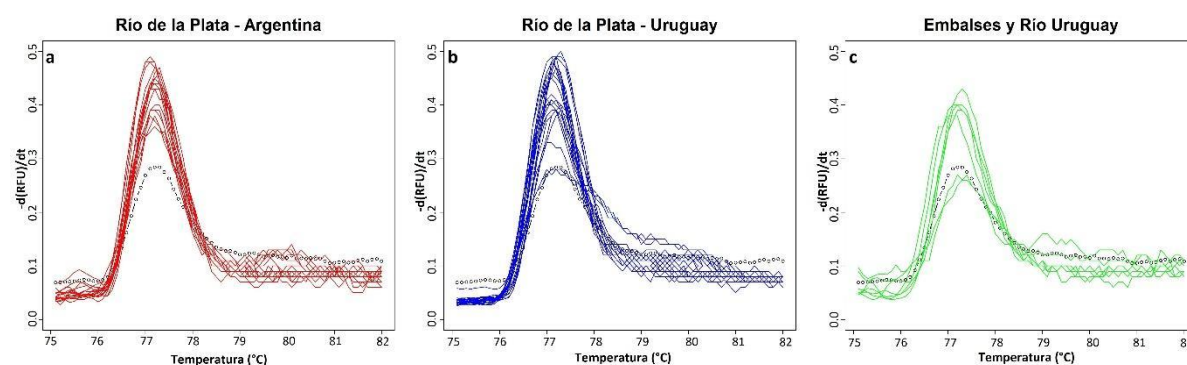
Para el caso de los ecotipos A provenientes del modelo coincidieron con los observados en el análisis de HRMA (ecotipos observados), presentando el pico característico de *melting* a la misma temperatura (Figura 8). Este grupo comprende

las muestras provenientes de la playa Ramírez en las fechas: 26/8/2019, 21/10/2019 y 11/11/2019.



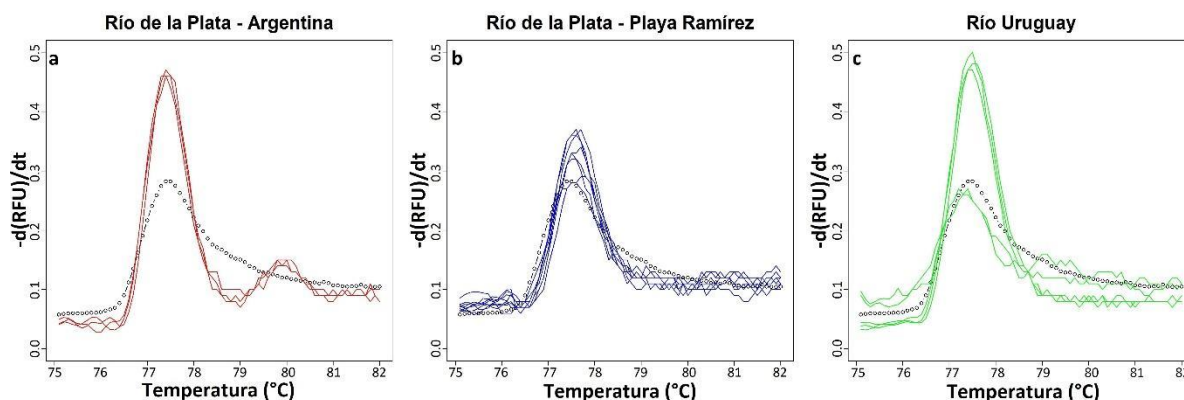
**Figura 8.** Curva de *melting* del ecotipo A proveniente del modelo (línea punteada), curvas de *melting* pertenecientes a las muestras de playa Ramírez, ecotipo observado (perfiles azules).

Lo mismo ocurrió para los ecotipos B (Figura 9 a,b,c). Dentro de este grupo se encuentran los ecotipos teóricos esperados para las muestras de Argentina (Figura 9 a), playas de Colonia (Figura 9 b), río Uruguay, embalses de Salto Grande, Palmar y Rincón del Bonete (Figura 9 c).



**Figura 9.** Curva de *melting* del ecotipo B proveniente del modelo (línea punteada), (a) curvas de *melting* pertenecientes a los ecotipos observados en la costa argentina (a- perfiles rojos), playas Colonia y Montevideo, (b- perfiles azules), los embalses y río Uruguay (c- perfiles verdes).

También para los ecotipos C hubo concordancia entre los esperados por el modelo y lo obtenido del análisis de HRMA (Figura 10 a,b,c). Dentro de este grupo se encuentran los ecotipos esperados para las muestras de Playa Ramírez (Figura 10 a), de Argentina (Figura 10 b) y del río Uruguay (Figura 10 c).



**Figura 10.** Curva de *melting* del ecotipo C proveniente del modelo (línea punteada), (a) curvas de *melting* pertenecientes a los ecotipos observados en la costa de Playa Ramírez (a- perfiles azules), costa de Argentina (b- perfiles rojos) y río Uruguay (c- perfiles verdes).

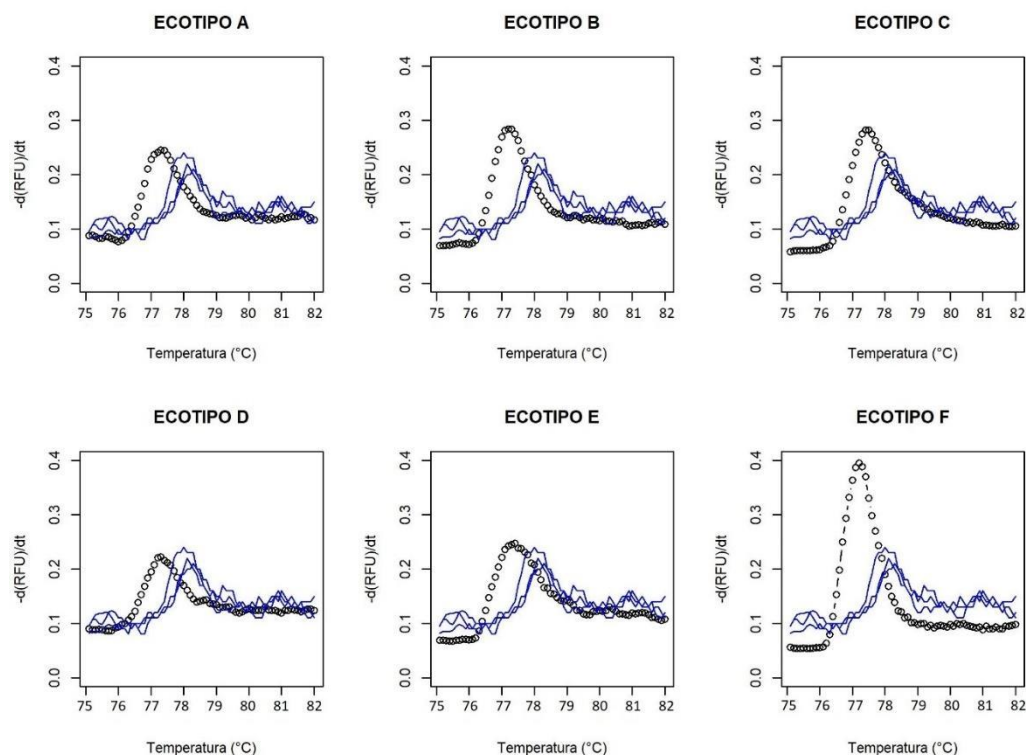
En las muestras de los embalses del río Negro en 2020 y de 2013 a 2014 y del río Uruguay de 2019, no se pudo obtener el perfil de *melting*, debido al estado de degradación del ADN presente en las muestras, o a que se trataba de poblaciones no tóxicas del CMA.

En resumen, de un total de 72 muestras analizadas, 47 muestras amplificaron en la técnica de qPCR-HRMA. A partir de las 47 muestras se pudo realizar la verificación entre los ecotipos teóricos predichos, los observados y los modelos con un 91.5% de aciertos. No fue posible predecir a los ecotipos durante el verano del 2019, en el tramo medio del Río de la Plata (Tabla 7).

**Tabla 7.** Ecotipos diferentes a los predichos por el modelo.

	Fecha	Ecotipo modelo	Ecotipo encontrado
Playa Ramírez	7/3/2019	D	B
	14/3/2019 e	B	C
	14/3/2019 c	B	C
	26/3/2019	E	C

Por último, en una oportunidad se obtuvo un perfil de *melting* que no fue posible asociar a un ecotipo, el cual corresponde a la muestra obtenida el 28 de marzo del 2019 en playa Ramírez (Figura 11).



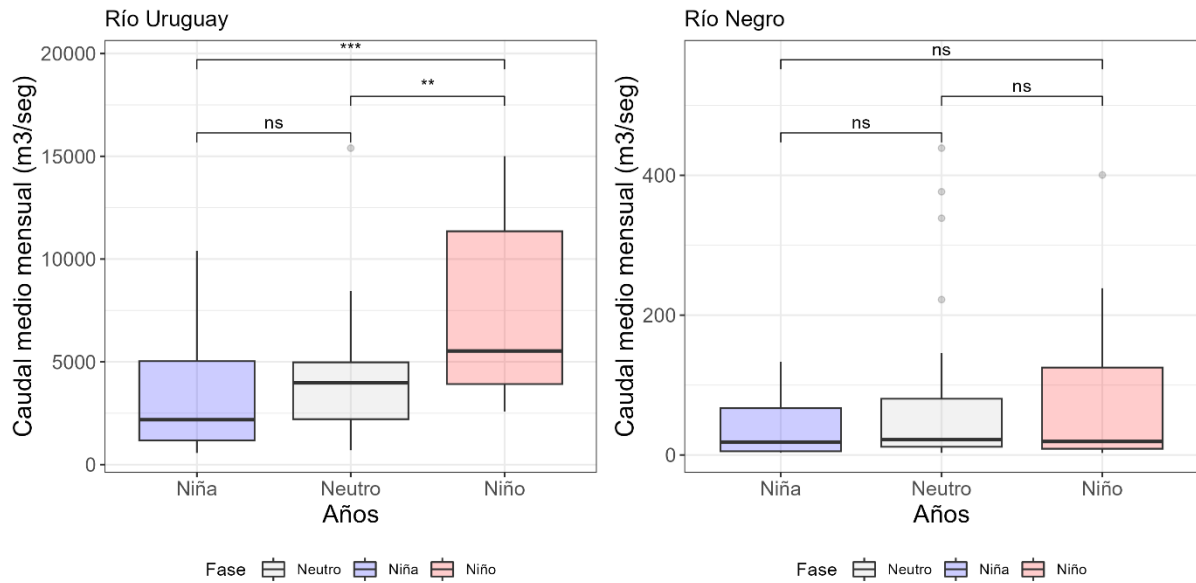
**Figura 11.** Posible nuevo ecotipo de CMA, el perfil de *melting* no se ajusta a ninguno propuesto en el modelo de ecotipos.

## 2.5.2. Distribución de ecotipos de CMA en diferentes condiciones de precipitaciones

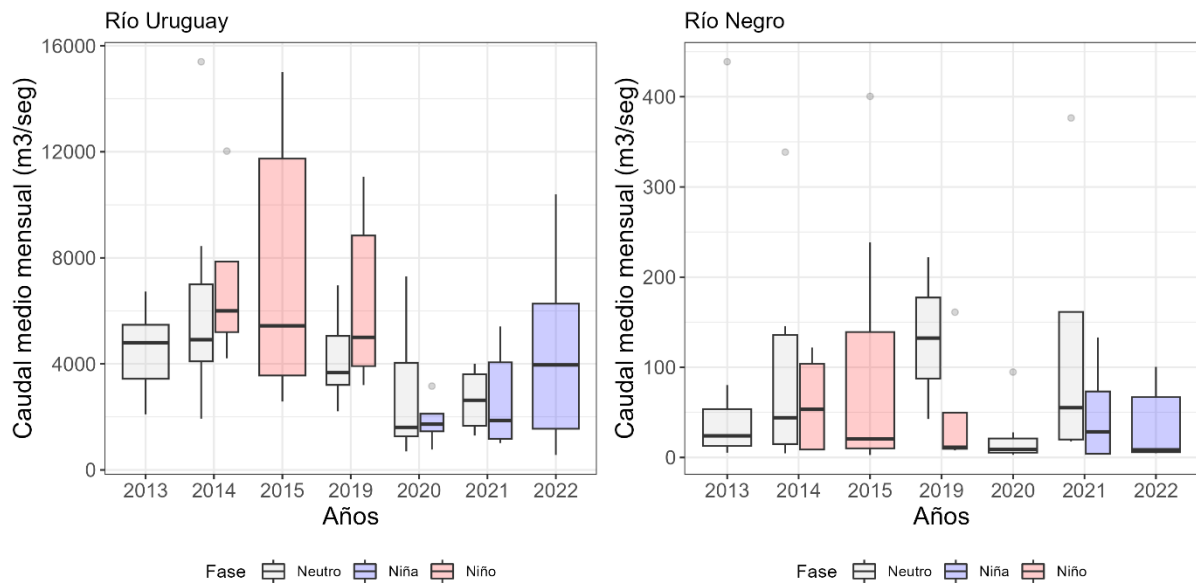
A lo largo de este estudio se encontraron distintas condiciones de precipitaciones a nivel de la cuenca (Tabla 8, Figura 12 y 13). Se encontraron diferencias significativas entre las fases del ENSO (La Niña, El Niño y Neutro para el río Uruguay) y los caudales medios mensuales (Figura 12 A). Sin embargo, si bien para el río Negro la tendencia fue similar, las diferencias entre dichas fases no fueron significativas (Figura 12 B) cuando se consideraron todos los años en conjunto.

**Tabla 8.** Años y meses en los cuales se colectaron las muestras de agua, clasificados en fase neutra, Niño y Niña. Máximos y mínimos de los caudales medios mensuales del río Uruguay y río Negro, correspondiente a los años y a las fases evaluadas.

Año	Meses	Fase	Caudal medio mensual	
			RN (m <sup>3</sup> /seg) (mín y máx)	RU (m <sup>3</sup> /seg) (mín y máx)
2013	febrero, septiembre, diciembre	Neutro	8,9 – 240,0	2096 – 6727
2014	febrero, marzo	Neutro	14,2 – 242,5	1933 – 15398
2015	septiembre	Niño	4,0 – 336,1	2581 – 15008
2019	enero, febrero, marzo, abril	Niño	4,5 – 200,2	3202 – 11058
	septiembre, octubre, noviembre	Neutro	10,4 – 152,2	2211 – 6959
2020	mayo	Neutro	4,4 – 98,9	697,5 – 7306
2021	febrero, diciembre	Niña	3,4 – 277,0	1129 – 3977
2022	marzo	Niña	3,3 – 307,3	563,5 – 10397



**Figura 12.** Variación de los caudales medios mensuales (m<sup>3</sup>/seg) de los ríos Uruguay (A) y Negro (B), en diferentes fases con diferentes regímenes de lluvia en la cuenca. Test de Wilcox. Fueron utilizados los datos de caudales de los años evaluados en este estudio.

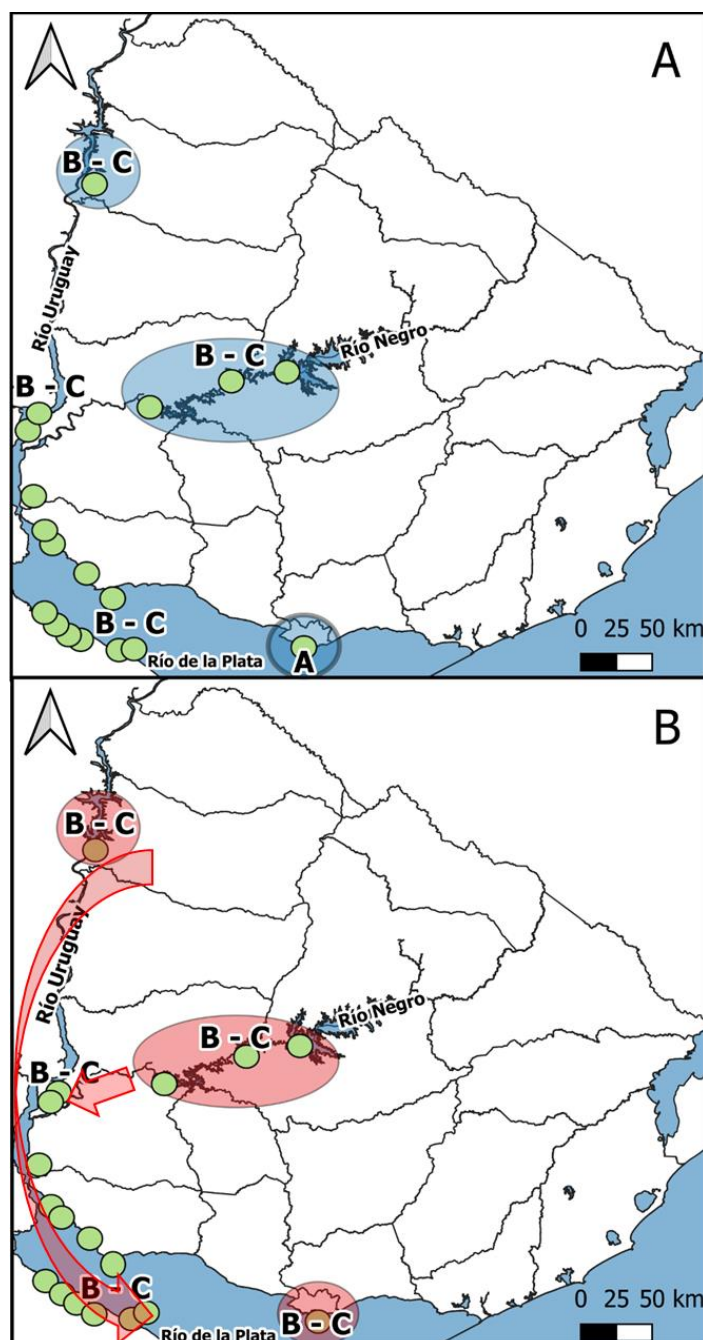


**Figura 13.** Variación de los caudales medios mensuales (m<sup>3</sup>/seg) por año en los ríos Uruguay (A) y Negro (B) en los años evaluados.

En este contexto, cuando los caudales son bajos o normales (fenómeno de La niña o fase neutra) se espera encontrar ecotipos asociados a las condiciones locales denominadas como floraciones autóctonas. En este sentido, tanto en los embalses como en el río Uruguay y en la primera porción del Río de la Plata se encontró ecotipos de agua dulce caliente (ecotipo B) y ecotipos de agua dulce cálida (ecotipo C). Por otro lado, en la porción media del estuario del Río de la Plata los ecotipos que

predominan son los adaptados a aguas salobres adaptados a las condiciones ambientales del estuario exterior y medio, ecotipo A (Figura 12 A).

Cuando los caudales aumentan (fenómeno del Niño), los ecotipos de ríos y embalses (B y C) son arrastrados a la porción media y externa del estuario (Figura 12 B). Una vez que se revierte la situación, estos ecotipos no proliferan en estos ambientes estuarinos ya que no se encuentran adaptados a esas condiciones y vuelven a encontrar ecotipos adaptados para soportar esas condiciones ambientales como el ecotipo A (Figura 12 A).



**Figura 14.** Ecotipos formadores de floraciones del CMA en los sistemas estudiados. A- Floraciones autóctonas de CMA en cada ecosistema acuático evaluado (Fase Neutra o fenómeno de La Niña). B- Aportes de floraciones alóctonas a la porción media del estuario del Río de la Plata (fenómeno de El Niño).



## 2.6. DISCUSIÓN

En este trabajo se combinaron métodos de genotipificación y análisis de aprendizaje automático para evaluar la dispersión del CMA tóxico en distintos escenarios de precipitaciones y caudales. A partir de estas aproximaciones fue posible evaluar las características ambientales que favorecen las floraciones de distintos ecotipos en condiciones de precipitaciones escasas o normales (fenómeno de La Niña y fase neutra) que favorecen ecotipos autóctonos, así como también la dispersión de dichas floraciones cuando las precipitaciones aumentan significativamente durante el fenómeno El Niño se observan poblaciones alóctonas en gran parte de los ecosistemas. Si bien nuestro grupo de investigación anteriormente reportó la existencia de ecotipos del CMA productores de microcistinas adaptados a distintas condiciones ambientales (Martínez de la Escalera et al., 2022), este estudio es el primero en evaluar cómo se distribuyen dichos ecotipos en el gradiente ambiental frente a distintas condiciones de precipitaciones.

En este trabajo se puso a prueba el modelo de Martínez de la Escalera et al., 2022 con muestras que no fueron utilizados para la construcción del modelo, contribuyendo a la robustez y mejora del mismo. Si bien la intensidad de la fluorescencia obtenida no fue la misma a la obtenida por Martínez de la Escalera et al., 2022, la “altura” de los picos es mayor a los ecotipos encontrados por el modelo, esto puede deberse a la intensidad del fluoróforo (para este estudio fue empleado un kit nuevo), el cual decae con el tiempo de uso del kit, condiciones de guardado y luz natural - artificial, bajando su intensidad en posteriores ensayos (ThermoFisher Scientific, 2016), también depende del equipo utilizado (estado del detector).

Hasta el momento se desconocía los efectos del flujo del agua sobre la distribución de las poblaciones de CMA que formaban floraciones en el gradiente ambiental estudiado. Martínez de la Escalera et al., (2022), propone que los embalses, que exhiben mayor abundancia y diversidad de CMA durante todo el año, podrían actuar como fuentes sumideros. En este estudio, pudimos confirmar esta hipótesis, donde el aumento de las lluvias y el concomitante aumento de los caudales de los ríos facilitó la conectividad entre los embalses y el resto de los ecosistemas acuáticos, permitiendo la dispersión de los ecotipos de CMA a diferentes ambientes. Luego del cese de las lluvias y disminución de los caudales se espera que las poblaciones volverían a ser seleccionadas localmente por las condiciones ambientales.

### ***Variabilidad del CMA***

Estudios recientes han reportado una gran variabilidad genética que les permitiría a *Microcystis* poder adaptarse a diferentes regiones geográficas y ambientes con características fisicoquímicas diferentes en el tiempo. Estudios de diferentes especies de *Microcystis* aisladas de dos regiones geográficas diferentes (Brasil y Canadá), mostraron que el intercambio de una proporción significativa de genes, les permitiría a estas especies adaptarse a los diferentes ambientes locales (Pérez-Carrascal et al.,

2019). Otros autores, proponen que las diversidades de perfiles metabólicos también podrían explicar porque distintas poblaciones de *Microcystis aeruginosa* están distribuidos globalmente y pueden dominar con éxito las comunidades de fitoplancton en una variedad de condiciones ambientales, lo que podría sugerir que estas diferencias son el resultado de la adaptación evolutiva a los diversos entornos (Dick et al., 2021). Por otro lado, varios estudios han identificado diferentes genotipos tóxicos de *Microcystis* a lo largo de gradientes temporales y espaciales en ecosistemas de agua dulce relacionados principalmente con la disponibilidad de nutrientes (Tromas et al., 2018). Sin embargo, bajo condiciones eutróficas o hiper-eutróficas, como en los ecosistemas acuáticos evaluados en este estudio, los nutrientes ya no modelan la riqueza de los genotipos, sino que otras variables ambientales serían las relevantes (Martínez de la Escalera et al., 2022).

### **Relaciones del CMA con ENSO**

Zabaleta et al. (2023), realizaron un seguimiento satelital sistemático de las floraciones de cianobacterias tóxicas durante el periodo 2016 - 2021, donde incluyeron diferentes años con distintas condiciones de precipitaciones (fases de El Niño, neutral y La Niña). Encontraron que las floraciones se correlacionaron positivamente con bajos caudales (fenómeno de la Niña y fase neutral), promoviendo que los eventos de floración sean más prolongados en el tiempo y que con altos caudales (El Niño) transportan la biomasa originada en los embalses ubicados aguas arriba, hacia el estuario del Río de la Plata (Zabaleta et al., 2023). Esto coincide con nuestros resultados que muestran como las floraciones autóctonas del CMA presentes en embalses del río Negro (Rincón del Bonete, Baygorria y Palmar), río Uruguay (Salto Grande) y en los tramos lóticos (Las Cañas, Fray Bentos), en condiciones de precipitaciones que superan la media anual logran llegar de forma alóctona a la porción media del estuario del Río de la Plata y muy posiblemente a la parte exterior del mismo, como se registró en la floración de CMA excepcional del verano de 2019 (Aubriot et al., 2020; Kruk et al., 2019; Kruk et al., 2021).

## **2.7. CONSIDERACIONES FINALES**

En este trabajo el objetivo fue identificar los principales aportes alóctonos y autóctonos de organismos del CMA en distintas condiciones de precipitación en playas afectadas (embalses, río Uruguay y Río de la Plata). En este sentido, utilizamos el modelo de ecotipos propuesto por nuestro grupo junto con la clasificación de los años en las distintas fases del ENSO. Esto permitió analizar su distribución bajo diferentes condiciones de precipitaciones. Observamos floraciones autóctonas adaptadas a condiciones de bajas lluvias, así como floraciones propias de ríos y embalses en la porción media y exterior del estuario del Río de la Plata, asociadas a grandes lluvias. Volviendo a la situación autóctona cuando las condiciones de precipitaciones vuelven a ser normales o escasas. Por otro lado, los resultados de

esta tesis también aportan a validar y confirmar el modelo de ecotipos propuesto por Martínez de la Escalera et al. 2022.

## **2.8. PERSPECTIVAS**

Es conveniente seguir obteniendo datos fisicoquímicos y muestras de agua de estos ecosistemas para mejorar el modelo de ecotipos y encontrar posibles nuevos ecotipos del CMA. Caracterizar el nuevo ecotipo de CMA encontrado (por ejemplo, ensamblar genomas a partir de metagenomas donde este ecotipo es dominante). Por otro lado, también sería conveniente aplicar una prueba estadística para evaluar las diferencias entre los perfiles de *melting* (curvas) obtenidos.

## Capítulo II: Sensoramiento remoto de células tóxicas del complejo *Microcystis aeruginosa*

### 3. INTRODUCCIÓN

Uno de los grandes problemas asociados al desarrollo de las floraciones de cianobacterias es su capacidad de producir toxinas tóxicas para los animales. Estas toxinas afectan a quienes consumen el agua o la utilizan con fines recreativos, contaminan los cultivos a través del riego, bioacumulándose en tejido de animales y afectado de forma aguda o crónica a las personas (Huisman et al., 2005; Li et al., 2011; Sedan et al., 2015). Lo cual hace necesario monitorearlas y generar sistemas de alerta para gestionarlas y dar aviso a la población. Si bien existen varias especies de cianobacterias que pueden desarrollar floraciones tóxicas, entre las más frecuentes se encuentran las del complejo *Microcystis aeruginosa* (CMA) (Potts & Whitton, 2000). Diferentes estudios demostraron que la morfología y toxicidad potencial de *Microcystis* spp. se encuentran relacionadas significativamente (Deus et al., 2020; Jungmann et al., 1996; Kurmayer et al., 2003). Las floraciones del CMA son superficiales y acumulativas, y tienen la capacidad de recuperan su posición en la superficie del agua (Kruk et al., 2017). Por estas razones es posible utilizar imágenes de agua superficial para registrar su presencia y evaluar su potencial tóxico (Bertone et al., 2018; Mugani et al., 2024). En las últimas décadas las tecnologías de sensoramiento remoto tuvieron un gran avance para la investigación de calidad de agua, permitiendo una oportunidad para generar herramientas basadas en las propiedades ópticas del CMA. En este capítulo se estudiaron las propiedades ópticas del CMA utilizando **HydroColor** (Leeuw & Boss, 2018), una aplicación móvil que mide la reflectancia del agua. También se evaluó el potencial tóxico con el objetivo de generar modelos matemáticos para detectar floraciones potencialmente tóxicas en los principales sistemas acuáticos del país.

#### 3.1. Propiedades ópticas

Para el diseño de herramientas basadas en las propiedades ópticas del fitoplancton es necesario considerar los mecanismos que se detallan a continuación. La luz que llega a la superficie del agua no presenta la misma intensidad en todas las longitudes de onda, ya que puede ser afectada por la posición del sol, las nubes, la humedad y los aerosoles (Kirk, 1994). Al entrar en contacto con la superficie del agua la luz puede reflejarse o penetrar en el ecosistema, dependiendo del ángulo de incidencia, por ejemplo, cerca de los 90° la posibilidad de penetración es alta, mientras que si el ángulo es inferior a 45° se reflejar hacia el cielo la mayor parte de la radiación incidente (Kirk, 1994). Una vez que la luz ingresa al agua, es dispersada, absorbida o reflejada por el agua propiamente dicha o por los componentes presentes en esta: fitoplancton, material inorgánico particulado, material orgánico disuelto coloreado o CDOM (Mobley, 1994). El fitoplancton, forma parte de este material particulado y sus

respuestas a la luz determinan sus características y toxicidad, permitiendo su monitoreo.

Las propiedades ópticas aparentes (POAs) son aquellas propiedades que dependen de la estructura geométrica del campo de luz y de los componentes que hay en el medio acuático (Kirk, 1994; Preisendorfer, 1976). Las POAs incluyen al coeficiente de atenuación vertical de luz ( $K_d$ ) que indica la extinción de la luz en la columna de agua y el de las reflectancias o  $R_r(\lambda)$  que se calculan como la relación entre la irradiancia ascendente y descendente en un punto dado (Kirk, 1994). La medida del  $R_r$  se define como la luz que refleja el cuerpo de agua:

$$R_r = L_w/E_d$$

Donde  $L_w$  es la radiancia emergente justo por encima de la superficie del agua y  $E_d$  la irradiancia descendente.

La concentración de partículas como el fitoplancton afecta el color del agua y la absorción de luz (Bricaud et al., 2004; Hogue et al., 2012). Sin embargo, no solo es importante la abundancia de los organismos, sino también su morfología: dimensiones lineales, volumen y relaciones superficie/volumen (Kirk, 1994; Reynolds, 2006). Esta morfología, estructura celular interna, la composición y el empaquetamiento de los pigmentos afectan la interacción del organismo con la luz incidente—e.g. su absorción (Ciotti et al., 2002; Whitmire et al., 2010). A nivel de ecosistema, la distribución y composición de las comunidades de fitoplancton tienen un gran impacto en las propiedades ópticas del agua y las mediciones ópticas de las aguas superficiales obtenidas por satélite (Wojtasiewicz & Stoń-Egiert, 2016). De esta forma, la abundancia relativa de poblaciones con diferentes rasgos morfológicos influye en las relaciones ópticas y permite detectar cambios en la comunidad de forma remota (Siegel et al., 2007; Soja-Woźniak et al., 2017).

### 3.1.1. Sensoramiento remoto aplicado a calidad de agua

El uso de satélites y otras plataformas aerotransportadas con sensores radiométricos demostraron resultados muy confiables en el campo de la teledetección de la calidad de agua para océanos y grandes cuerpos de agua (van der Meer, 2011). Sin embargo, esta fuente de datos presenta baja resolución espectral, la cual requiere de personal altamente capacitado para su interpretación. Alternativamente, se han desarrollado aplicaciones para teléfonos inteligentes como herramientas para el control de calidad del agua, por ejemplo: *Algae Watch*: para el control de algas, permite georreferenciar las floraciones de microalgas (Kotovirta et al., 2014) y *EyeOnWater*: permite al usuario/a herramientas para usar el agua de manera más eficiente (Novoa et al., 2014). En este trabajo evaluamos la aplicación *Hydrocolor* (Leeuw & Boss, 2018). Esta permite estimar la turbidez y las partículas en suspensión a partir de coeficientes de reflectancia del agua usando la cámara digital de un teléfono inteligente como un radiómetro de tres bandas. Nuestro objetivo es generar modelos que permitan

predecir la presencia de CMA tóxicas, en diferentes sistemas acuáticos de Uruguay a partir de estos indicadores ópticos.

### 3.1.2. Antecedentes

Los organismos del CMA forman floraciones en la superficie de varios ecosistemas acuáticos de Uruguay (Harke et al., 2016; Kruk et al., 2017; Martínez de la Escalera et al., 2017). Estas floraciones a menudo consisten en una mezcla de poblaciones productoras de microcistina (genotipos tóxicos) y no productoras (genotipo no tóxico) (Kaebernick et al., 2000; Kurmayer et al., 2003; Vezie et al., 1998). Los genotipos tóxicos y no tóxicos responden de manera diferente a los cambios ambientales, pero no hay acuerdo en cuáles son los factores más importantes (Harke et al., 2016b; Martínez de la Escalera et al., 2017). Por otro lado, existe consenso en que los genotipos tóxicos y no tóxicos presentan diferencias significativas en sus rasgos morfológicos, sugiriendo una asociación entre toxicidad y morfología (Deus et al., 2020). Este vínculo se ha demostrado para la producción potencial de toxinas (Graham & Jones, 2007; Jungmann et al., 1996; Kurmayer et al., 2003; Wang et al., 2013) y la producción real de microcistinas (Kurmayer et al., 2003; Wang et al., 2013). Por otra parte, existe extensa información sobre las relaciones entre los cambios ambientales y la morfología, especialmente para las cianobacterias y el CMA (Kruk et al., 2010, 2017). Por ello, estas relaciones podrían contribuir a comprender los principales mecanismos moduladores de la abundancia y distribución de genotipos tóxicos, y proporcionar herramientas de seguimiento adecuadas. Estudios anteriores de nuestro grupo de investigación exploraron las relaciones entre el biovolumen y morfología de CMA, el potencial tóxico y las propiedades ópticas del agua (Deus Álvarez, 2015). En este sentido, se generaron modelos que explicaron la abundancia de copias del gen *mcyE* (potencial tóxico) en el embalse de Salto Grande (Deus Álvarez, 2015). Basados en estos antecedentes, en el presente capítulo se evalúan las relaciones entre las propiedades ópticas del agua y el potencial tóxico de CMA en diferentes sistemas acuáticos de Uruguay (embalses, río Uruguay y el estuario del Río de la Plata).



### **3.2. HIPÓTESIS**

Los organismos CMA con potencial tóxico se diferencian morfológicamente de los no tóxicos y estas diferencias morfológicas se traducen en distintas propiedades ópticas. Debido a su acumulación superficial, las floraciones de CMA son factibles de ser analizadas por métodos de teledetección. Por lo tanto, las propiedades ópticas de las floraciones de CMA son buenas predictoras de su toxicidad potencial.

### **3.3. OBJETIVO GENERAL**

Predecir la presencia de CMA tóxicas en diversos ecosistemas acuáticos de Uruguay a partir de la relación entre la reflexión en las bandas roja y verde, azul y verde registrada en la superficie de cuerpos de agua con distintas características ambientales (ej. salinidad, temperatura) empleando cámaras fotográficas de teléfonos inteligentes.

#### **3.3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Cuantificar la abundancia del gen *mcvE* en muestras de agua a las que se caracterizaron ópticamente (capítulo 1).
2. Caracterizar las propiedades ópticas de CMA y las variables ambientales en distintos ecosistemas de Uruguay incluyendo embalses y playas del río Negro, río Uruguay y estuario del Río de la Plata.
3. Generar modelos de predicción del CMA tóxico mediante sensoramiento remoto para cada sistema estudiado.

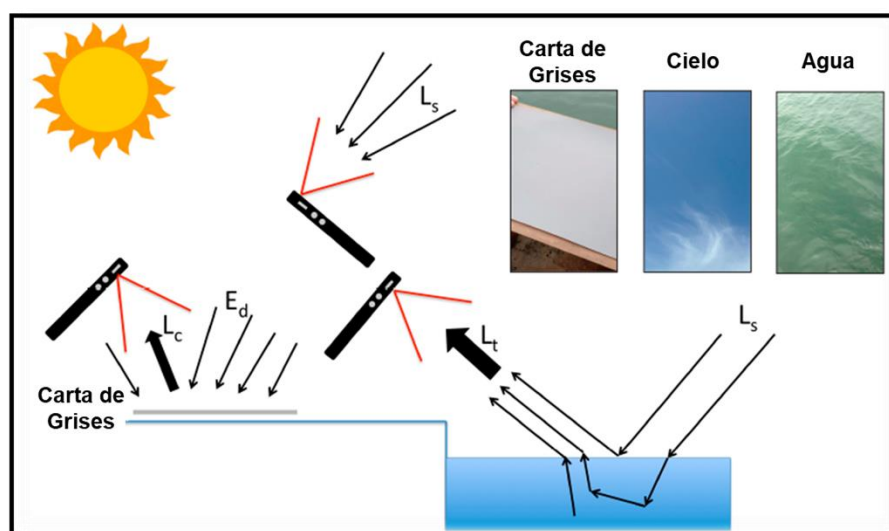
### 3.4. METODOLOGÍA

#### 3.4.1. Estrategia de investigación

Para cumplir con estos objetivos, se realizaron diferentes campañas de muestreo en las que se obtuvieron muestras de agua, se midieron variables fisicoquímicas y se tomaron datos de reflectancia del agua mediante la utilización de un teléfono móvil y la aplicación *HydroColor*. Se realizó la extracción de ADN de las muestras de agua (ver Capítulo I), donde se cuantificó la abundancia de genotipos tóxicos mediante la técnica de PCR en tiempo real (qPCR) utilizando *primers* específicos (gen *mcyE*). De esta forma, se combinó la información molecular con los datos fisicoquímicos y de reflectancia del agua, con el fin de generar modelos que puedan predecir la abundancia de genotipos tóxicos de CMA en diferentes ecosistemas acuáticos de Uruguay.

#### 3.4.2. Muestras

Se analizaron muestras pertenecientes a el embalse de Salto Grande (2013, 2014, 2015), el Río de la Plata, el río Uruguay (2019, 2020) y embalses del río Negro (2019, 2020) (Figura 14). Se obtuvieron datos de reflectancia del agua superficial mediante la aplicación para teléfonos móviles "*HydroColor*", la cual utiliza el teléfono como un radiómetro y sensores auxiliares del dispositivo (e.g: cámara, brújula e inclinómetro) para tomar una serie de tres imágenes y calcular la reflectancia del cuerpo de agua en las bandas rojo, azul y verde (Leeuw & Boss, 2018). Por medio de tres imágenes *HydroColor*, calcula la reflectancia del agua ( $R_{rs}$ ) en los canales de color rojo, verde y azul (Leeuw & Boss, 2018). En el Anexo III se presenta una guía de uso de la aplicación (Anexo III – Protocolo de uso *HydroColor*).



**Figura 15.** Ejemplo de imágenes tomadas con *HydroColor*. La imagen de la tarjeta de grises se captura a 40° nadir y a 135° del sol. La imagen del cielo se captura a 130° desde el ángulo nadir y a 135° desde el plano del sol. La imagen del agua se captura a 40° desde el ángulo nadir y a 135° desde el plano del sol. Tomado y adaptado de Leeuw y Boss, 2018.

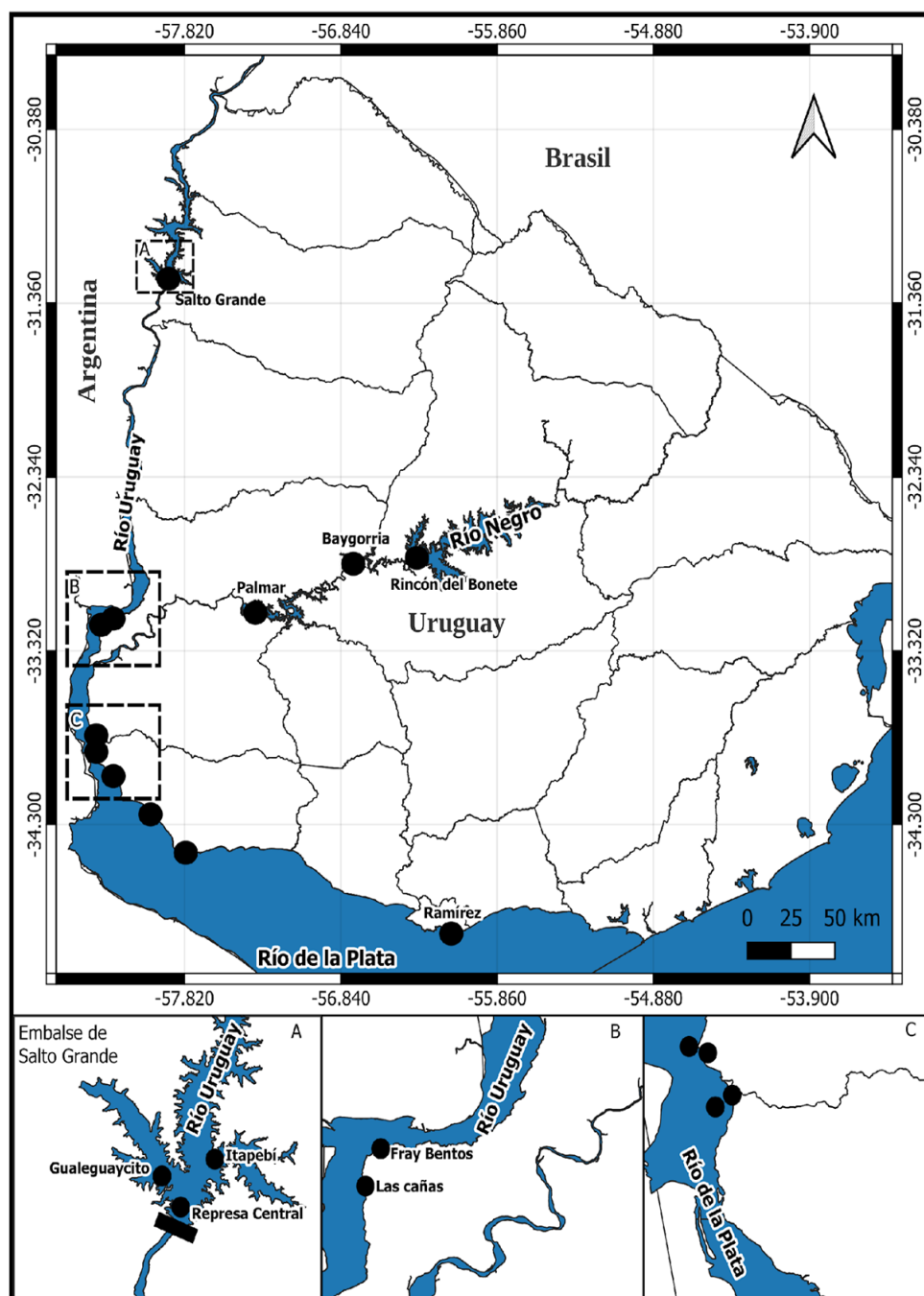
Estas imágenes permiten calcular la intensidad de la energía lumínica reflejada en la superficie del agua, la cual se elimina primero de la energía que proviene del agua, restando los valores de la imagen “cielo” a la imagen “agua”. La segunda corrección radiométrica de la medición de agua se realiza mediante la división de la energía lumínica que viene del agua por la energía incidente en la superficie del agua y estimada a partir de la imagen de la carta de grises de referencia (Figura 13). En este sentido, los datos obtenidos en el embalse de Salto Grande fueron obtenidos con un teléfono Iphone 5C, con una cámara de resolución 8 MP (Deus Álvarez, 2015). Por otro lado, para los datos obtenidos durante el año 2019 y 2020, se utilizó un teléfono Huawei Y9 pro 2019, con una cámara con una resolución de 13 MP y una cámara secundaria de 2 MP. En todos los casos las imágenes fueron tomadas en zonas donde el fondo no fuera visible. Asimismo, se utilizaron datos de velocidad de viento obtenidos de INUMET (2021) y datos medidos in situ con anemómetro. Se hizo extracción de ADN (Capítulo I) y cuantificación de los genes *mcyE* por medio de qPCR. En todos los casos se midieron parámetros fisicoquímicos del agua incluyendo temperatura (°C), turbidez (NTU), conductividad ( $\mu\text{s}/\text{cm}^2$ ), pH, oxígeno disuelto ( $\mu\text{g}/\text{l}$ ) y saturación de oxígeno (%) utilizando un multiparámetro.

### 3.4.3. qPCR cuantitativo en tiempo real (qPCR)

Se cuantificó la abundancia del gen *mcyE* mediante qPCR utilizando *primers* específicos (Tabla 9). En cada reacción se utilizó 0.12  $\mu\text{L}$  cada primer (50  $\mu\text{M}$ ), 2  $\mu\text{L}$  de ADN, 7.76  $\mu\text{L}$  del kit Power SYBR Green PCR (Invitrogen), BSA 0.5  $\mu\text{L}$  (30 mg  $\text{mL}^{-1}$ ), con un volumen final de reacción de 20  $\mu\text{L}$  y se utilizó un termociclador CFX6 Real Time System (BIORAD). El ciclado de PCR constó de 2 minutos a 50 °C, 15 minutos a 95 °C y 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C a 60 °C y 30 segundos a 72 °C (Martínez de la Escalera et al., 2017). Para la cuantificación absoluta del número de copias del gen *mcyE* se empleó un clon del gen y se realizaron diluciones seriadas de 1/10 a 1/100000 para generar curvas de calibración y se determinó el número de copias por microlitro.

**Tabla 9.** *Primers* empleados para amplificar los fragmentos de genes para la síntesis de microcistinas mediante qPCR en tiempo real.

Nombre	Secuencia (5' - 3')	TM (°C)	Tamaño esperado (pb)	Referencia
mcyE_F	AAGCAAAGCTGCTCCCGGTATC	57,6	120	Sipari et al., 2010
mcyE_R	CAATGGGAGCATAACGAGTCAA	55,1	120	Sipari et al., 2010



**Figura 16.** Mapa de Uruguay con los puntos analizados en este capítulo. Embalses de: Salto Grande, Rincón del Bonete, Baygorria y Palmar. Playas: Fray Bentos, Las Cañas (Río Negro), Playas de Colonia y Playa Ramírez (Montevideo).

#### 3.4.4. Análisis de datos y modelos utilizados

Con el objetivo de generar modelos estadísticos para cada tipo de sistema, las muestras de agua fueron agrupadas según su origen: embalses (Salto Grande, Rincón del Bonete, Baygorria y Palmar), el Río de la Plata (Colonia y Playa Ramírez, Montevideo), y el Río Uruguay (Las Cañas y Fray Bentos). Para evaluar si existían diferencias significativas entre los sistemas, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis

(KW) a las variables ambientales, biológicas y coeficientes de reflectancia, seguida por el test de Wilcoxon (W) para comparaciones por pares entre los sistemas.

Se construyeron varios modelos estadísticos, incluidos Modelos Lineales Múltiples (LM), segmentados y Modelos Aditivos Generalizados (GAM), para predecir la abundancia de genotipos tóxicos del CMA. La variable dependiente en todos los modelos fue la abundancia del gen *mcyE*, mientras que las variables explicativas incluyeron propiedades fisicoquímicas del agua (temperatura, conductividad, turbidez, oxígeno disuelto y pH), así como las relaciones de reflectancia ( $Rrs(\text{rojo})/Rrs(\text{verde})$  y  $Rrs(\text{azul})/Rrs(\text{verde})$ ). Además, se incluyó el sitio como variable categórica para estudiar su efecto en la abundancia de los genotipos tóxicos, también se probó la interacción en la pendiente. Para la selección del modelo más adecuado, se utilizó la función ***stepAIC()***, que permite realizar una selección bidireccional de variables, basada en el criterio de información de Akaike (AIC). Posteriormente, se construyeron modelos segmentados a partir de los LM para evaluar si estos nuevos modelos ofrecían un mejor ajuste. También se ajustaron Modelos Aditivos Generalizados (GAM) con suavizado de las variables explicativas, lo que permite capturar relaciones no lineales. Además, se utilizó el argumento ***"select = TRUE"*** para que el algoritmo determinara qué variables incluir en el modelo final. Todos los modelos fueron evaluados según su AIC y el pseudo-R<sup>2</sup>.

Es importante señalar que, debido al bajo número de muestras (n=6), no fue posible generar un modelo para el río Uruguay. Finalmente, para evaluar el efecto del sitio, se realizaron modelos de predicción de CMA considerando todos los sistemas estudiados en conjunto, con el tipo de sistema como variable explicativa categórica adicional.

El procesamiento de los datos se llevó a cabo en el software R versión 4.1.3, utilizando los paquetes {ggplot2}, {ggpubr}, {MASS}, {segmented} y {mgcv}.

### 3.5. RESULTADOS

#### 3.5.1. Caracterización ambiental

La temperatura del agua en todos los sistemas (embalses del río Negro, Río de la Plata y río Uruguay) mostró estacionalidad y no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes sistemas (Figura 17A). Cabe destacar que en el Río de la Plata la mayor parte de los monitoreos fueron realizados durante el periodo estival.

Con respecto a la conductividad del agua se observan diferencias significativas entre todos los sistemas evaluados (Figura 17B), Río de la Plata con los embalses y río Uruguay ( $W = 4.5$ ,  $p\text{-valor} < 0.0001$ ;  $W = 143.0$ ,  $p\text{-valor} < 0.001$ , respectivamente), y entre los embalses y el río Uruguay ( $W = 23.0$ ,  $p\text{-valor} < 0.01$ ). Los embalses presentaron las conductividades más bajas con un rango de 39.7 a 102.4  $\mu\text{S/cm}$ , seguido del río Uruguay con un rango de 70.0 a 104.7  $\mu\text{S/cm}$ , y el Río de la Plata con un rango de 80 a 16200  $\mu\text{S/cm}$ .

En cuanto al pH se encontraron diferencias significativas entre los embalses y el río Uruguay ( $W = 188.5$ ,  $p\text{-valor} < 0.05$ ), y entre el Río de la Plata y el río Uruguay ( $W = 82.0$ ,  $p\text{-valor} < 0.05$ ). Los rangos obtenidos de pH para los embalses variaron entre 5.7 a 9.9, en el río Uruguay entre 6.1 a 8.3, y en el Río de la Plata 6.5 a 10.4 (Figura 17C).

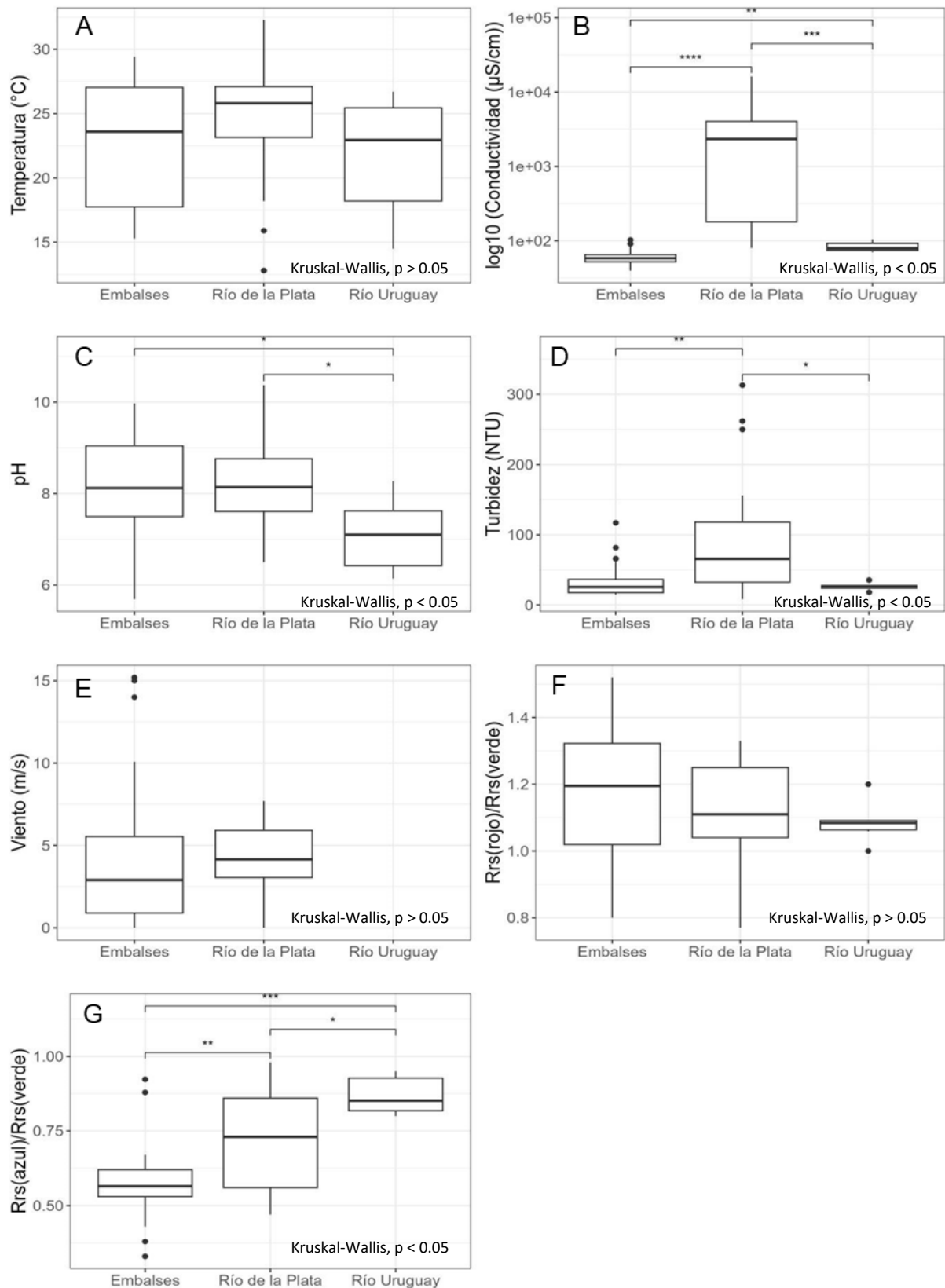
La turbidez del agua también presentó diferencias significativas entre el Río de la Plata con los embalses y el río Uruguay ( $W = 211.0$ ,  $p\text{-valor} < 0.01$ ;  $W = 102.0$ ,  $p\text{-valor} < 0.05$ , respectivamente). Los rangos obtenidos de turbidez para los embalses variaron entre 15.0 a 117.0 NTU, para el río Uruguay entre 18.0 y 35.5 NTU, y para el Río de la Plata de 8.3 a 313.0 NTU (Figura 17D).

No se encontraron diferencias significativas en la velocidad del viento, los valores registrados estuvieron dentro del rango de 0 a 15.2 m/s en los embalses, y para el Río de la Plata entre 0 a 7.7 m/s (Figura 17E). Para el río Uruguay para las fechas muestreadas, no se registraron datos de velocidad de viento en la estación de Mercedes (INUMET).

#### 3.5.2. Propiedades ópticas del agua

Las relaciones entre las reflectancias de la luz obtenidas del rojo y el verde:  $Rrs(\text{roja})/Rrs(\text{verde})$  no mostraron diferencias significativas entre los sitios evaluados (Figura 17F). Sin embargo, la relación entre los cocientes  $Rrs(\text{azul})/Rrs(\text{verde})$  sí presentó diferencias significativas entre los tipos de sistemas evaluados (Figura 17G). Los valores obtenidos estuvieron entre 0.3 y 0.9 en los embalses, entre 0.80 y 0.95 en el río Uruguay, y entre 0.45 y 0.98 en el Río de la Plata.

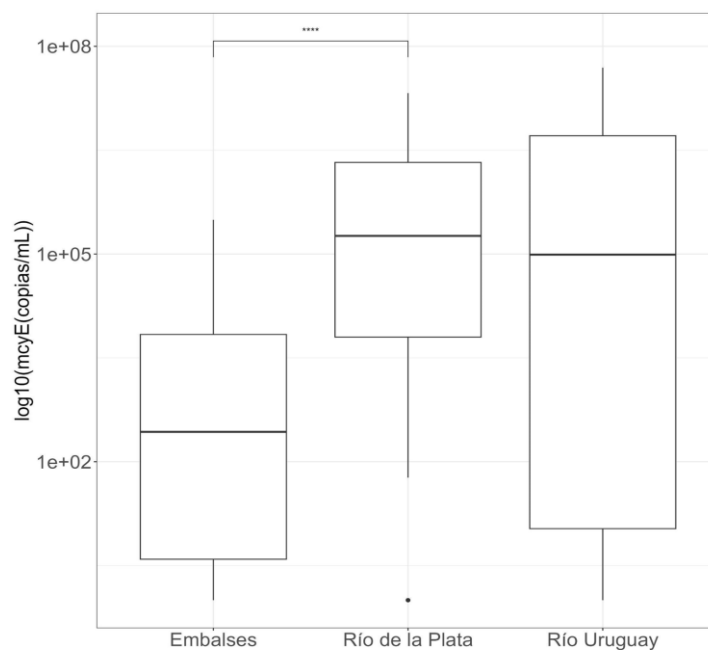




**Figura 17.** Variables ambientales medidas en todos los sitios de estudio. Valor de Kruskal-Wallis y test de Wilcoxon (p-valor:  $<0.05^*$ ,  $<0.01^{**}$ ,  $<0.001^{***}$ ,  $<0.0001^{****}$ ).

### 3.5.3. Caracterización biológica

El número de copias del gen *mcyE* en los embalses tomó valores entre indetectable y 312000 copias/mL, en el río Uruguay entre indetectable y 49200000 copias/mL, y en el Río de la Plata entre indetectable y 21100000 copias/mL (Figura 18). La abundancia de células potencialmente tóxicas (número de copias del gen *mcyE*) varió significativamente entre los embalses y el Río de la Plata ( $W = 187.0$ ,  $p$ -valor  $<0.0001$ ), mientras que no se observaron diferencias significativas entre el río Uruguay y el Río de la Plata, ni con los embalses.



**Figura 18.** Variación del gen *mcyE* (copias/mL) en los sitios estudiados: embalses, Río de la Plata y río Uruguay. Test de Wilcoxon ( $p$ -valor: \* =  $<0.05$ , \*\* =  $<0.01$ , \*\*\* =  $<0.001$ , \*\*\*\* =  $<0.0001$ ).

### 3.5.4. Modelos de predicción de células tóxicas de CMA en diferentes ecosistemas acuáticos de Uruguay

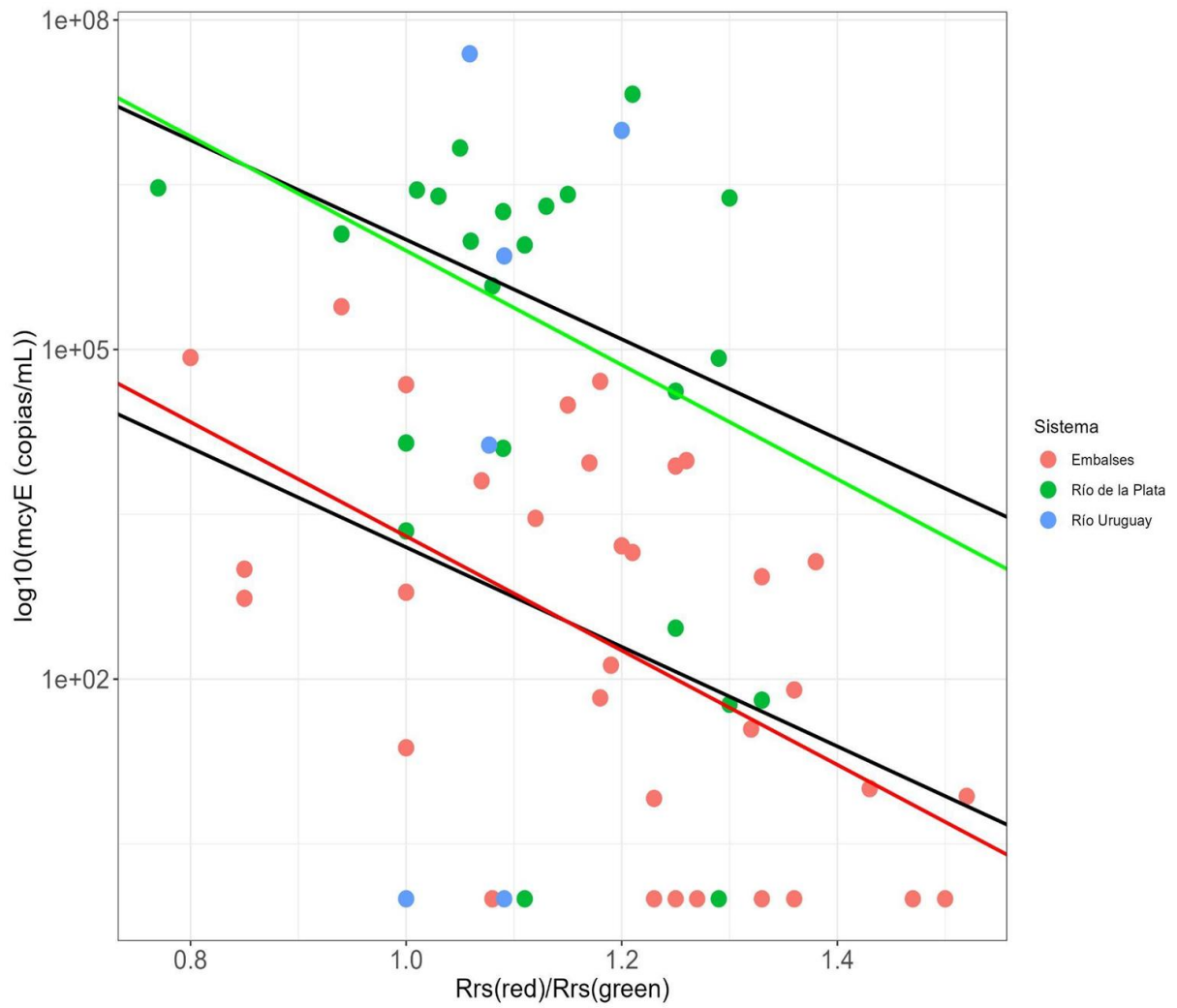
Todos los modelos generados seleccionaron la relación entre la reflectancia en la banda roja y verde como variable explicativa de la abundancia de genes tóxicos (Tabla 10). La inclusión de variables ambientales, la conductividad para embalses y la temperatura del agua para el Río de la Plata, aumentó el  $R^2$  y el AIC de los modelos al compararlos con aquellos que solo involucraron las relaciones  $Rrs(\text{rojo})/Rrs(\text{verde})$ . Las variables pH, viento y turbidez no fueron seleccionadas por los modelos. Para el caso de los embalses fue seleccionado el modelo de LM, el cual explica un 44% de la varianza observada (Tabla 10 -Embalses-). Para el caso del estuario del Río de la Plata, el modelo seleccionado también fue el LM, explica un 42% de la varianza observada (Tabla 10 -Río de la Plata-).

Por otro lado, cuando se incluyó al sitio como variable categórica, los modelos generados seleccionaron al sitio como relevante diferenciando al Río de la

Plata del resto de los sitios (embalses y río Uruguay). Se obtuvieron por tanto dos modelos, uno para el estuario del Río de la Plata y otro para los embalses y el río Uruguay (Tabla 10 -Todos los sistemas-). También se probó la interacción de la pendiente, comprobándose que no hubo cambios. El mejor modelo fue LM que explicó un 48% de la varianza observada en base al cociente Rrs(rojo)/Rrs(verde) y el sitio, y tuvo un AIC de 236 (Figura 17, Tabla 10 -Todos los sistemas-).

**Tabla 10.** Modelos generados para predecir la abundancia de células tóxicas del CMA, utilizando el gen *mcyE* como *proxy* (variable y), considerando dos grupos de muestras, las provenientes de Embalses y las provenientes del Río de la Plata. Se incluyen el tipo de modelo (LM, segmentado, GAM), el número de casos (N), las variables explicativas, la ecuación correspondiente, el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), valor del Criterio de información de Akaike (AIC), el Break Point (BP) en el caso del modelo segmentado y el error cuadrático medio (MSE) en que caso de los modelos seleccionados.

Grupo de ecosistemas	Tipo de Modelo	N	Variables Explicativas	Modelo	$R^2$	AIC	BP	MSE
Embalses	LM	33	Rrs(rojo)/Rrs(verde)	8.5 – 5.2 rojo/verde	0.30	123	-	-
			<b>Rrs(rojo)/Rrs(verde) + conductividad</b>	<b>13.3–0.08 conductividad–5.4 rojo/verde</b>	<b>0.44</b>	<b>118</b>	-	<b>0.46</b>
	LM + Segmentado		Rrs(rojo)/Rrs(verde)	Seg1: 2.4 + 0.54 rojo/verde	0.32	126	1.15	-
				Seg2: 12.2 -7.92 rojo/verde				
GAM	Rrs(rojo)/Rrs(verde)	2.07 + s(rojo/verde, k=3)	0.28	118	-	-		
Río de la Plata	LM	18	Rrs(rojo)/Rrs(verde)	11.1 – 5.2 rojo/verde	0.24	65	-	-
			<b>Rrs(rojo)/Rrs(verde) + Temperatura</b>	<b>6.8 + 0.16Temperatura – 5.1 rojo/verde</b>	<b>0.42</b>	<b>62</b>	-	<b>0.51</b>
	LM segmentado		Rrs(rojo)/Rrs(verde)	Seg1: -1.4 rojo/verde + 7.3	0.32	67	1.15	-
				Seg2: -12.3 rojo/verde + 20				
GAM	Rrs(rojo)/Rrs(verde) + Temperatura	s(rojo/verde, k=3) + s(Temperatura, k=3)	0.33	62	-	-		
Todos los sistemas	LM	70	<b>Rrs(rojo)/ Rrs(verde) + Sitio</b>	<b>Embalses y RU= 7.7 – 4.5 rojo/verde</b>	<b>0.48</b>	<b>235</b>	-	<b>0.42</b>
				<b>RdIP = 10.5 – 4.5 Rrs rojo/verde</b>				
	LM segmentado		Rrs(rojo)/Rrs(verde)	Seg1: 4.3 + 0.18 Rrs rojo/verde	0.20	256	1.13	-
				Seg2: 17.9 – 11.9 Rrs rojo/verde				
GAM	Rrs(rojo)/Rrs(verde) + Sitio	s(rojo/verde) + s(Sitio, bs="fs")	0.46	235	-	-		



**Figura 19.** Abundancia de células tóxicas vs cociente  $\text{Rrs(rojo)/Rrs(verde)}$ . Se incluyen los modelos ajustados en línea roja el LM para los embalses; y en línea verde: el LM para el Río de la Plata generados por separado (Tabla 8) y en líneas negras el LM conjunto para todos los sitios más el efecto de sitio (Tabla 8).

### 3.5. DISCUSIÓN

En este trabajo, las propiedades ópticas de la superficie del agua representadas por la relación Rrs(rojo)/Rrs(verde) obtenida con fotografías digitales se utilizaron para predecir la abundancia de células potencialmente tóxicas de organismos CMA en diferentes ecosistemas acuáticos de nuestro país. En estudios anteriores de nuestro grupo de investigación, se generó un modelo para el embalse de Salto Grande, en base a las relaciones Rrs el cual predijo la presencia de abundancias altas o bajas de células de CMA tóxicas cuando las relaciones Rrs(rojo)/Rrs(verde) eran más bajas o más altas a 1.2 (Deus Álvarez, 2015). En este estudio fue posible ampliar la aplicación de esta metodología a otros ecosistemas, con diferencias en sus características como es el caso del estuario del Río de la Plata. Estos modelos permiten predecir la potencial toxicidad de las floraciones del CMA con una herramienta de uso cotidiano por la población. Esto es muy relevante ya que las floraciones de CMA son cada vez más frecuentes en toda la costa de los ríos y embalses, incluyendo al Río de la Plata, presentando un riesgo para la salud pública y el turismo.

Los modelos generados en este trabajo incluyen variables ambientales, temperatura y conductividad del agua, que juegan un rol muy importante en la ecología del CMA. En el caso de temperatura del agua, tiene un efecto directo sobre los procesos bioquímicos de las células afectando el metabolismo de los organismos (Brown et al., 2004). A nivel de los ecosistemas la temperatura favorece la estabilidad de la columna de agua, favoreciendo la formación de floraciones superficiales (Paerl & Huisman, 2009). En este sentido, Davis et al., (2009) observaron en experimentos que el aumento de la temperatura favorece la tasa de crecimiento de células tóxicas de *Microcystis* aumentando significativamente en comparación con las células no tóxicas. Incluso en algunos casos las células no tóxicas mostraban una disminución de sus tasas de crecimiento, lo que lleva a concluir que el incremento de la temperatura por encima de los valores promedio de los ecosistemas llevaría a un aumento selectivo de las poblaciones tóxicas de *Microcystis* (Davis et al., 2009; Jung et al., 2011). Por ejemplo, en el río Uruguay y Río de la Plata, se ha demostrado que la abundancia de genotipos tóxicos es favorecida con el aumento de temperaturas (Martínez de la Escalera et al., 2017). En estudios anteriores, hemos observado distintos genotipos tóxicos de CMA asociados a diferentes temperaturas condicionando su abundancia e induciendo su producción de microcistinas (Lepillanca et al., 2018).

La diferencia entre sitios en cuanto a su salinidad se reflejó en los modelos a través de la variable sitio y la conductividad. La mayoría de las cianobacterias de agua dulce no pueden sobrevivir durante períodos prolongados en aguas salinas, pero algunos géneros tienen una tolerancia a la sal relativamente alta, entre ellos el género *Microcystis*, la cual incluso puede mostrar tasas de crecimiento moderadas y puede producir microcistinas en ambientes salinos (Robson & Hamilton, 2003; Ross et al., 2006; Tonk et al., 2007). En este sentido, Ross et al. (2019) reportado tasas de

crecimiento positivas a salinidades de 3 y 7 de la cepa *Microcystis aeruginosa* (LB 2285), pero a salinidades de 10 la abundancia de células se mantuvo constante durante 11 días de incubación (Ross et al., 2019). En el caso del trabajo de Tonk et al. (2007) utilizando cepas de *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 encontraron que a salinidades de 16 y 18 si bien la tasa de crecimiento disminuía significativamente, eran capaces de sobrevivir durante 5 días (Tonk et al., 2007). En estudios anteriores en nuestro país, Kruk et al., (2017) encontraron que la salinidad y la temperatura fueron las principales variables que afectan las respuestas de CMA, en diferentes niveles: experimental, poblacional y a nivel de comunidad y ecosistema. A nivel experimentalmente encontraron que las células de CMA de agua dulce pueden permanecer activas durante 24 horas en aguas salobres (salinidad = 15), mientras que las colonias aumentan su velocidad de flotación. A nivel poblacional, la tasa máxima de crecimiento disminuye con la salinidad, y presenta una respuesta exponencial unimodal con la temperatura, mostrando un óptimo a 27.5°C y una rápida disminución a partir de entonces. Por último, a nivel de comunidad y ecosistema, las colonias de CMA mostraron un aumento relativo sostenido del biovolumen desde aguas dulces a marinas (salinidad 30), presentando ventajas en condiciones osmóticas restrictivas (Kruk et al., 2017). En estudios más recientes de nuestro grupo de investigación, se encontró que los organismos tóxicos de CMA sobreviven a altas concentraciones de salinidad (25) y que además pueden crecer en estas condiciones (Martínez de la Escalera Siri, 2019). En dicho trabajo se observaron cambios en la estructura de la comunidad tóxica del CMA inducidos por la salinidad. Cuando la salinidad era mayor a 0 se observó una disminución en la proporción de genotipos tóxicos, siendo especialmente afectada a salinidades entre 10 y 25 (Martínez de la Escalera Siri, 2019). En este sentido, los estuarios varían su salinidad entre 0.5 y 25 (Kruk et al., 2017), lo que se encuentra dentro de los rangos de tolerancia a la sal informados para el CMA. Por lo tanto, incluso con aumentos de salinidad en estuarios que se prevé que acompañará al cambio climático (Paerl & Paul, 2012), la salinidad no debería ser un inhibidor importante para el crecimiento de estos organismos en estos sistemas estuarinos (Kruk et al., 2017).

Estudios han indicado que las floraciones de cianobacterias se verán favorecidas con el aumento de la temperatura debido al cambio climático (O'Neil et al., 2012), siendo especialmente cierto para los organismos de CMA (Segura et al., 2018). Estudios recientes a lo largo de todo el río Uruguay, encontraron que el aumento exponencial en la abundancia de cianobacterias durante las dos últimas décadas es congruente con el aumento del área de la cuenca destinada a cultivos con uso de fertilizantes (Kruk et al., 2023). De continuar con el aumento de esta forma de producción, sumado a la variabilidad climática (aumento de las lluvias acompañado de caudales extremos y aumento de la temperatura), es esperable que las floraciones de cianobacterias tóxicas incrementen su frecuencia e intensidad (Kruk et al., 2021; Martínez de la Escalera et al., 2017; Massey et al., 2022). Esto implica un aumento del riesgo para la salud pública y ambiental en los años venideros y hace imprescindible contar con herramientas de monitoreo que proporcionen distinta clase de información, que sean

sensibles y fáciles de interpretar. Por esta razón, es importante construir sistemas de alerta para prevenir, mitigar, e informar a la población. La Accesibilidad de este sistema a todos aquellos que tengan un teléfono inteligente permitiría mejorar los resultados de esta tesis incorporando nuevas mediciones de la población en el monitoreo

Los resultados aquí generados cumplen esos requisitos, permitiendo predecir la presencia de CMA tóxico con un bajo costo económico, ya que únicamente se necesita una carta de grises y la instalación de la aplicación “*HydroColor*” la cual actualmente no tiene costo (Anexo II). La incorporación de esta herramienta a la gestión de la calidad de agua permitiría informar tempranamente acerca de la presencia y toxicidad de cianobacterias en playas, tomas de agua, entre otros.

### **3.6. CONSIDERACIONES FINALES**

En este trabajo fue posible predecir la toxicidad del CMA a partir de la relación entre las reflectancias de las bandas roja y verde de la luz solar, calculada a partir de imágenes de la superficie de cuerpos de agua con distintas características, empleando cámaras fotográficas de teléfonos inteligentes.

Estos modelos presentaron diferencias entre los embalses y el Río de la Plata, evidenciado los efectos de la turbidez y la salinidad. Por último, estos modelos podrían ser utilizados por técnicos, gestores o la población en general (monitoreo ciudadano), ya que solo incluyen variables medidas in situ. Los aportes generados en esta tesis permiten profundizar en los conocimientos de la ecología del CMA en los principales ecosistemas acuáticos de nuestro país.

### **3.7. PERSPECTIVAS**

Los modelos generados en este trabajo para predecir la abundancia de células potencialmente tóxicas del CMA presentes en una floración, sería convenientes obtener más datos de todos los sistemas acuáticos evaluados de esta forma se podrían mejorar los modelos propuestos en esta tesis, y se podría llegar a proponer un modelo para cada uno de los ecosistemas evaluados. En este estudio no fue posible proponer un modelo para el río Uruguay debido a que la cantidad de datos era muy baja. Esto es muy importante, ya que estos modelos aportarán a prevenir los riesgos sobre la salud humana y animal.



## BIBLIOGRAFÍA

- Adams, D. G., Carr, N. G., & Wilcox, M. (1981). The developmental biology of heterocyst and akinete formation in cyanobacteria. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, 9(1), 45-100.
- Adloff, C. T., Bem, C. C., Reichert, G., & Azevedo, J. C. R. de. (2018). Analysis of the phytoplankton community emphasizing cyanobacteria in four cascade reservoirs system of the Iguazu River, Paraná, Brazil. *RBRH*, 23, e6.
- Aguirre-Gomez, R., Weeks, A. R., & Boxall, S. R. (2001). The identification of phytoplankton pigments from absorption spectra. *International Journal of Remote Sensing*, 22(2-3), 315-338. <https://doi.org/10.1080/014311601449952>
- Alonso, J., Quintans, F., Taks, J., Conde, D., Chalar, G., Bonilla, S., Arocena, R., Haakonsson, S., Aubriot, L., & Goyenola, G. (2019). Water Quality in Uruguay: Current status and challenges. *Water Quality in the Americas. Risks and Opportunities*. Mexico: IANAS, 561-597.
- Aubriot, L., Zabaleta, B., Bordet, F., Sienra, D., Risso, J., Achkar, M., & Somma, A. (2020). Assessing the origin of a massive cyanobacterial bloom in the Río de la Plata (2019): Towards an early warning system. *Water Research*, 181, 115944.
- Barreiro, M. (2010). Influence of ENSO and the South Atlantic Ocean on climate predictability over Southeastern South America. *Climate dynamics*, 35, 1493-1508.
- Barros, V. R., Boninsegna, J. A., Camilloni, I. A., Chidiak, M., Magrín, G. O., & Rusticucci, M. (2015). Climate change in Argentina: Trends, projections, impacts and adaptation. *WIREs Climate Change*, 6(2), 151-169. <https://doi.org/10.1002/wcc.316>
- Berón, L. E. (1990). Features of the limnological behavior of Salto Grande's reservoir (Argentina-Uruguay). *Ecological Modelling*, 52, 87-102.
- Berri, G. J., Ghietto, M. A., & García, N. O. (2002). The influence of ENSO in the flows of the Upper Paraná River of South America over the past 100 years. *Journal of Hydrometeorology*, 3(1), 57-65.
- Bertone, E., Burford, M. A., & Hamilton, D. P. (2018). Fluorescence probes for real-time remote cyanobacteria monitoring: A review of challenges and opportunities. *Water*
- Bonilla, S., Aubriot, L., Brena, B., Britos, A., Conde, D., Challar, G., De Leon, L., Fabre, A., Gabito, L., Gravier, A., Hein, V., Kruk, C., Pérez Baliero, M. del C., Piccini, C., Rodríguez-Gallego, L., & Vidal, L. (2009). *Cianobacterias Planctónicas del Uruguay Manual para la identificación y medidas de gestión*.
- 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. *Innotec*, 22.
- Bonilla, S., & Conde, D. (2000). El fitoplancton como descriptor sensible de cambios ambientales en las lagunas costeras de la Reserva Bañados del Este. *Seminario-Taller sobre monitoreo ambiental*, 31.
- Bonilla, S., Pérez, M., & De León, L. (1995). Cianofíceas Planctónicas del Lago Ton-Ton, Canelones, Uruguay. *Hoehnea*, 21, 185-192.
- Bordet, F., Fontanarrosa, M. S., & O'farrell, I. (2017). Influence of light and mixing regime on bloom-forming phytoplankton in a subtropical reservoir. *River Research and Applications*, 33(8), 1315-1326.
- Boschi, E. E. (1988). El ecosistema estuarial del Río de la Plata. 15, 159-182.
- Bouaïcha, N., Miles, C. O., Beach, D. G., Labidi, Z., Djabri, A., Benayache, N. Y., & Nguyen-Quang, T. (2019). Structural Diversity, Characterization and Toxicology of Microcystins. *Toxins*, 11(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/toxins11120714>

- Brewin, R. J., Raitsos, D. E., Dall'Olmo, G., Zarokanellos, N., Jackson, T., Racault, M.-F., Boss, E. S., Sathyendranath, S., Jones, B. H., & Hoteit, I. (2015). Regional ocean-colour chlorophyll algorithms for the Red Sea. *Remote Sensing of Environment*, 165, 64-85.
- Bricaud, A., Claustre, H., Ras, J., & Oubelkheir, K. (2004). Natural variability of phytoplanktonic absorption in oceanic waters: Influence of the size structure of algal populations. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 109(C11), 2004JC002419. <https://doi.org/10.1029/2004JC002419>
- Brown, J. H., Gillooly, J. F., Allen, A. P., Savage, V. M., & West, G. B. (2004). TOWARD A METABOLIC THEORY OF ECOLOGY. *Ecology*, 85(7), 1771-1789. <https://doi.org/10.1890/03-9000>
- Burkholder, J. M., Kinder, C. A., Dickey, D. A., Reed, R. E., Arellano, C., James, J. L., Mackenzie, L. M., Allen, E. H., Lindor, N. L., & Mathis, J. G. (2022). Classic indicators and diel dissolved oxygen versus trend analysis in assessing eutrophication of potable-water reservoirs. *Ecological Applications*, 32(4), e2541.
- Cardini, J. C., Zabalett, A., & Reguero, G. P. (2017). Análisis de la propagación de condiciones de eutrofización en el Río Uruguay aguas abajo de la represa de Salto Grande mediante HEC-RAS.
- Carmichael, W. W., & Falconer, I. R. (1993). Diseases related to freshwater blue-green algal toxins, and control measures. *Algal toxins in seafood and drinking water*, 187-209.
- Carmichael, W. W., Mahmood, N. A., & Hyde, E. G. (1990). *Natural toxins from cyanobacteria (blue-green algae)*. ACS Publications.
- Chalar, G. (2009). The use of phytoplankton patterns of diversity for algal bloom management. *Limnologica*, 39(3), 200-208.
- Chalar, G., De León, L., De León, R., Fabián, D., & Gorga, J. (1993). Evaluación de la eutrofización del Embalse de Salto Grande. Análisis de las relaciones entre los parámetros físico-químicos y biológicos. Informe Técnico de la primera etapa.
- Chalar, G., Gerhard, M., González-Piana, M., & Fabián, D. (2014). Hidroquímica y eutrofización en tres embalses subtropicales en cadena. Procesos geoquímicos superficiales en Sudamérica. Bahía Blanca: SiFyQA, 121-148.
- Che, L., & Wan, L. (2022). Water Quality Analysis and Evaluation of Eutrophication in a Swamp Wetland in the Permafrost Region of the Lesser Khingan Mountains, China. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 108(2), 234-242.
- Chorus, I. (2012). Current Approaches to Cyanotoxin Risk Assessment. *Risk Management and Regulations in Different Countries*, 63, 1-147.
- Chorus, I., & Welker, M. (2021). *Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. Taylor & Francis.
- Ciotti, Á. M., Lewis, M. R., & Cullen, J. J. (2002). Assessment of the relationships between dominant cell size in natural phytoplankton communities and the spectral shape of the absorption coefficient. *Limnology and Oceanography*, 47(2), 404-417. <https://doi.org/10.4319/lo.2002.47.2.0404>
- Cohan, F. M. (2002). What are Bacterial Species? *Annual Review of Microbiology*, 56(1), 457-487. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160634>
- Cohan, F. M., & Perry, E. B. (2007). A systematics for discovering the fundamental units of bacterial diversity. *Current biology*, 17(10), R373-R386.
- Cook, W. O., Beasley, V. R., Dahlem, A. M., Dellinger, J. A., Harlin, K. S., & Carmichael, W. W. (1988). Comparison of effects of anatoxin-a (s) and paraoxon, physostigmine and pyridostigmine on mouse brain cholinesterase activity. *Toxicol*, 26(8), 750-753.

- Cordeiro-Araújo, M. K., Lorenzi, A. S., Chia, M. A., Mota, E. C., & do Carmo Bittencourt-Oliveira, M. (2022). Insights into the impact of increasing temperature, light intensity, and UV-B exposure on the circadian rhythm of microcystin production and release, and the expression of *mcy* genes in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Applied Phycology*, 1-12.
- Cox, P. A., Banack, S. A., Murch, S. J., Rasmussen, U., Tien, G., Bidigare, R. R., Metcalf, J. S., Morrison, L. F., Codd, G. A., & Bergman, B. (2005). Diverse taxa of cyanobacteria produce  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(14), 5074-5078.
- Cunha, D. G. F., do Carmo Calijuri, M., & Lamparelli, M. C. (2013). A trophic state index for tropical/subtropical reservoirs (TSI<sub>tr</sub>). *Ecological Engineering*, 60, 126-134.
- Davis, T. W., Berry, D. L., Boyer, G. L., & Gobler, C. J. (2009). The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacteria blooms. *Harmful algae*, 8(5), 715-725.
- De Leon, L., & Yunes, J. S. (2001). First report of a microcystin-containing bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in the La Plata River, South America. *Environmental Toxicology: An International Journal*, 16(1), 110-112.
- Debastiani, J. R., Naliato, D. A. de O., Perbiche-Neves, G., & Nogueira, M. G. (2016). Fluvial lateral environments in Río de La Plata basin: Effects of hydropower damming and eutrophication. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 28. <https://www.scielo.br/j/alb/a/txDZHvpvyY6XG3tz3HmvLWb/?lang=en>
- Deus Álvarez, S. (2015). Caracterización morfológica, genética y óptica de floraciones tóxicas y no tóxicas del Complejo *Microcystis aeruginosa*. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/19431>
- Deus, S. D., Kruk, C., Martínez de la Escalera, G., Montes, M. A., Segura, A. M., & Piccini, C. (2020). Morphology captures toxicity in *Microcystis aeruginosa* complex: Evidence from a wide environmental gradient☆. *Harmful Algae*, 97, 101854. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101854>
- Dias, E., Andrade, M., Alverca, E., Pereira, P., Batoréu, M. C. C., Jordan, P., & Silva, M. J. (2009). Comparative study of the cytotoxic effect of microcystin-LR and purified extracts from *Microcystis aeruginosa* on a kidney cell line. *Toxicon*, 53(5), 487-495.
- Dick, G. J., Duhaime, M. B., Evans, J. T., Errera, R. M., Godwin, C. M., Kharbush, J. J., Nitschky, H. S., Powers, M. A., Vanderploeg, H. A., Schmidt, K. C., Smith, D. J., Yancey, C. E., Zwiars, C. C., & Deneff, V. J. (2021). The genetic and ecophysiological diversity of *Microcystis*. *Environmental Microbiology*, 23(12), 7278-7313. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15615>
- Dziallas, C., & Grossart, H.-P. (2011). Increasing oxygen radicals and water temperature select for toxic *Microcystis* sp. *PLoS One*, 6(9), e25569.
- Falconer, I. R. (1991). Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 6(2), 177-184. <https://doi.org/10.1002/tox.2530060207>
- Ferrari, G., Pérez, M. de C., Dabezies, M., Míguez, D., & Saizar, C. (2011). Planktic cyanobacteria in the lower Uruguay river, South America. *Fottea*, 11(1), 225-234.
- Fleming, L. E., Rivero, C., Burns, J., Williams, C., Bean, J. A., Shea, K. A., & Stinn, J. (2002). Blue green algal (cyanobacterial) toxins, surface drinking water, and liver cancer in Florida. *Harmful algae*, 1(2), 157-168.
- Framiñan, M. B., & Brown, O. B. (1996). Study of the Río de la Plata turbidity front, Part 1: Spatial and temporal distribution. *Continental Shelf Research*, 16(10), 1259-1282.

- Funari, E., & Testai, E. (2008). Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. *Critical reviews in toxicology*, 38(2), 97-125.
- Furukawa, K., Noda, N., Tsuneda, S., Saito, T., Itayama, T., & Inamori, Y. (2006). Highly sensitive real-time PCR assay for quantification of toxic cyanobacteria based on microcystin synthetase A gene. *Journal of bioscience and bioengineering*, 102(2), 90-96.
- García-Alonso, J., Lercari, D., Araujo, B. F., Almeida, M. G., & Rezende, C. E. (2017). Total and extractable elemental composition of the intertidal estuarine biofilm of the Río de la Plata: Disentangling natural and anthropogenic influences. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 187, 53-61.
- García-Pichel, F., Lombard, J., Soule, T., Dunaj, S., Wu, S. H., & Wojciechowski, M. F. (2019). Timing the evolutionary advent of cyanobacteria and the later great oxidation event using gene phylogenies of a sunscreen. *MBio*, 10(3), e00561-19.
- García-Rodríguez, F., Brugnoli, E., Muniz, P., Venturini, N., Burone, L., Hutton, M., Rodríguez, M., Pita, A., Kandravicius, N., & Pérez, L. (2013). Warm-phase ENSO events modulate the continental freshwater input and the trophic state of sediments in a large South American estuary. *Marine and Freshwater Research*, 65(1), 1-11.
- Giannuzzi, L., Sedan, D., Echenique, R., & Andrinolo, D. (2011). An acute case of intoxication with cyanobacteria and cyanotoxins in recreational water in Salto Grande Dam, Argentina. *Marine Drugs*, 9(11), 2164-2175.
- Godoy, R. F. B., Trevisan, E., Battistelli, A. A., Crisigiovanni, E. L., do Nascimento, E. A., & da Fonseca Machado, A. L. (2023). Does water temperature influence in microcystin production? A case study of Billings Reservoir, São Paulo, Brazil. *Journal of Contaminant Hydrology*, 255, 104164. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2023.104164>
- Gons, H. J., Auer, M. T., & Effler, S. W. (2008). MERIS satellite chlorophyll mapping of oligotrophic and eutrophic waters in the Laurentian Great Lakes. *Remote Sensing of Environment*, 112(11), 4098-4106.
- González-Piana, M., Fabián, D., Piccardo, A., & Chalar, G. (2017). Dynamics of total microcystin LR concentration in three subtropical hydroelectric generation reservoirs in Uruguay, South America. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 99, 488-492.
- González-Piana, M., Piccardo, A., Ferrer, C., Brena, B., Pérez, M., Fabián, D., & Chalar, G. (2018). Effects of wind mixing in a stratified water column on toxic cyanobacteria and Microcystin-LR distribution in a subtropical reservoir. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 101, 611-616.
- Goyenola, G., Meerhoff, M., Teixeira-de Mello, F., González-Bergonzoni, I., Graeber, D., Fosalba, C., Vidal, N., Mazzeo, N., Ovesen, N. B., & Jeppesen, E. (2015). Monitoring strategies of stream phosphorus under contrasting climate-driven flow regimes. *Hydrology and Earth System Sciences*, 19(10), 4099-4111.
- Graham, J. L., & Jones, J. R. (2007). Microcystin distribution in physical size class separations of natural plankton communities. *Lake and Reservoir Management*, 23(2), 161-168.
- Guerrero, R. A., Acha, E. M., Framin, M. B., & Lasta, C. A. (1997). Physical oceanography of the Río de la Plata Estuary, Argentina. *Continental shelf research*, 17(7), 727-742.
- Haakonsson, S., Rodríguez-Gallego, L., Somma, A., & Bonilla, S. (2017). Temperature and precipitation shape the distribution of harmful cyanobacteria in subtropical lotic and lentic ecosystems. *Science of The Total Environment*, 609, 1132-1139. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.067>

- Hamilton, D. P., Wood, S. A., Dietrich, D. R., & Puddick, J. (2014). Costs of harmful blooms of freshwater cyanobacteria. *Cyanobacteria: An economic perspective*, 245-256.
- Harke, M. J., Steffen, M. M., Gobler, C. J., Otten, T. G., Wilhelm, S. W., Wood, S. A., & Paerl, H. W. (2016). A review of the global ecology, genomics, and biogeography of the toxic cyanobacterium, *Microcystis* spp. *Harmful algae*, 54, 4-20.
- Harke, M. J., Steffen, M. M., Gobler, C. J., Otten, T. G., Wilhelm, S. W., Wood, S. A., & Havens, K. E. (2008). Cyanobacteria blooms: Effects on aquatic ecosystems. *Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs*, 733-747.
- Hjelmsø, M. H., Hansen, L. H., Bælum, J., Feld, L., Holben, W. E., & Jacobsen, C. S. (2014). High-resolution melt analysis for rapid comparison of bacterial community compositions. *Applied and environmental microbiology*, 80(12), 3568-3575.
- Hoek, C., Mann, D., Jahns, H. M., & Jahns, M. (1995). *Algae: An introduction to phycology*. Cambridge university press.
- Hofinger, B. J., Jing, H.-C., Hammond-Kosack, K. E., & Kanyuka, K. (2009). High-resolution melting analysis of cDNA-derived PCR amplicons for rapid and cost-effective identification of novel alleles in barley. *Theoretical and Applied Genetics*, 119, 851-865.
- Hoguane, A. M., Green, C. L., Bowers, D. G., & Nordez, S. (2012). A note on using a digital camera to measure suspended sediment load in Maputo Bay, Mozambique. *Remote Sensing Letters*, 3(3), 259-266. <https://doi.org/10.1080/01431161.2011.566287>
- Hu, C., Lee, Z., Ma, R., Yu, K., Li, D., & Shang, S. (2010). Moderate Resolution Imaging Spectroradiometer (MODIS) observations of cyanobacteria blooms in Taihu Lake, China. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 115(C4). <https://doi.org/10.1029/2009JC005511>
- Huisman, J., Matthijs, H. C. P., & Visser, P. M. (2005). *Harmful Cyanobacteria*. Dordrecht, The Netherlands Springer. <https://dare.uva.nl/search?identifier=56f3f838-6017-4c0a-8967-647461d5bf47>
- Humpage, A. (2008). Toxin types, toxicokinetics and toxicodynamics. *Cyanobacterial harmful algal blooms: State of the science and research needs*, 383-415.
- Ibelings, B. W., Kroon, B. M., & Mur, L. R. (1994). Acclimation of photosystem II in a cyanobacterium and a eukaryotic green alga to high and fluctuating photosynthetic photon flux densities, simulating light regimes induced by mixing in lakes. *New Phytologist*, 128(3), 407-424.
- Informe Calidad Ambiental del Río Negro, 2009—2017. (s. f.). Ministerio de Ambiente. Recuperado 28 de abril de 2023, de <https://www.gub.uy/ministerio-ambiente/comunicacion/publicaciones/informe-calidad-ambiental-del-rio-negro-2009-2017>
- Jiang, L. J., L. Y. Yang, L. Xiao, X. L. Shi, G. Gao and B. Q. Qin (2007). "Quantitative studies on phosphorus transference occurring between *Microcystis aeruginosa* and its attached bacterium (*Pseudomonas* sp.)." *Hydrobiologia* 581: 161-165
- Joung, S.-H., Oh, H.-M., Ko, S.-R., & Ahn, C.-Y. (2011). Correlations between environmental factors and toxic and non-toxic *Microcystis* dynamics during bloom in Daechung Reservoir, Korea. *Harmful Algae*, 10(2), 188-193.
- Jungmann, D., Ludwichowski, K.-U., Faltin, V., & Benndorf, J. (1996). A field study to investigate environmental factors that could effect microcystin synthesis of a *Microcystis* population in the Bautzen reservoir. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie*, 81(4), 493-501.

- Kaebnick, M., Neilan, B. A., Börner, T., & Dittmann, E. (2000). Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. *Applied and environmental microbiology*, 66(8), 3387-3392.
- Kaplan-Levy, R. N., Hadas, O., Summers, M. L., Rücker, J., & Sukenik, A. (2010). Akinetes: Dormant cells of cyanobacteria. *Dormancy and resistance in harsh environments*, 5-27.
- Karjalainen, M., Engström-Öst, J., Korpinen, S., Peltonen, H., Pääkkönen, J.-P., Rönkkönen, S., Suikkanen, S., & Viitasalo, M. (2007). Ecosystem consequences of cyanobacteria in the northern Baltic Sea. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 36(2), 195-202.
- Kassambara, A., & Kassambara, M. A. (2020). Package 'ggpubr'. R package version 0.1, 6(0).
- Kasting, J. F., & Siefert, J. L. (2002). Life and the evolution of Earth's atmosphere. *Science*, 296(5570), 1066-1068.
- Kessel, M., & Eloff, J. N. (1975). The ultrastructure and development of the colonial sheath of *Microcystis marginata*. *Archives of Microbiology*, 106, 209-214.
- Kim, S.-G., Joung, S.-H., Ahn, C.-Y., Ko, S.-R., Boo, S. M., & Oh, H.-M. (2010). Annual variation of *Microcystis* genotypes and their potential toxicity in water and sediment from a eutrophic reservoir. *FEMS microbiology ecology*, 74(1), 93-102.
- Kirk, J. T. (1994). *Light and photosynthesis in aquatic ecosystems*. Cambridge university press.
- Komárek, J., & Komárková, J. (2002). Review of the European *Microcystis* morphospecies (Cyanoprokaryotes) from nature. *Fottea*, 2(1), 1-24.
- Kotovirta, V., Toivanen, T., Järvinen, M., Lindholm, M., & Kallio, K. (2014). Participatory surface algal bloom monitoring in Finland in 2011–2013. *Environmental Systems Research*, 3, 1-11.
- Kruk, C.; Vidal, L; Aubriot, L; Bonilla, S; Brena, B. (2009). Metodologías de análisis de cianobacterias, *Cianobacterias Planctónicas del Uruguay Manual para la identificación y medidas de gestión*. Documento técnico del PHI-LAC, 16.
- Kruk, C., & De León, L. (2002). Asociaciones de fitoplancton en lagos y embalses del Uruguay: Validación y aplicación a la gestión de sistemas acuáticos. *El agua en Iberoamérica: de la limnología a la gestión en Sudamérica*. Buenos Aires: CYTED XVII, CETA, 143-155.
- Kruk, C., Huszar, V. L. M., Peeters, E. T. H. M., Bonilla, S., Costa, L., Lüring, M., Reynolds, C. S., & Scheffer, M. (2010). A morphological classification capturing functional variation in phytoplankton. *Freshwater Biology*, 55(3), 614-627. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2009.02298.x>
- KRUK, C., MARTÍNEZ, A., DE LA ESCALERA, G., TRINCHIN, R., MANTA, G., SEGURA, A. M., PICCINI, C., BRENA, B., FABIANO, G., & PIREZ, M. (2019). Floración excepcional de cianobacterias tóxicas en la costa de Uruguay, verano 2019. *Innotec*, 18.
- Kruk, C., Martínez, A., Martínez de la Escalera, G., Trinchin, R., Manta, G., Segura, A. M., Piccini, C., Brena, B., Yannicelli, B., Fabiano, G., & Calliari, D. (2021). Rapid freshwater discharge on the coastal ocean as a mean of long distance spreading of an unprecedented toxic cyanobacteria bloom. *Science of The Total Environment*, 754, 142362. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142362>
- Kruk, C., Mazzeo, N., Lacerot, G., & Reynolds, C. S. (2002). Classification schemes for phytoplankton: A local validation of a functional approach to the analysis of species temporal replacement. *Journal of plankton research*, 24(9), 901-912.

- Kruk, C., Piccini, C., Segura, A., Nogueira, L., Carballo, C., de la Escalera Siri, G. M., Calliari, D., Ferrari, G., Simoens, M., & Cea, J. (2015). Herramientas para el monitoreo y sistema de alerta de floraciones de cianobacterias nocivas: Río Uruguay y Río de la Plata. *INNOTEC*, 10 ene-dic, 23-39.
- Kruk, C., Segura, A. M., Nogueira, L., Alcántara, I., Calliari, D., de la Escalera, G. M., Carballo, C., Cabrera, C., Sarthou, F., & Scavone, P. (2017). A multilevel trait-based approach to the ecological performance of *Microcystis aeruginosa* complex from headwaters to the ocean. *Harmful Algae*, 70, 23-36.
- Kruk, C., Segura, A., Nogueira, L., Carballo, C., Martínez de la Escalera, G., Calliari, D., Ferrari, G., Simoens, M., Cea, J., & Alcántara, I. (s. f.). Herramientas para el monitoreo y sistema de alerta de floraciones de cianobacterias nocivas: Río Uruguay y Río de la Plata.
- 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*.
- Kruk, C., Vidal, L., & Hein, V. (2003). Floraciones de microalgas en sistemas continentales del Uruguay. I Encuentro de Ecología del Uruguay, Montevideo, Libro de Resúmenes. Facultad de Ciencias.
- Kurmayer, R., Christiansen, G., & Chorus, I. (2003). The abundance of microcystin-producing genotypes correlates positively with colony size in *Microcystis* sp. And determines its microcystin net production in Lake Wannsee. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 787-795.
- Kutser, T. (2004). Quantitative detection of chlorophyll in cyanobacterial blooms by satellite remote sensing. *Limnology and Oceanography*, 49(6), 2179-2189. <https://doi.org/10.4319/lo.2004.49.6.2179>
- Leeuw, T., & Boss, E. (2018). The HydroColor app: Above water measurements of remote sensing reflectance and turbidity using a smartphone camera. *Sensors*, 18(1), 256.
- Lepillanca, F., de la Escalera, G. M., Bordet, F., O'Farrell, I., & Piccini, C. (2018). Detección de poblaciones tóxicas de *Microcystis* spp. con distintas preferencias ambientales. Estudio de caso: Embalse de Salto Grande. *Innotec*, 16 jul-dic, 08-16.
- Li, J., Xian, X., Xiao, X., Li, S., & Yu, X. (2023). Dynamic characteristics of total and microcystin-producing *Microcystis* in a large deep reservoir. *Environmental Pollution*, 122256.
- Li, L., Li, L., Shi, K., Li, Z., & Song, K. (2012). A semi-analytical algorithm for remote estimation of phycocyanin in inland waters. *Science of the Total Environment*, 435, 141-150.
- Li, M., Zhu, W., & Li, X. (2013). Effects of linear alkylbenzene sulfonate on extracellular polysaccharide content and cells per particle of *Microcystis aeruginosa* and *Scenedesmus obliquus*. *Fresenius Environmental Bulletin*, 22(4b), 1189-1194.
- Li, Y., Chen, J., Zhao, Q., Pu, C., Qiu, Z., Zhang, R., & Shu, W. (2011). A Cross-Sectional Investigation of Chronic Exposure to Microcystin in Relationship to Childhood Liver Damage in the Three Gorges Reservoir Region, China. *Environmental Health Perspectives*, 119(10), 1483-1488. <https://doi.org/10.1289/ehp.1002412>
- MacKintosh, C., Beattie, K. A., Klumpp, S., Cohen, P., & Codd, G. A. (1990). Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS letters*, 264(2), 187-192.

- Manali, K. M., Arunraj, R., Kumar, T., & Ramya, M. (2017). Detection of microcystin producing cyanobacteria in Spirulina dietary supplements using multiplex HRM quantitative PCR. *Journal of Applied Phycology*, 29, 1279-1286.
- Martínez De La Escalera, G., Antoniades, 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.
- Martínez de la Escalera, G. M., Kruk, C., Segura, A. M., Nogueira, L., Alcántara, I., & Piccini, C. (2017). Dynamics of toxic genotypes of *Microcystis aeruginosa* complex (MAC) through a wide freshwater to marine environmental gradient. *Harmful algae*, 62, 73-83.
- Martínez de la Escalera, G., Segura, A. M., Kruk, C., Ghattas, B., Cohan, F. M., Iriarte, A., & Piccini, C. (2022). Genotyping and Multivariate Regression Trees Reveal Ecological Diversification within the *Microcystis aeruginosa* Complex along a Wide Environmental Gradient. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(3), e01475-21. <https://doi.org/10.1128/aem.01475-21>
- Martínez de la Escalera Siri, G. (2019). Dinámica y condicionantes ambientales de genotipos tóxicos del complejo *Microcystis aeruginosa* en el río Uruguay y Río de la Plata. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/24736>
- Massey, I. Y., Al Osman, M., & Yang, F. (2022). An overview on cyanobacterial blooms and toxins production: Their occurrence and influencing factors. *Toxin Reviews*, 41(1), 326-346. <https://doi.org/10.1080/15569543.2020.1843060>
- Matthews, M. W., Bernard, S., & Robertson, L. (2012). An algorithm for detecting trophic status (chlorophyll-a), cyanobacterial-dominance, surface scums and floating vegetation in inland and coastal waters. *Remote Sensing of Environment*, 124, 637-652. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2012.05.032>
- Mazzeo, N., Clemente, J., García-Rodríguez, F., Gorja, J., Kruk, C., Larrea, D., Meerhoff, M., Quintans, F., Rodríguez-Gallego, L., & Scasso, F. (2002). Eutrofización: Causas, consecuencias y manejo. 39–55. Rodríguez, A., R. Prieto y M. Achkar. *Perfil Ambiental de Uruguay*. Grupo de Ecología y Rehabilitación de sistemas acuáticos someros, Departamento de Ecología, Facultad de Ciencias, Aigua.
- Mishra, S., & Mishra, D. R. (2014). A novel remote sensing algorithm to quantify phycocyanin in cyanobacterial algal blooms. *Environmental Research Letters*, 9(11), 114003.
- Mishra, S., Mishra, D. R., Lee, Z., & Tucker, C. S. (2013). Quantifying cyanobacterial phycocyanin concentration in turbid productive waters: A quasi-analytical approach. *Remote Sensing of Environment*, 133, 141-151. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2013.02.004>
- Mituletu, M., Druga, B., Hegedus, A., Coman, C., & Dragos, N. (2013). Phylogenetic analysis of *Microcystis* strains (Cyanobacteria) based on the 16S-23S ITS and *cpcBA-IGS* markers. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 18(1), 22.
- Mobley, C. D. (1994). *Light and water: Radiative transfer in natural waters*. (No Title). <https://cir.nii.ac.jp/crid/1130282269840486656>
- Mugani, R., El Khalloufi, F., Kasada, M., Redouane, E. M., Haida, M., Aba, R. P., Essadki, Y., Zerrifi, S. E. A., Herter, S.-O., Hejjaj, A., Aziz, F., Ouazzani, N., Azevedo, J., Campos, A., Putschew, A., Grossart, H.-P., Mandi, L., Vasconcelos, V., & Oudra, B. (2024). Monitoring of toxic cyanobacterial blooms in Lalla Takerkoust reservoir by satellite imagery and microcystin transfer to surrounding farms. *Harmful Algae*, 135, 102631. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2024.102631>



- Muggeo, V. M., & Muggeo, M. V. M. (2017). Package 'segmented'. *Biometrika*, 58(525-534), 516.
- Nagy, G. J., Gómez-Erache, M., López, C. H., & Perdomo, A. C. (2002). Distribution patterns of nutrients and symptoms of eutrophication in the Rio de la Plata River Estuary System. *Nutrients and Eutrophication in Estuaries and Coastal Waters: Proceedings of the 31st Symposium of the Estuarine and Coastal Sciences Association (ECSA)*, held in Bilbao, Spain, 3–7 July 2000, 125-139.
- Nagy, G., Martínez, C., Caffera, R., Pedrosa, G., Forbes, E., Perdomo, A., & López Laborde, J. (1998). Marco hidrológico y climático del Río de la Plata. *El Río de la Plata. Una Revisión Ambiental. Un informe de Antecedentes del Proyecto EcoPlata*. Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, Canada, 17-70.
- Neilan, B. A., Jacobs, D., & Goodman, A. E. (1995). Genetic diversity and phylogeny of toxic cyanobacteria determined by DNA polymorphisms within the phycocyanin locus. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(11), 3875-3883. <https://doi.org/10.1128/aem.61.11.3875-3883.1995>
- Novoa, S., Wernand, M., & van der Woerd, H. J. (2014). The Forel-Ule scale converted to modern tools for participatory water quality monitoring. *Proceedings of the Extended Abstract Ocean Optics Conference XXII*, Portland, OR, USA, 20.
- O'Farrell, I., Bordet, F., & Chaparro, G. (2012). Bloom forming cyanobacterial complexes co-occurring in a subtropical large reservoir: Validation of dominant eco-strategies. En N. Salmaso, L. Naselli-Flores, L. Cerasino, G. Flaim, M. Tolotti, & J. Padisák (Eds.), *Phytoplankton responses to human impacts at different scales* (pp. 175-190). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-5790-5\\_14](https://doi.org/10.1007/978-94-007-5790-5_14)
- O'farrell, I., & Izaguirre, I. (2014). Phytoplankton of the middle and lower stretches of the Uruguay River.
- Oliver, R. L., & Ganf, G. G. (2000). Freshwater blooms. En *The ecology of cyanobacteria: Their diversity in time and space* (pp. 149-194). Springer.
- O'Neil, J. M., Davis, T. W., Burford, M. A., & Gobler, C. J. (2012). The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful algae*, 14, 313-334.
- Orr, P. T., & Jones, G. J. (1998). Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures. *Limnology and oceanography*, 43(7), 1604-1614.
- Otsuka, S., Suda, S., Li, R., Watanabe, M., Oyaizu, H., Matsumoto, S., Watanabe, & M. M. (1999). Characterization of morphospecies and strains of the genus *Microcystis* (Cyanobacteria) for a reconsideration of species classification. *Phycological Research*, 47(3), 189-197.
- Otsuka, S., Suda, S., Li, R., Watanabe, M., Oyaizu, H., Matsumoto, S., & Watanabe, M. M. (1999). Characterization of morphospecies and strains of the genus *Microcystis* (Cyanobacteria) for a reconsideration of species classification. *Phycological Research*, 47(3), 189-197. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.1999.tb00298.x>
- Otsuka, S., Suda, S., Shibata, S., Oyaizu, H., Matsumoto, S., & Watanabe, M. M. (2001). A proposal for the unification of five species of the cyanobacterial genus *Microcystis* Kützing ex Lemmermann 1907 under the rules of the Bacteriological Code. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(3), 873-879.
- Paerl, H. W., & Huisman, J. (2008). Blooms like it hot. *Science*, 320(5872), 57-58.
- Paerl, H. W., & Huisman, J. (2009). Climate change: A catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environmental microbiology reports*, 1(1), 27-37.

- Paerl, H. W., & Otten, T. G. (2013). Harmful cyanobacterial blooms: Causes, consequences, and controls. *Microbial ecology*, 65, 995-1010.
- Penalba, O. C., & Rivera, J. A. (2016). Precipitation response to El Niño/La Niña events in Southern South America—emphasis in regional drought occurrences. *Advances in Geosciences*, 42, 1-14.
- Pérez, M. D. C., Bonilla, S., De León, L., Šmarda, J., & Komárek, J. (1999). A bloom of *Nodularia baltica-spumigena* group (Cyanobacteria) in a shallow coastal lagoon of Uruguay, South America. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes*, 91-101.
- Pérez-Carrascal, O. M., Terrat, Y., Giani, A., Fortin, N., Greer, C. W., Tromas, N., & Shapiro, B. J. (2019). Coherence of *Microcystis* species revealed through population genomics. *The ISME Journal*, 13(12), 2887-2900.
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D., & Team, R. C. (2007). Linear and nonlinear mixed effects models. *R package version*, 3(57), 1-89.
- Pérez, M., Gonzalez-Sapienza, G., Sienna, D., Ferrari, G., Last, M., Last, J. A., & Brena, B. M. (2013). Limited analytical capacity for cyanotoxins in developing countries may hide serious environmental health problems: Simple and affordable methods may be the answer. *Journal of Environmental Management*, 114, 63-71.
- Pohlert, T. (2014). The pairwise multiple comparison of mean ranks package (PMCMR). *R package*, 27(2019), 9.
- Potts, M., & Whitton, B. A. (2000). *The ecology of cyanobacteria: Their diversity in time and space*. Kluwer Academic.
- Preisendorfer, R. W. (1976). *Hydrologic Optics. Volume 2. Foundations*. Honolulu: US Dept. of Commerce, National Oceanic and Atmospheric ....  
<https://udspace.udel.edu/server/api/core/bitstreams/98d87723-a484-458f-a216-465cd94e5c31/content>
- Quirós, R., & Luchini, L. (1982a). Características limnológicas del embalse de Salto Grande, III: Fitoplancton y su relación con parámetros ambientales.[Limnological features of the Salto Grande reservoir, III: phytoplankton and its relationship with environmental parameters]. *Revista de la Asociación de Ciencias Naturales del Litoral*, 13(1), 49-66.
- Quirós, R., & Luchini, L. (1982b). Características limnológicas del embalse de Salto Grande, III: fitoplancton y su relación con parámetros ambientales.[Limnological features of the Salto Grande reservoir, III: phytoplankton and its relationship with environmental parameters]. *Revista de la Asociación de Ciencias Naturales del Litoral*, 13(1), 49-66.
- R Core Team, R. (2013). *R: A language and environment for statistical computing*.
- Ramsay, J. O., Wickham, H., Graves, S., & Hooker, G. (2014). *fda: Functional data analysis*. *R package version*, 2(4), 142.
- Rantala, A., Rajaniemi-Wacklin, P., Lyra, C., Lepistö, L., Rintala, J., Mankiewicz-Boczek, J., & Sivonen, K. (2006). Detection of microcystin-producing cyanobacteria in Finnish lakes with genus-specific microcystin synthetase gene E (*mcyE*) PCR and associations with environmental factors. *Applied and environmental microbiology*, 72(9), 6101-6110.
- Reynolds, C. S. (1984). *The ecology of freshwater phytoplankton*. Cambridge university press.
- Reynolds, C. S. (2006). *The ecology of phytoplankton*. Cambridge University Press.  
<https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=gDz5jGsPWZYC&oi=fnd&pg=PA1&dq=The+ecology+of+phytoplankton.+P.+in.:+Cambridge+University+Press.&ots=tVuQ2dkAiR&sig=QwvKOhraeGxIUli8aoEbeLLOMms>

- Reynolds, C. S., Huszar, V., Kruk, C., Naselli-Flores, L., & Melo, S. (2002). Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. *Journal of plankton research*, 24(5), 417-428.
- Reynolds, C. S., Jaworski, G. H. M., Cmiech, H. A., Leedale, G. F., & Lund, J. W. G. (1981). On the annual cycle of the blue-green alga *Microcystis Aeruginosa* Kütz. Emend. Elenkin. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 293(1068), 419-477. <https://doi.org/10.1098/rstb.1981.0081>
- Rinta-Kanto, J. M., Konopko, E. A., DeBruyn, J. M., Bourbonniere, R. A., Boyer, G. L., & Wilhelm, S. W. (2009). Lake Erie Microcystis: Relationship between microcystin production, dynamics of genotypes and environmental parameters in a large lake. *Harmful algae*, 8(5), 665-673.
- Rinta-Kanto, J. M., & Wilhelm, S. W. (2006). Diversity of Microcystin-Producing Cyanobacteria in Spatially Isolated Regions of Lake Erie. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), 5083-5085. <https://doi.org/10.1128/AEM.00312-06>
- Ripley, B., Venables, B., Bates, D. M., Hornik, K., Gebhardt, A., Firth, D., & Ripley, M. B. (2013). Package 'mass'. *Cran r*, 538, 113-120.
- Robson, B. J., & Hamilton, D. P. (2003). Summer flow event induces a cyanobacterial bloom in a seasonal Western Australian estuary. *Marine and Freshwater Research*, 54(2), 139-151.
- Rodríguez-Gallego, L. (2011). Eutrofización de las lagunas costeras de Uruguay: Impacto y optimización de los usos del suelo.
- Rodríguez-Gallego, L., Achkar, M., Defeo, O., Vidal, L., Meerhoff, E., & Conde, D. (2017). Effects of land use changes on eutrophication indicators in five coastal lagoons of the Southwestern Atlantic Ocean. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 188, 116-126.
- Ross, C., Santiago-Vázquez, L., & Paul, V. (2006). Toxin release in response to oxidative stress and programmed cell death in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic toxicology*, 78(1), 66-73.
- Ross, C., Warhurst, B. C., Brown, A., Huff, C., & Ochriotor, J. D. (2019). Mesohaline conditions represent the threshold for oxidative stress, cell death and toxin release in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic toxicology*, 206, 203-211.
- Saker, M., Moreira, C., Martins, J., Neilan, B., & Vasconcelos, V. M. (2009). DNA profiling of complex bacterial populations: Toxic cyanobacterial blooms. *Applied microbiology and biotechnology*, 85, 237-252.
- Saxton, M. A., Arnold, R. J., Bourbonniere, R. A., McKay, R. M. L., & Wilhelm, S. W. (2012). Plasticity of total and intracellular phosphorus quotas in *Microcystis aeruginosa* cultures and Lake Erie algal assemblages. *Frontiers in Microbiology*, 3, 3.
- Scasso, F., Mazzeo, N., Gorga, J., Kruk, C., Lacerot, G., Clemente, J., Fabián, D., & Bonilla, S. (2001). Limnological changes in a sub-tropical shallow hypertrophic lake during its restoration: Two years of a whole-lake experiment. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 11(1), 31-44.
- Sedan, D., Laguens, M., Copparoni, G., Aranda, J. O., Giannuzzi, L., Marra, C. A., & Andrinolo, D. (2015). Hepatic and intestine alterations in mice after prolonged exposure to low oral doses of Microcystin-LR. *Toxicol*, 104, 26-33.
- Segura, A. M., Piccini, C., Nogueira, L., Alcántara, I., Calliari, D., & Kruk, C. (2017). Increased sampled volume improves *Microcystis aeruginosa* complex (MAC) colonies detection and prediction using Random Forests. *Ecological Indicators*, 79, 347-354.

- Segura, A. M., Sarthou, F., & Kruk, C. (2018). Morphology-based differences in the thermal response of freshwater phytoplankton. *Biology Letters*, 14(5), 20170790. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2017.0790>
- Shi, K., Zhang, Y., Li, Y., Li, L., Lv, H., & Liu, X. (2015). Remote estimation of cyanobacteria-dominance in inland waters. *Water Research*, 68, 217-226. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.10.019>
- Siegel, H., Ohde, T., Gerth, M., Lavik, G., & Leipe, T. (2007). Identification of coccolithophore blooms in the SE Atlantic Ocean off Namibia by satellites and in-situ methods. *Continental Shelf Research*, 27(2), 258-274.
- Sienra, D., & Ferrari, G. (2006). Monitoreo de cianobacterias en la costa de Montevideo (Uruguay). *Bases para la conservación y el manejo de la costa uruguaya*. Montevideo: Vida Silvestre, 413-420.
- Sipari, H., Rantala-Ylinen, A., Jokela, J., Oksanen, I., & Sivonen, K. (2010). Development of a Chip Assay and Quantitative PCR for Detecting Microcystin Synthetase E Gene Expression. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(12), 3797-3805. <https://doi.org/10.1128/AEM.00452-10>
- Soja-Woźniak, M., Craig, S. E., Kratzer, S., Wojtasiewicz, B., Darecki, M., & Jones, C. T. (2017). A Novel Statistical Approach for Ocean Colour Estimation of Inherent Optical Properties and Cyanobacteria Abundance in Optically Complex Waters. *Remote Sensing*, 9(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/rs9040343>
- Sommaruga, R., Chen, Y., & Liu, Z. (2009). Multiple strategies of bloom-forming *Microcystis* to minimize damage by solar ultraviolet radiation in surface waters. *Microbial ecology*, 57, 667-674.
- Svirčev, Z., KRSTIČ, S., Miladinov-Mikov, M., BALTIČ, V., & VIDOVIČ, M. (2009). Freshwater cyanobacterial blooms and primary liver cancer epidemiological studies in Serbia. *Journal of Environmental Science and Health Part C*, 27(1), 36-55.
- Tanabe, Y., Sano, T., Kasai, F., & Watanabe, M. M. (2009). Recombination, cryptic clades and neutral molecular divergence of the microcystin synthetase (*mcy*) genes of toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *BMC Evolutionary Biology*, 9(1), 115. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-115>
- ThermoFisher Scientific. (2016). A simple way to help strengthen your study High-resolution melting for genotyping applications—Buscar con Google (Técnico 070383). [chrome-extension://efaidnbnmnnibpcajpcglclefindmkaj/https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/Application-Notes/cms\\_070383.pdf](chrome-extension://efaidnbnmnnibpcajpcglclefindmkaj/https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/Application-Notes/cms_070383.pdf)
- Therneau, T., Atkinson, B., Ripley, B., & Ripley, M. B. (2015). Package 'rpart'. Available online: <cran.ma.ic.ac.uk/web/packages/rpart/rpart.pdf> (accessed on 20 April 2016).
- Thomsen, N., Ali, R. G., Ahmed, J. N., & Arkell, R. M. (2012). High resolution melt analysis (HRMA); a viable alternative to agarose gel electrophoresis for mouse genotyping.
- Tillett, D., Dittmann, E., Erhard, M., Von Döhren, H., Börner, T., & Neilan, B. A. (2000). Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: An integrated peptide–polyketide synthetase system. *Chemistry & biology*, 7(10), 753-764.
- Tonk, L., Bosch, K., Visser, P. M., & Huisman, J. (2007). Salt tolerance of the harmful cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic microbial ecology*, 46(2), 117-123.
- Tromas, N., Taranu, Z. E., Martin, B. D., Willis, A., Fortin, N., Greer, C. W., & Shapiro, B. J. (2018). Niche separation increases with genetic distance among bloom-forming cyanobacteria. *Frontiers in Microbiology*, 9, 438.

- Vaillancourt, R. D., Brown, C. W., Guillard, R. R., & Balch, W. M. (2004). Light backscattering properties of marine phytoplankton: Relationships to cell size, chemical composition and taxonomy. *Journal of plankton research*, 26(2), 191-212.
- Vaitomaa, J., Rantala, A., Halinen, K., Rouhiainen, L., Tallberg, P., Mokolke, L., & Sivonen, K. (2003). Quantitative Real-Time PCR for Determination of Microcystin Synthetase E Copy Numbers for *Microcystis* and *Anabaena* in Lakes. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), 7289-7297. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7289-7297.2003>
- van der Meer, F. D. (2011). *Advances in environmental remote sensing sensors: Algorithms and applications*/ed. by W. Qihao, CRC Press-Taylor & Francis, London, 2011, 556 p., ISBN 978-1-4200-9175-5: book review. *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation (JAG)*, 13(5), 838-839.
- Vesterkvist, P. S., Misiorek, J. O., Spoo, L. E., Toivola, D. M., & Meriluoto, J. A. (2012). Comparative cellular toxicity of hydrophilic and hydrophobic microcystins on Caco-2 cells. *Toxins*, 4(11), 1008-1023.
- Vezie, C., Briant, L., Sivonen, K., Bertru, G., Lefeuvre, J.-C., & Salkinoja-Salonen, M. (1998). Variation of microcystin content of cyanobacterial blooms and isolated strains in Lake Grand-Lieu (France). *Microbial ecology*, 35, 126-135.
- Vidal, F., Sedan, D., D'Agostino, D., Cavalieri, M. L., Mullen, E., Parot Varela, M. M., Flores, C., Caixach, J., & Andrinolo, D. (2017). Recreational Exposure during Algal Bloom in Carrasco Beach, Uruguay: A Liver Failure Case Report. *Toxins*, 9(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/toxins9090267>
- Vidal, L., & Britos, A. (2012). Uruguay: Occurrence, toxicity and regulation of Cyanobacteria. Current approaches to Cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries, 130.
- Vidal, L., & Kruk, C. (2008). *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) extends its distribution to Latitude 34° 53'S: Taxonomical and ecological features in Uruguayan eutrophic lakes. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 3(2), 142-151.
- Vincent, W. F. (2002). Cyanobacterial dominance in the polar regions. The ecology of cyanobacteria: Their diversity in time and space, 321-340.
- Visser, P. M., Ibelings, B. W., Mur, L. R., & Walsby, A. E. (2005). The ecophysiology of the harmful cyanobacterium *Microcystis*: Features explaining its success and measures for its control. *Harmful cyanobacteria*, 109-142.
- Vossen, R. H., Aten, E., Roos, A., & den Dunnen, J. T. (2009). High-Resolution Melting Analysis (HRMA)—More than just sequence variant screening. *Human mutation*, 30(6), 860-866.
- Walsby, A. E., Hayes, P. K., & Boje, R. (1995). The gas vesicles, buoyancy and vertical distribution of cyanobacteria in the Baltic Sea. *European Journal of Phycology*, 30(2), 87-94.
- Walsby, A. E., Hayes, P. K., Boje, R., & Stal, L. J. (1997). The selective advantage of buoyancy provided by gas vesicles for planktonic cyanobacteria in the Baltic Sea. *The New Phytologist*, 136(3), 407-417.
- Wang, J., Salata, J. J., & Bennett, P. B. (2003). Saxitoxin is a gating modifier of HERG K<sup>+</sup> channels. *The Journal of General Physiology*, 121(6), 583-598.
- Wang, S., Li, J., Zhang, B., Spyarakos, E., Tyler, A. N., Shen, Q., Zhang, F., Kuster, T., Lehmann, M. K., Wu, Y., & Peng, D. (2018). Trophic state assessment of global inland waters using a MODIS-derived Forel-Ule index. *Remote Sensing of Environment*, 217, 444-460. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2018.08.026>

- Wang, X., Sun, M., Xie, M., Liu, M., Luo, L., Li, P., & Kong, F. (2013). Differences in microcystin production and genotype composition among *Microcystis* colonies of different sizes in Lake Taihu. *Water research*, 47(15), 5659-5669.
- Ward, D. M., Ferris, M. J., Nold, S. C., Bateson, M. M., Kocczynski, E. D., & Ruff-Roberts, A. L. (1994). Species diversity in hot spring microbial mats as revealed by both molecular and enrichment culture approaches—Relationship between biodiversity and community structure. *Microbial mats: structure, development and environmental significance*, 33-44.
- Wera, S., & Hemmings, B. A. (1995). Serine/threonine protein phosphatases. *Biochemical Journal*, 311(Pt 1), 17.
- Whitmire, A. L., Pegau, W. S., Karp-Boss, L., Boss, E., & Cowles, T. J. (2010). Spectral backscattering properties of marine phytoplankton cultures. *Optics Express*, 18(14), 15073-15093.
- Whitton, B. A. (2012). *Ecology of cyanobacteria II: Their diversity in space and time*. Springer Science & Business Media.
- Whitton, B. A., & Potts, M. (2007). *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*. Springer Science & Business Media.
- WHO, G. (2011). *Guidelines for drinking-water quality*. World health organization, 216, 303-304.
- Wickham, H., Chang, W., & Wickham, M. H. (2016). Package 'ggplot2'. Create elegant data visualisations using the grammar of graphics. Version, 2(1), 1-189.
- Wojtasiewicz, B., & Stoń-Egiert, J. (2016). Bio-optical characterization of selected cyanobacteria strains present in marine and freshwater ecosystems. *Journal of Applied Phycology*, 28(4), 2299-2314. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0774-3>
- Wood, S., & Wood, M. S. (2015). Package 'mgcv'. R package version, 1(29), 729.
- Wu, Z., Gan, N., Huang, Q., & Song, L. (2007). Response of *Microcystis* to copper stress—do phenotypes of *Microcystis* make a difference in stress tolerance? *Environmental Pollution*, 147(2), 324-330.
- Yang, H., Kong, J., Hu, H., Du, Y., Gao, M., & Chen, F. (2022). A review of remote sensing for water quality retrieval: Progress and challenges. *Remote Sensing*, 14(8), 1770.
- Yang, Z., Kong, F., Shi, X., & Cao, H. (2006). Morphological response of *Microcystis aeruginosa* to grazing by different sorts of zooplankton. *Hydrobiologia*, 563, 225-230.
- Zabaleta, B., Haakonsson, S., Achkar, M., & Aubriot, L. (2023). High-frequency zones of phytoplankton blooms in the Río de la Plata Estuary associated with El Niño-Southern Oscillation. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 286, 108342.
- Zeyoudi, M., Altenajji, E., Ozer, L. Y., Ahmed, I., Yousef, A. F., & Hasan, S. W. (2015). Impact of continuous and intermittent supply of electric field on the function and microbial community of wastewater treatment electro-bioreactors. *Electrochimica acta*, 181, 271-279.

## **ANEXOS**

### **I – BUFFER DE EXTRACCIÓN**

#### **Composición**

10mM Tris-HCl, pH= 8.0

100 mM EDTA, pH= 8.0

100 mM Na-Fosfato, pH= 8.0

1.5M NaCl

1% CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio)

## II – VARIABLES AMBIENTALES

Los datos analizados para el río Negro, río Uruguay (Las Cañas y Fray Bentos) y Playa Ramírez fueron obtenidos del Observatorio Ambiental Nacional del Ministerio de Ambiente ([https://www.ambiente.gub.uy/iSIA\\_OAN/](https://www.ambiente.gub.uy/iSIA_OAN/)). Para el caso del embalse de Salto Grande se utilizaron los datos ambientales obtenidos en el pasado por nuestro grupo de investigación.

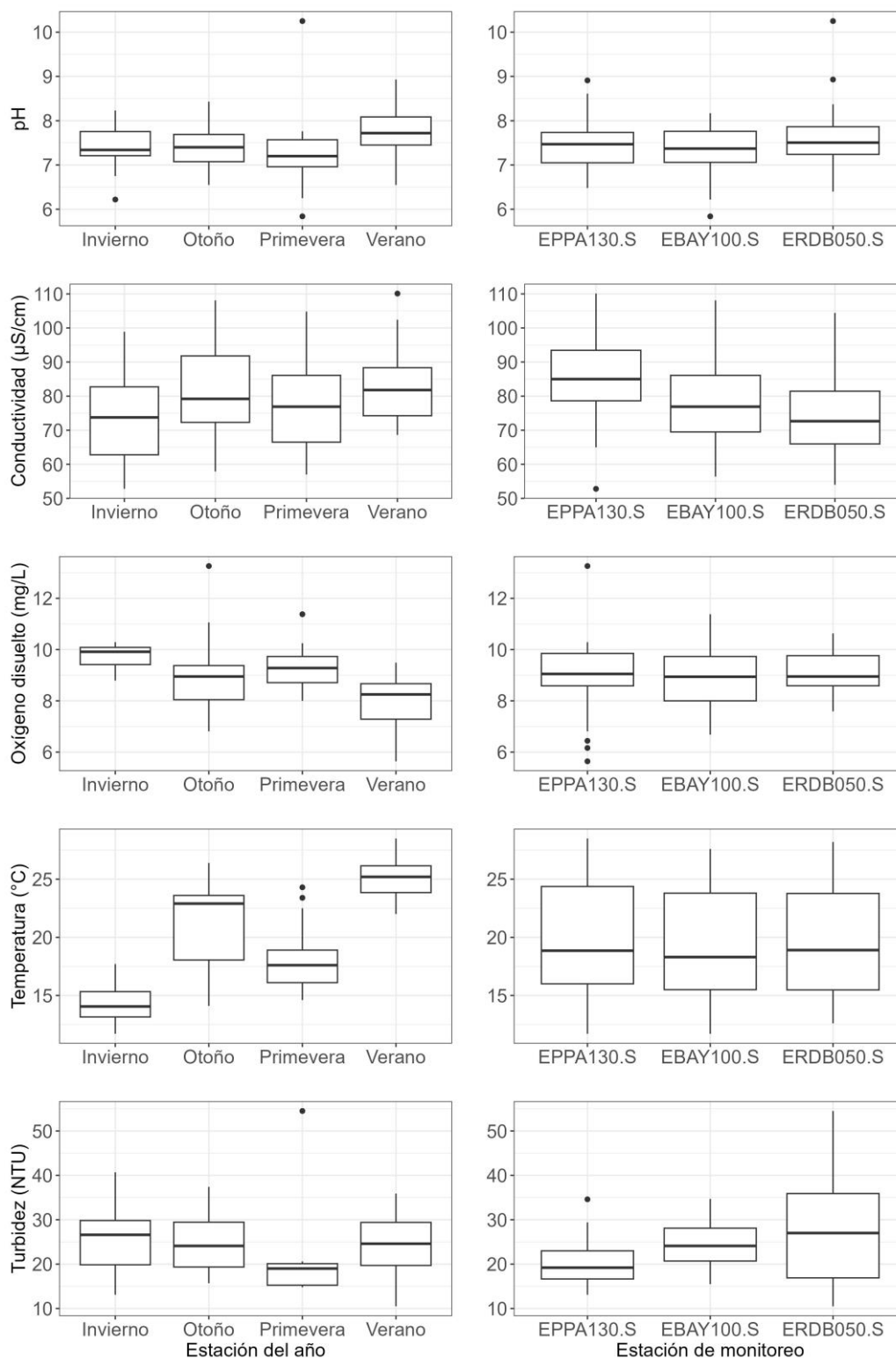




Figura 1A- Variables ambientales históricas de los embalses del río Negro, período 2013-2022.

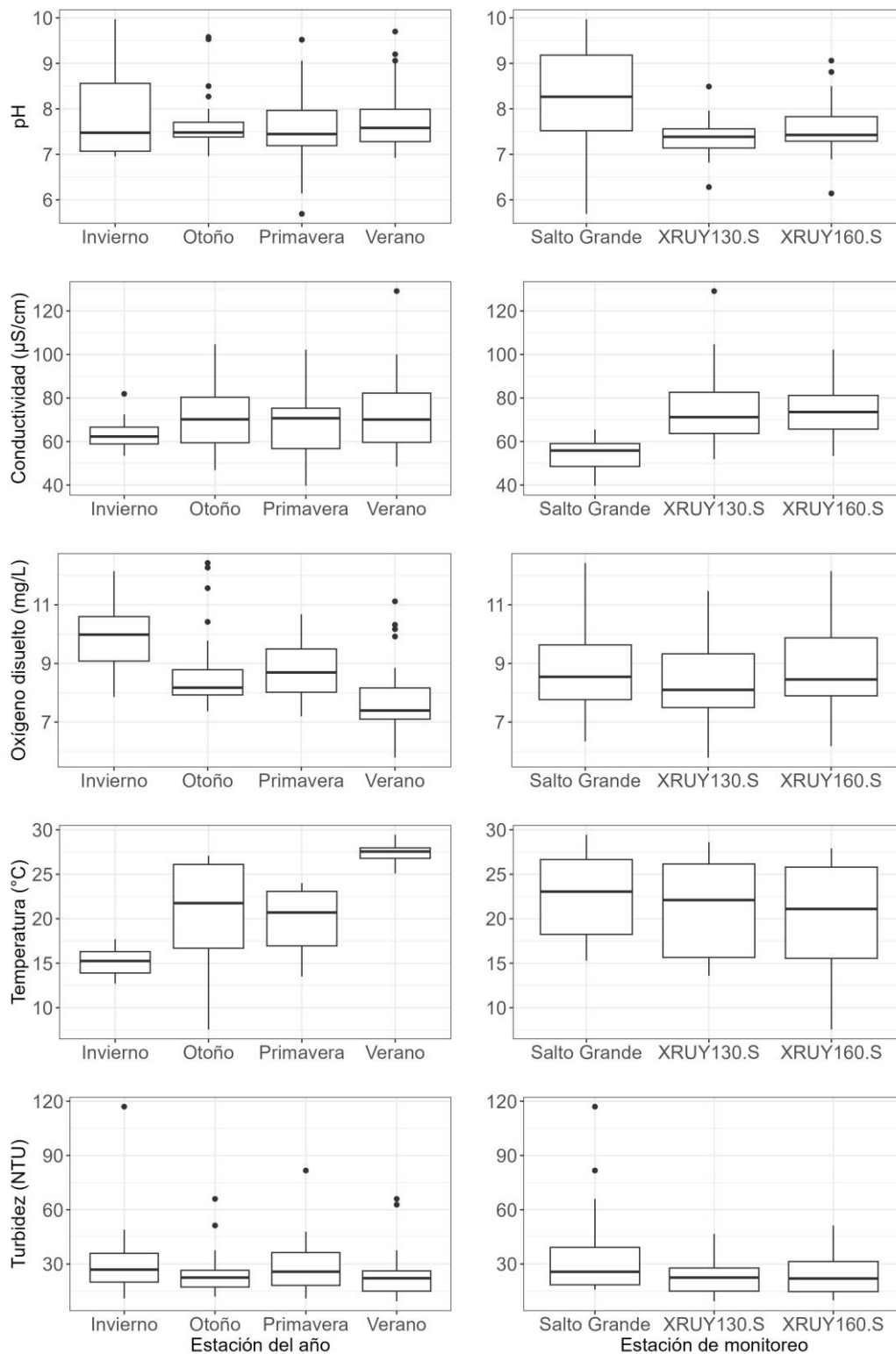


Figura 2A- Variables ambientales históricas del río Uruguay, período 2013-2022.

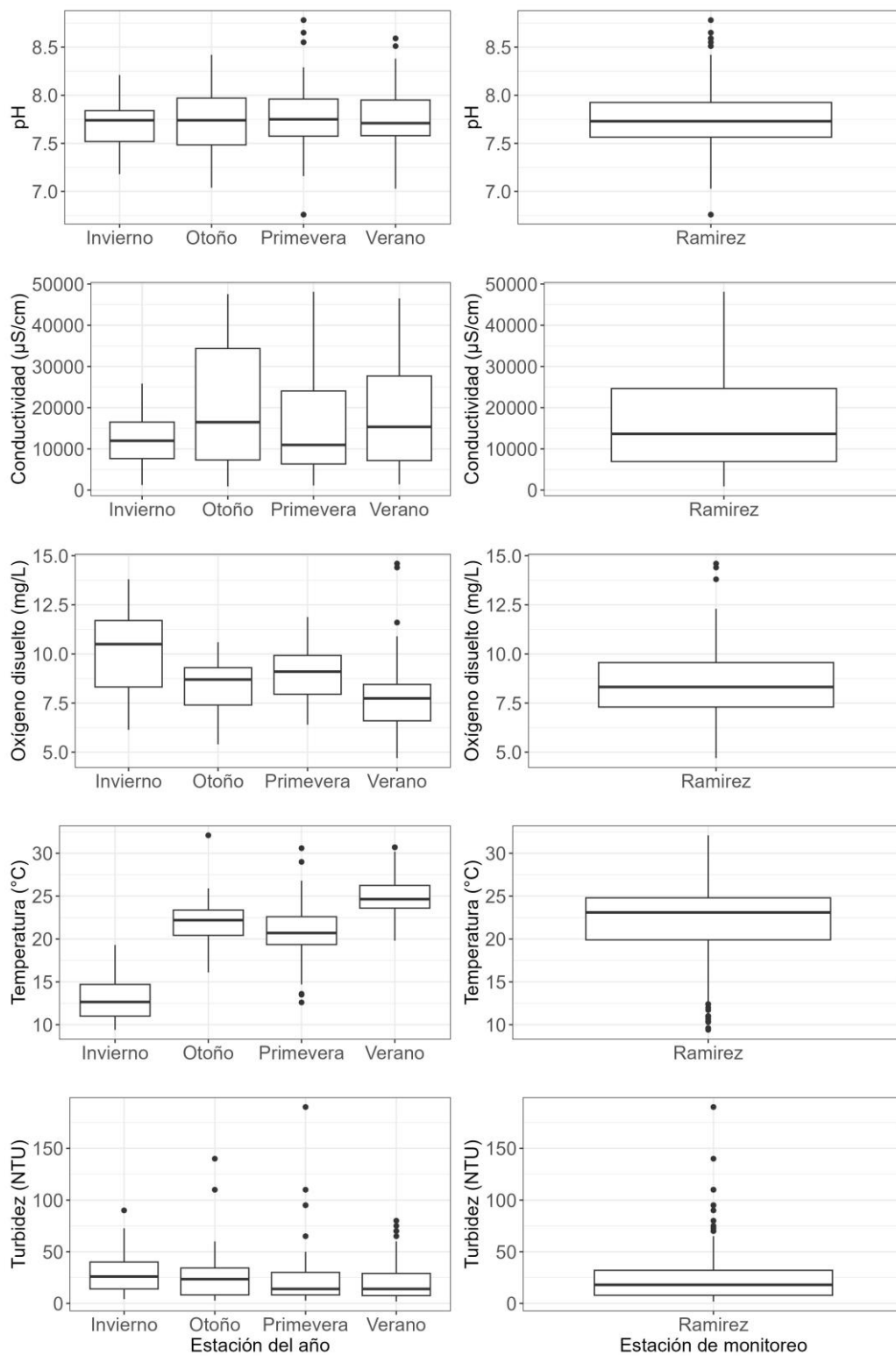


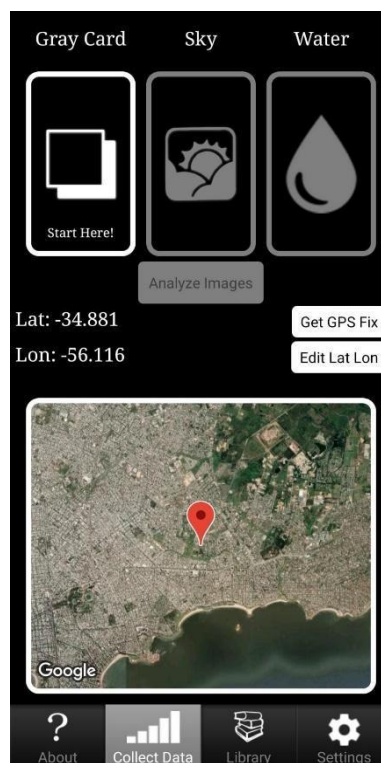
Figura 3A- Variables ambientales históricas de la estación de monitoreo en playa Ramírez (Río de la Plata), período 2013-2022.

### III - PROTOCOLO DE USO HYDROCOLOR

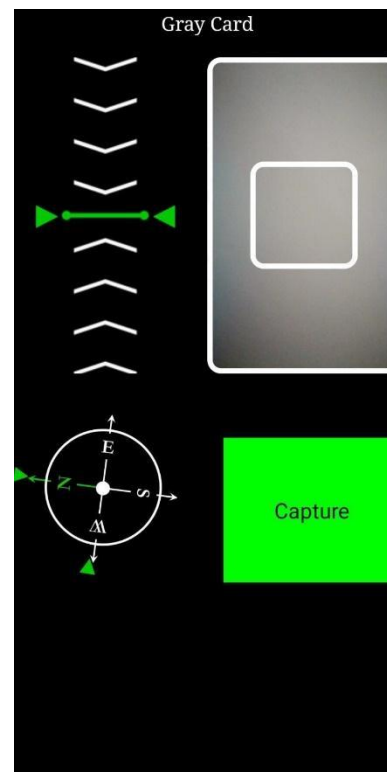
*Hydrocolor* es una aplicación móvil que utiliza la cámara de un teléfono inteligente y sensores auxiliares para medir la reflectancia de cuerpos de agua. Utiliza la cámara digital del teléfono como un radiómetro de tres bandas. La aplicación dirige al usuario a recopilar una serie de tres imágenes, estas son utilizadas para calcular la reflectancia de la teledetección en las bandas de longitud de onda roja, verde y azul (Leeuw & Boss, 2018).

#### Uso de la aplicación:

1. Ir a “*Collect Data*”: en esta sección se muestra la ubicación GPS y las tres fotos a tomar.



2. Al momento de tomar las fotos, *Hydrocolor* utiliza la información de diferentes sensores del teléfono móvil y teniendo en cuenta la localización del sol, dirige al usuario al ángulo correcto de Azimut donde el reflejo del sol es mínimo (dirigir el celular al Norte). Además, el inclinómetro permite obtener las imágenes del agua y la carta de referencia en un ángulo nadir (tipo de ángulo que se forma entre el norte y un cuerpo celeste) de 40°.



3. Siguiendo el paso anterior tomar las tres fotos: la primera imagen se obtiene sobre una carta gris de referencia radiométrica, la segunda se toma del cielo y la tercera de la superficie del cuerpo de agua.

Estas imágenes permiten calcular la intensidad de la energía lumínica reflejada en la superficie del agua, la cual se elimina primero de la energía que proviene del agua, restando los valores de la imagen “cielo” a la imagen “agua”. La segunda corrección radiométrica de la medición de agua se realiza mediante la división de la energía lumínica que viene del agua por la energía incidente en la superficie del agua y estimada a partir de la imagen de la carta de grises de referencia.

Al obtener las tres fotos necesarias por el programa, seleccionamos “*Analyze imagenes*”, ingresamos un nombre para guardar la información y el programa nos devuelve toda la información obtenida como la reflectancia del agua (Mobley, 1999), valores de turbidez de agua (0-80 NTU) y el valor de reflectancia ( $R_{rs}$ ) en las tres bandas (roja, verde y azul) (1/sr). Toda la información queda guardada dentro de la aplicación en la sección “*Library*”.

Por último, la aplicación permite vincularse directamente con Dropbox (“*Settings*”), en donde se genera un archivo con todos los datos recolectados en la aplicación.