



**UNIVERSIDAD
DE ANTIOQUIA**

Evaluación de la presencia de cianotoxinas en el embalse de agua dulce Topocoro en Santander Colombia

Luisa Fernanda Caly Peña

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:
Magíster en Ingeniería Ambiental

Director:

Gustavo Antonio Peñuela Mesa, Doctor en Química Ambiental

Universidad de Antioquia
Facultad de Ingeniería
Maestría en Ingeniería Ambiental
Medellín
2021

Cita	Luisa F. Caly
Referencia	Luisa F. Caly, “Evaluación de la presencia de cianotoxinas en el embalse de agua dulce Topocoro en Santander Colombia”, Tesis de maestría, Maestría en Ingeniería Ambiental, Universidad de Antioquia, Medellín, 2021.



Maestría en Ingeniería Ambiental, Cohorte XVII
 Grupo Diagnóstico y Control de la Contaminación (GDCON)
 Sede de Investigación Universitaria (SIU)



Centro de Documentación de Ingeniería (CENDOI)

Repositorio Institucional: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

Rector: John Jairo Arboleda Céspedes.

Decano: Jesús Francisco Vargas Bonilla.

Coordinador académico: Julio Eduardo Cañón Barriga.

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

Declaración

Me permito afirmar que he realizado la presente tesis de manera autónoma y con la única ayuda de los medios permitidos y no diferentes a los mencionados en la propia tesis. Todos los pasajes que se han tomado de manera textual o figurativa de textos publicados y no publicados, los he reconocido en el presente trabajo. Ninguna parte del presente trabajo se ha empleado en ningún otro tipo de tesis.

Agradecimientos

Mis agradecimientos al grupo Diagnóstico y Control de la Contaminación -GDCON- y en especial al Profesor Gustavo Peñuela, por su apoyo durante mi proceso de formación, por permitirme desarrollar este trabajo de investigación y su acompañamiento para afrontar los momentos difíciles. A todos los miembros del grupo, porque directa o indirectamente hicieron su contribución para que este trabajo fuera posible.

A la Universidad de Antioquia por la financiación mediante la beca Mejores Graduados, a la compañía ISAGEN por su patrocinio del proyecto marco, y al equipo del proyecto en cabeza de la Profesora Catalina Rodríguez, por los momentos compartidos y el conocimiento adquirido.

A Luisa Múnera y Cristina León quienes me introdujeron en el mundo de las cianobacterias y las cianotoxinas, motivaron mi interés por esta línea de investigación y me brindaron su conocimiento en este camino de aprendizaje. A Melissa Uribe por su buena energía, disposición y su contribución que fue fundamental para culminar este proceso.

Gracias a mi familia que es el pilar de mi vida, y a mis amigas Tatiana Puerta, María Guerra, Mary Cardona, y Sara Gallego, por su compañía y su cariño. A ti Sara por alentarme y aconsejarme en esos momentos de desesperación.

Resumen

La contaminación antropogénica y el cambio climático global han ocasionado condiciones ambientales favorables para el aumento de la frecuencia y duración de las floraciones de cianobacterias en los sistemas acuáticos. Las cianobacterias tienen la capacidad de producir metabolitos tóxicos denominados cianotoxinas, que se han convertido en una preocupación a nivel mundial por representar una amenaza para la salud humana y animal. En este trabajo se evaluó la presencia de cianobacterias y cuatro cianotoxinas en el embalse tropical de agua dulce Topocoro en Santander, Colombia. Para ello se monitoreó el embalse durante un año entre junio de 2017 y marzo de 2018, con campañas de muestreo cada tres meses en siete estaciones, en las que se recolectaron muestras de agua para analizar en el laboratorio la concentración de nutrientes, cianotoxinas y cianobacterias. Para la identificación y cuantificación de cianotoxinas se utilizó la técnica de cromatografía líquida de ultra alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas triple cuadrupolo (UHPLC-QqQ-MS/MS), y la cuantificación de cianobacterias se hizo por medio del gen 16S rARN por la técnica reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR). Además, se realizó una caracterización de la composición de la comunidad bacteriana en dos estaciones del embalse mediante secuenciación de nueva generación (NGS), con el fin de identificar la presencia de géneros de cianobacterias potencialmente tóxicos. Se obtuvieron concentraciones de cianobacterias en un rango entre $4.02(\pm 0.18) \times 10^4$ y $2.72(\pm 0.28) \times 10^7$ copias de Cyan 16S/ μL , donde el valor mínimo corresponde a la estación ubicada en la zona central y, el máximo a la estación localizada en el ingreso de uno de los ríos tributarios al embalse. Se detectó la presencia de microcistina-RR, microcistina-LR, microcistina-YR y nodularina en al menos seis de las siete estaciones de muestreo en distintas épocas del año. En todos los casos la concentración de las toxinas detectadas se encontró por debajo de $0.05 \mu g/L$, por lo que no se excedió el valor guía establecido por la Organización Mundial de la Salud para microcistina-LR. Se identificaron 1652 variantes de secuencia de amplicones (ASVs) bacterianos correspondientes a 20 filos, 48 clases, 106 órdenes, 174 familias y 287 géneros. El filo Proteobacteria tuvo la mayor abundancia relativa, seguido de Cyanobacteria y Bacteroidetes. Se identificaron 4 géneros de cianobacterias potencialmente tóxicas: *Cyanobium PCC-6307*, *Merismopedia 0BB39S01*, *Microcystis PCC-7914* y *Chrysosporum KA1.1*; destacando la importancia de monitorear la presencia de cianobacterias y cianotoxinas en el agua considerando el riesgo asociado a su exposición a través de los usos previstos del embalse.

Palabras clave: cianobacterias, cianotoxinas, comunidad bacteriana, embalse tropical, nutrientes.

Abstract

Anthropogenic pollution and global climate change have resulted in favorable environmental conditions for increased frequency and duration of cyanobacterial blooms in aquatic systems. Cyanobacteria can produce toxic metabolites called cyanotoxins, which have become a global concern as they pose a threat to human and animal health. In this work, the presence of cyanobacteria and four cyanotoxins was evaluated in the tropical freshwater reservoir Topocoro in Santander, Colombia. The reservoir was monitored for a year between June 2017 and March 2018, with sampling campaigns every three months in seven stations, in which water samples were collected to analyze the concentration of nutrients, cyanotoxins and cyanobacteria. For the identification and quantification of cyanotoxins, the Ultra-High-Performance Liquid Chromatography coupled with triple Quadrupole Mass Spectrometry (UHPLC-QqQ-MS/MS) technique was used, and the quantification of cyanobacteria was done by a quantitative real-time PCR (qPCR) assay using a cyanobacterial-specific 16S rRNA gene fragment as a target. In addition, a characterization of the composition of the bacterial community was carried out in two stations of the reservoir using new generation sequencing (NGS), to identify the presence of potentially toxic cyanobacterial genera. Cyanobacteria concentrations were obtained in a range between $4.02(\pm 0.18) \times 10^4$ y $2.72(\pm 0.28) \times 10^7$ copies of Cyan 16S/ μL , where the minimum value corresponds to the station located in the central zone and the maximum to the station located at the entrance of one of the tributary rivers to the reservoir. The presence of microcystin-RR, microcystin-LR, microcystin-YR and nodularin was detected in at least six of the seven sampling stations at different times of the year. In all cases, the concentration of the toxins detected was below $0.05 \mu g/L$, and so the guideline value established by the World Health Organization for microcystin-LR was not exceeded. 1652 bacterial amplicon sequence variants (ASVs) corresponding to 20 phyla, 48 classes, 106 orders, 174 families and 287 genera were identified. The phylum Proteobacteria had the highest relative abundance, followed by Cyanobacteria and Bacteroidetes. Four potentially toxic cyanobacterial genera were identified: *Cyanobium* PCC-6307, *Merismopedia* 0BB39S01, *Microcystis* PCC-7914 y *Chrysosporum* KA1.1; highlighting the importance of monitoring the presence of cyanobacteria and cyanotoxins in the water considering the risk associated with their exposure to through the intended uses of the reservoir.

Keywords: bacterial community, cyanobacteria, cyanotoxin, tropical reservoir, nutrients.

Índice general

Agradecimientos	II
Resumen	III
1. Introducción	1
2. Planteamiento del problema	4
3. Objetivos	6
4. Marco teórico	7
4.1. Cianobacterias	7
4.2. Nutrientes	8
4.3. Cianotoxinas	9
4.4. Análisis de la abundancia de cianobacterias	13
4.5. Análisis de composición y diversidad bacteriana	14
4.6. Detección y cuantificación de cianotoxinas	15
5. Metodología	16
5.1. Zona de estudio	16
5.1.1. Precipitación	18
5.2. Toma de muestra	18
5.3. Análisis de variables <i>in situ</i> y parámetros fisicoquímicos	20
5.4. Cianobacterias	22
5.5. Cianotoxinas	23
5.6. Composición y diversidad bacteriana	25
5.7. Análisis estadístico	26
6. Resultados	28
6.1. Variables <i>in situ</i> y parámetros fisicoquímicos	28
6.2. Cianobacterias	31
6.3. Variables <i>in situ</i> , parámetros fisicoquímicos y concentración de cianobacterias	35
6.4. Estado trófico	35
6.5. Cianotoxinas	38

6.6. Comunidades microbianas	39
6.6.1. Barras de composición	40
6.6.2. Alfa diversidad y Beta diversidad	41
6.6.3. Análisis de abundancia diferencial	44
7. Discusión	46
7.1. Cianobacterias, cianotoxinas y variables ambientales	46
7.2. Comunidad bacteriana	49
8. Conclusiones	52
9. Recomendaciones	54
Referencias	55

Índice de figuras

4.1. Estructura genérica de las microcistinas.	11
4.2. Estructura de la nodularina.	12
5.1. Ubicación del embalse Topocoro.	17
5.2. Red de plancton empleada en la toma de muestra para la cuantificación de cianobacterias planctónicas.	21
6.1. Dinámica de las variables <i>in situ</i> en el embalse Topocoro entre junio de 2017 y marzo de 2018; límite de la zona fótica (A), temperatura (B), conductividad eléctrica (C) y oxígeno disuelto (D).	30
6.2. Dinámica de los parámetros fisicoquímicos en el embalse Topocoro entre junio de 2017 y marzo de 2018; carbono orgánico disuelto (A), carbono orgánico total (B) y clorofila-a (C).	32
6.3. Diagrama de cajas y bigotes de la concentración de cianobacterias por campaña de muestreo.	34
6.4. Diagrama de cajas y bigotes de la concentración de cianobacterias por estación de muestreo.	34
6.5. Ordenación bidimensional de ACP de las muestras de agua tomadas en el embalse Topocoro entre junio de 2017 y marzo de 2018. Las variables <i>in situ</i> , parámetros fisicoquímicos y cianobacterias aparecen como vectores. Los puntos están identificados por la campaña de muestreo, seguidos de dos letras que abrevian la estación de muestreo. Las formas indican la campaña de muestreo (circulo: M1, triangulo: M2, cuadrado: M3 y cruz: M4.). Abreviaturas: CH: Chucurí, ER: El Ramo, LE: La Estrella, MI: Mirabel, PR: Presa, TB: Tablazo y TR: Trigueros.	36
6.6. Matriz de correlaciones para las variables <i>in situ</i> , parámetros fisicoquímicos y la concentración de cianobacterias en el embalse.	37
6.7. Barras de abundancia relativa de los filos en las estaciones Chucurí y El Ramo, para cada réplica. En el caso de Proteobacteria se muestran sus clases Alphaproteobacteria, Deltaproteobacteria y Gammaproteobacteria.	41
6.8. Barras de abundancia relativa de los géneros de Cianobacteria en las estaciones Chucurí y El Ramo, para cada réplica.	42
6.9. Riqueza observada e índice de Shannon de la comunidad microbiana para las estaciones Chucurí y El Ramo.	43

6.10. Riqueza observada e índice de Shannon del filo Cianobacteria para las estaciones Chucurí y El Ramo.	43
6.11. Análisis de coordenadas principales sobre las distancias Bray-curtis de la comunidad microbiana para las estaciones Chucurí y El Ramo.	44
6.12. Análisis de coordenadas principales sobre las distancias Bray-curtis del filo Cianobacteria para las estaciones Chucurí y El Ramo.	44
6.13. Géneros con abundancia diferencial entre las estaciones Chucurí y El Ramo. En el caso del filo Proteobacteria se muestra la clase en vez del género.	45

Índice de cuadros

4.1. Características toxicológicas de las cianotoxinas.	10
5.1. Características del embalse Topocoro.	16
5.2. Características importantes tributarios.	17
5.3. Campañas de muestreo.	18
5.4. Métodos de análisis de variables <i>in situ</i> y parámetros fisicoquímicos.	19
5.5. Análisis de laboratorio y preservación de las muestras.	20
5.6. Clasificación de los índices de estado trófico.	22
5.7. Conjunto de cebadores de PCR y sonda de ensayo Taq nucleasa.	23
5.8. Cianotoxinas analizadas.	24
5.9. Condiciones gradiente método de separación de cianotoxinas.	24
5.10. Primers empleados en la secuenciación de nueva generación.	26
6.1. Medidas descriptivas de las variables <i>in situ</i> y parámetros fisicoquímicos.	28
6.2. Diferencias en las variables <i>in situ</i> y parámetros fisicoquímicos, respecto a la campaña y la estación de muestreo.	29
6.3. Abundancia de cianobacterias en número de copias del gen Cyan 16S rARN de cianobacterias por μL (copias de Cyan 16S/ μL), en las distintas estaciones de muestreo en el embalse Topocoro, por campaña de muestreo.	33
6.4. Índices de estado trófico de variables individuales.	38
6.5. Variables <i>in situ</i> y parámetros fisicoquímicos correspondientes a las muestras para análisis de la composición y diversidad de las comunidades microbianas, en las estaciones Chucurí y El Ramo.	39
6.6. Abundancia de cianobacterias en número de copias de Cyan 16S/ μL , correspondientes a las muestras para análisis de la composición y diversidad de las comunidades microbianas, en las estaciones Chucurí y El Ramo.	40

1. Introducción

En las últimas décadas se ha evidenciado un aumento en la frecuencia, intensidad, duración y distribución de las floraciones o “blooms” de cianobacterias, fenómeno que se ha asociado a actividades antropogénicas y al cambio climático global [1–9]. Son múltiples los factores ambientales que determinan la presencia de cianobacterias en el agua [10], siendo el de mayor atención entre la comunidad científica mundial la contaminación antropogénica por nutrientes [6], ya que las investigaciones indican que el sobre-enriquecimiento de nutrientes por el desarrollo urbano, agrícola e industrial ha promovido el crecimiento de cianobacterias como floraciones nocivas [11]. Adicionalmente, los escenarios de cambio climático predicen que los ríos, lagos y embalses experimentarán un aumento de las temperaturas, períodos más intensos y largos de estratificación térmica, hidrología modificada y carga de nutrientes alterada, lo que tendrá efectos en la composición y biomasa de las especies de fitoplancton de agua dulce, y podría favorecer a las cianobacterias sobre otros fitopláctones [3].

Las cianobacterias son bacterias fotosintéticas aerobias que comparten algunas propiedades con las algas, poseen clorofila-a y liberan oxígeno durante la fotosíntesis [12–14]. Están presentes en una amplia gama de ecosistemas acuáticos, tales como los ecosistemas lénticos, especialmente en zonas tropicales donde su crecimiento es promovido por las altas temperaturas y la abundancia de nutrientes [15]. Se puede considerar que hay una floración de cianobacterias cuando su número de células excede un millón por litro [16]. Las cianobacterias tienen la capacidad de producir metabolitos tóxicos denominados cianotoxinas, que pueden ser perjudiciales para una gran cantidad de organismos acuáticos, animales silvestres y domésticos, y la población humana [5, 7, 17–22]. Algunos de los síntomas agudos reportados después de la exposición incluyen trastornos gastrointestinales, fiebre e irritaciones de la piel, los oídos, los ojos, la garganta y el tracto respiratorio [14, 23]. Las cianotoxinas se clasifican según sus efectos biológicos en hepatotoxinas, neurotoxinas, citotoxinas, dermatotoxinas y toxinas irritantes [20]. Estas se producen en las células durante el crecimiento de las cianobacterias y se liberan en el agua durante la lisis celular (por ejemplo, por senescencia o muerte) [24, 25], y en los mecanismos de defensa química que otorgan ventajas de supervivencia a las cianobacterias sobre otros microorganismos [26]. De acuerdo al resumen presentado por Wood [25], de los casos de envenenamientos agudos de animales y humanos por exposición a cianotoxinas, entre 1800 y 2010 ocurrieron en el mundo 406 incidentes en animales y 115 en humanos, datos que demuestran que las toxinas cianobacteriales presentan un riesgo permanente para la salud humana y el bienestar animal.

Se han detectado muchas cianotoxinas extracelulares durante las floraciones, pero las más comunes

son las microcistinas [2, 27]. Se han registrado al menos 246 variantes de microcistina que difieren en la composición de aminoácidos y la toxicidad [4], sin embargo, debido a su alta toxicidad y prevalencia, la microcistina-LR (MC-LR) es la más estudiada. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció un valor guía provisional para la MC-LR de 1 $\mu\text{g/L}$ en el agua potable [14], teniendo en cuenta sus efectos nocivos sobre la salud; mientras que la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US EPA) incluyó las cianotoxinas: anatoxina-a, cilindrospermopsina, microcistinas y saxitoxina, en la Lista de Candidatos Contaminantes más reciente [23]. Muchos países han adoptado medidas para regular las cianotoxinas en agua potable y recreativa, así como para implementar medidas de manejo frente a los blooms [13]. Sin embargo, la presencia de estas sustancias en las aguas aún no es tomada en cuenta en la legislación ambiental colombiana [5], como tampoco existe un registro sistemático de las floraciones de cianobacterias, a pesar de la gran diversidad de ecosistemas acuáticos [10]. De acuerdo a revisiones sobre floraciones de cianobacterias, en Colombia existen pocos registros, publicaciones científicas y estudios relacionados con su toxicidad [5, 10, 28]. Los estudios publicados están enfocados en la composición taxonómica y abundancia de las cianobacterias, señalando la identificación de especies que son potencialmente tóxicas, ya sea por medio de observación en el microscopio [29–32] o por técnicas moleculares [33–36], asociados a sistemas lagunares, ciénagas, ríos y embalses. Recientemente se publicó un estudio de detección y cuantificación de cianotoxinas en embalses del noreste de Colombia, utilizando la técnica analítica UHPLC MS/MS [37].

Las floraciones de cianobacterias pueden producir una variedad de problemas de calidad del agua en sistemas utilizados para actividades humanas, generando pérdida de biodiversidad y espacios recreativos, cambios en las redes tróficas y efectos en la salud de humanos y animales como resultado de la producción de toxinas [38]. Estos compuestos tóxicos presentan una naturaleza química muy diversa y muestran diferentes grados de toxicidad, por lo que su presencia y la de las cianobacterias, puede afectar potencialmente todos los usos del agua como actividades recreativas, riego y muy especialmente el suministro de agua potable [3, 5, 8, 39]. De esta forma, la aparición de floraciones de algas nocivas por cianobacterias no solo está relacionada con efectos adversos en los ecosistemas afectados, sino también con impactos económicos y sociales [40, 41]. Investigaciones y modelos recientes, estudios de laboratorio y observaciones de campo muestran que la combinación de la carga de nutrientes antropogénica, el aumento de las temperaturas, la estratificación vertical aumentada y el aumento de los suministros de CO_2 atmosférico, favorecerán el dominio de las cianobacterias en una amplia gama de ecosistemas acuáticos [8]. Específicamente en los trópicos, la temperatura alta y uniforme ofrece condiciones climáticas óptimas para el crecimiento sostenido de cianobacterias [42]. En Colombia, los escenarios de cambio climático indican un incremento gradual de la temperatura media anual para el final del Siglo XXI (año 2100) en 2.14 °C, si los niveles de emisiones globales de gases de efecto invernadero aumentan [43], lo que propiciaría condiciones para albergar floraciones de cianobacterias en cuerpos de agua del país.

A medida que aumenta la frecuencia de las floraciones de cianobacterias tóxicas en el agua dulce, la protección del recurso hídrico se vuelve más desafiante [44]. Actualmente, se están utilizando varios métodos/enfoques biológicos, bioquímicos y fisicoquímicos para monitorear las floraciones de cianobacterias y detectar cianotoxinas, entre ellas las microcistinas, en cuerpos de agua dulce [41]. En Colombia el problema de las cianobacterias se identificó con el primer artículo que documenta la presencia de cianotoxinas en cuerpos de agua del país publicado en 2010; por lo tanto, aún queda por desarrollar la conciencia del problema entre las autoridades del agua y el público

en general [5]. En el presente trabajo se evaluó la presencia de cianobacterias y cianotoxinas en el embalse tropical de agua dulce Topocoro, ubicado en Santander al nordeste Colombia, y se estudió su relación con las variables ambientales empleando un enfoque multidisciplinario. El uso principal de este embalse es la generación de energía y la conservación de la biodiversidad, pero existen algunos usos complementarios propuestos en su Plan de Ordenamiento como: pesca, uso de agua para consumo humano y agrícola, ecoturismo y actividades recreativas, deportes náuticos y transporte fluvial [45], que pueden significar vías de exposición a las toxinas de cianobacterias. El cuerpo de agua se monitoreó durante un año, entre junio de 2017 y marzo de 2018, mediante cuatro campañas de muestreo en las que se midieron variables *in situ* y se recolectaron muestras para analizar en el laboratorio la concentración de nutrientes, cianotoxinas y cianobacterias. Para la identificación y cuantificación de cianotoxinas se utilizó la técnica de cromatografía líquida de ultra alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas triple cuadrupolo (UHPLC-QqQ-MS/MS), y la cuantificación de cianobacterias se hizo por medio del gen 16S rARN por la técnica reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR). Además, se realizó una caracterización de la composición de la comunidad bacteriana en dos estaciones del embalse mediante secuenciación de nueva generación (NGS), con el fin de identificar la presencia de géneros de cianobacterias potencialmente tóxicos.

2. Planteamiento del problema

Las cianotoxinas son compuestos tóxicos producidos por las cianobacterias, que pueden causar varios efectos nocivos en seres humanos o animales debido a su potencial para producir daño hepático, neurotoxicidad y promoción tumoral, y en ciertos casos incluso la muerte. Algunos de los síntomas agudos reportados después de la exposición incluyen trastornos gastrointestinales, fiebre e irritaciones de la piel, los oídos, los ojos, la garganta y el tracto respiratorio [14, 22, 23]. Estos metabolitos han estado relacionados durante más de un siglo con muchos casos de envenenamiento de animales en todo el mundo, pero también son una amenaza para la salud humana [12, 18, 21, 25]. De hecho Chen et al. [12] afirma que la aparición masiva de cianobacterias o blooms se producen en casi todas las partes del mundo, pero especialmente en las regiones tropicales y subtropicales, y entre el 25 y el 75 % de estos se estima que son tóxicos. Del mismo modo Wood [25] presentó un resumen del número de incidentes ocurridos entre 1800 y 2010, que incluye 406 y 115 incidentes reportados para animales y humanos respectivamente, información que demuestra que los blooms tóxicos de cianobacterias presentan un riesgo permanente para la salud humana y el bienestar animal. El caso más destacado de exposición humana ocurrió en 1996 en Caruaru, Brasil, cuando 131 personas fueron expuestas a través de diálisis a microcistina, la cianotoxina más común en el agua dulce, 116 resultaron enfermas y 52 fallecieron [14, 46, 47]. Por lo anterior, el uso de aguas superficiales para riego, agua potable y fines recreativos con frecuencia se ve limitado por la presencia de cianobacterias, toxinas cianobacterianas u otros metabolitos secundarios [22]; generando a su vez impactos económicos para el tratamiento del agua y pérdidas en el turismo, la recreación, la pesca comercial, el valor de las propiedades y los negocios [3, 8, 39].

El enriquecimiento de nutrientes en los cuerpos de agua, junto con el cambio climático en curso, parecen estimular la dominancia de las cianobacterias en la comunidad de fitoplancton en cuerpos de agua dulce, lo que conduce a la formación de blooms potencialmente tóxicos [6, 17, 20, 39, 48]. Aunque los factores que contribuyen a la aparición mundial de blooms de cianobacterias son todavía discutibles, la eutrofización ocasionada por los desechos domésticos, industriales y agrícolas puede desempeñar un papel importante en la expansión global de los blooms de cianobacterias nocivas y la producción de toxinas [20]. Otros factores asociados con los blooms de cianobacterias y la producción de toxinas son la intensidad de la luz en la columna de agua, la temperatura y el pH [12]; sin embargo, es difícil predecir todas las variables ambientales requeridas por una especie individual para proliferar debido a la diversidad de cianobacterias y hábitat en las que han evolucionado [18].

El uso principal del embalse Topocoro es la generación de energía y la conservación de la biodiversidad, pero existen algunos usos complementarios propuestos en el Plan de Ordenamiento del Embalse que incluyen: pesca, uso de agua para consumo humano y agrícola, ecoturismo y actividades recreativas, deportes náuticos y transporte fluvial [45]. La mayoría de esas actividades constituyen posibles vías de exposición humana a las cianotoxinas, ya que implican contacto directo por vía cutánea mediante actividades recreativas o ingestión de agua potable y consumo de toxinas que previamente se han bioacumulado en la cadena alimenticia [17, 18, 20, 25, 49]. Sumado a esto, los blooms nocivos de cianobacterias amenazan la integridad ecológica y la sostenibilidad de los ecosistemas acuáticos utilizados para el consumo de agua, la agricultura, la pesca y la recreación, ya que causan aumento de la turbiedad, agotamiento de oxígeno y alteran las redes alimenticias [11, 19, 50, 51]. En consecuencia, el objetivo de este estudio fue evaluar la presencia de cianotoxinas y cianobacterias en el agua, y examinar que características particulares del embalse Topocoro podrían favorecer la presencia de las cianobacterias y la producción de toxinas, con el fin de generar información técnica útil para facilitar la formulación de estrategias de gestión del sistema acuático.

3. Objetivos

Objetivo general:

Evaluar la presencia de cianobacterias y cianotoxinas en el embalse de agua dulce Topocoro en Santander, Colombia.

Objetivos específicos:

- Cuantificar la presencia de cianotoxinas en el embalse Topocoro, en diferentes épocas del año y en distintos puntos del embalse.
- Relacionar la presencia de cianotoxinas en el embalse con las variables fisicoquímicas medidas en el embalse, como temperatura, oxígeno disuelto, conductividad, pH y concentración de nutrientes.
- Determinar la concentración de cianobacterias en el agua por qPCR en diferentes puntos del embalse durante un año de monitoreo.

4. Marco teórico

4.1. Cianobacterias

Las cianobacterias, antes conocidas como algas verde-azules, son en su mayoría bacterias fotosintéticas aerobias que comparten algunas propiedades con las algas, poseen clorofila-a y liberan oxígeno durante la fotosíntesis [12–14, 52]. Son un grupo diverso, que varían en tamaño desde picoplancton unicelular hasta colonias macroscópicas multicelulares [3]. Sus procesos vitales requieren agua, dióxido de carbono, sustancias inorgánicas y luz. La fotosíntesis es su principal modo de metabolismo energético [18, 24, 48]. Las cianobacterias poseen una variedad de rasgos ecofisiológicos únicos y altamente adaptables, que pueden ser específicos a nivel de género, e incluyen: la capacidad de crecer en temperaturas más cálidas; flotabilidad, debido a la producción de vesículas de gas que les permiten regular su posición en la columna de agua; alta afinidad y capacidad para almacenar fósforo; fijación de nitrógeno, produciendo compuestos nitrogenados inorgánicos para la síntesis de ácidos nucleicos y de proteínas; producción de acinetos y características asociadas del ciclo de vida; y captura de luz a bajas intensidades y en un rango de longitudes de onda [3, 14, 19, 52, 53]. La característica más notable de las cianobacterias, en cuanto a los impactos sobre la salud pública, es que una serie de especies pueden producir metabolitos tóxicos para los seres vivos denominadas cianotoxinas [2, 14, 18, 19, 25].

Las cianobacterias disfrutan de una distribución geográfica notablemente amplia, que va desde las regiones polares a las tropicales en los hemisferios norte y sur, donde son capaces de dominar la producción primaria planctónica y bentónica en diversos hábitats [8]. A pesar de que se encuentran en muchos entornos diferentes, las cianobacterias están presentes principalmente en los ecosistemas acuáticos como parte del fitoplancton y el perifiton [31]. Cuando las condiciones de temperatura, luz y estado de nutrientes son favorables, las aguas superficiales (tanto de agua dulce como marinas) pueden albergar un aumento en el crecimiento de algas o cianobacterias conocido como floraciones o blooms [13, 18, 24, 25, 53]; cuando las floraciones de algas tienen el potencial de causar efectos nocivos, se las conoce como floraciones de algas nocivas [54]. No obstante, existen otros factores ambientales como la salinidad, el movimiento del agua, tiempo de residencia y estancamiento que influyen en dicho proceso. En general, las cianobacterias florecen en los ecosistemas acuáticos lénticos con concentraciones relativamente altas de nutrientes primarios (nitrógeno, fósforo y carbono). En algunos lagos y embalses con tiempos de residencia largos, la acumulación de nutrientes y el estado trófico creciente favorecen las floraciones (a veces casi mono-específicas) de

cianobacterias [18]. Como parte de la comunidad del fitoplancton, las cianobacterias son esenciales para los ciclos biogeoquímicos y constituyen la base de las redes alimentarias acuáticas, jugando un papel fundamental como productores primarios [9, 31]. Sin embargo, su crecimiento excesivo implica una alteración significativa de la función del ecosistema, especialmente cuando las cianobacterias productoras de toxinas dominan las floraciones [9].

Las floraciones de cianobacterias de agua dulce son fenómenos naturales comunes [9], pero tienen impactos ambientales negativos que abarcan un aumento en la turbiedad y la consecuente disminución en la cantidad de luz que logra penetrar en la columna de agua, concentraciones reducidas de oxígeno disuelto que afectan intensamente la existencia de plancton, y disminución en la diversidad de la biota acuática como consecuencia del predominio de una, o como mucho, de unas pocas especies [8, 55–57]. Adicionalmente, las altas densidades de floración de cianobacterias también pueden crear problemas asociados con la estética y el olor, disminuir la calidad del agua, e interrumpir la transferencia de energía en las redes alimentarias acuáticas, ya que la mayoría de las cianobacterias no son apetecibles para los consumidores primarios [58]. De esta forma, el desarrollo masivo de cianobacterias suprime el establecimiento y el crecimiento de macrófitos acuáticos y microalgas bentónicas y, por lo tanto, afecta negativamente el hábitat submarino de la flora y fauna bentónicas [8]. Además, muchas floraciones nocivas de cianobacterias producen metabolitos secundarios tóxicos que pueden causar intoxicación aguda grave en mamíferos (incluidos los seres humanos) que afectan los sistemas hepatopancreático, digestivo, endocrino, dérmico y nervioso [19].

4.2. Nutrientes

Entre la combinación de factores ambientales que regulan la aparición de los blooms de cianobacterias ha llamado la atención el estado trófico del sistema acuático, debido a que se ha identificado que el aumento de nutrientes en los cuerpos de agua contribuye a la expansión global de los blooms nocivos de cianobacterias [6], aumentando la frecuencia, duración y la intensidad de dichos florecimientos [18, 48, 59, 60]. La eutrofización es el realce del proceso natural de producción biológica en sistemas leníticos, causado por aumentos en los niveles de nutrientes, usualmente compuestos de nitrógeno y fósforo [24, 60]. Este proceso ha sido acelerado por la contaminación antrópica de las cuencas que rodean los lagos y embalses, así como sus afluentes [12, 18].

Existe un acuerdo en que el aumento de la incidencia de floraciones de cianobacterias se debe en gran medida al aumento de las concentraciones de fósforo y nitrógeno de fuentes puntuales y difusas. Sin embargo, no está claro cómo la relación estequiométrica entre estos nutrientes y/o sus concentraciones absolutas promueven la proliferación de cianobacterias [61]. El enriquecimiento de fósforo controla la aparición de blooms debido a que muchos géneros de cianobacterias disponen de nitrógeno porque tienen la capacidad de convertir enzimáticamente el nitrógeno atmosférico en amonio disponible biológicamente [19]. A pesar de esto, no todas las cianobacterias que forman bloom son diazótrofes (que fijan el nitrógeno), por lo que los compuestos de nitrógeno son también relevantes determinando la cantidad de células presentes en un bloom [6]. Es importante señalar que existe un consenso de que los blooms nocivos de cianobacterias son eventos complejos, generalmente no causados por un único controlador ambiental, sino por múltiples factores que ocurren

simultáneamente [62]. Teniendo en cuenta lo anterior, los cuerpos de agua enriquecidos en nutrientes son especialmente propensos a las cianobacterias dañinas si tienen períodos de residencia largos y temperaturas del agua que periódicamente exceden los 20 °C [19].

4.3. Cianotoxinas

Muchos géneros de cianobacterias producen y liberan compuestos tóxicos llamados cianotoxinas, que pueden traer efectos nocivos sobre los organismos acuáticos, la vida silvestre, los animales domésticos y los seres humanos al beber o ponerse en contacto con el agua que contiene estos compuestos [17, 19–21, 63]. La función ecológica de las cianotoxinas aún no está clara y requiere una investigación extensa, así como las condiciones que causan que las cianobacterias produzcan cianotoxinas [13, 20, 24]. Una razón para la biosíntesis de cianotoxinas puede ser una adaptación que permite que las cianobacterias en ambientes limitantes de recursos mejoren la competencia con otros fotoautótrofos e inhiban su crecimiento, y también el de bacterias heterótrofas, y hongos. Datos recientes sugieren que, además de conferir una ventaja competitiva, algunas cianotoxinas pueden desempeñar funciones como auxiliares fisiológicos de las cianobacterias, por ejemplo, ayudando a la absorción de nutrientes, captación de hierro, protección contra el estrés oxidativo y/o metabolismo del carbono-nitrógeno, mantenimiento de la homeostasis y otros roles como infoquímicos [7, 64]. Aunque la toxicidad de las cianobacterias está relacionada con la producción de estos metabolitos, no todas los blooms de cianobacterias están asociados con la aparición de toxinas ya que no todas las cepas son tóxicas [12]. De hecho, las cianotoxinas son producidas sólo por cepas que tienen los genes apropiados [18, 65].

Las cianotoxinas pertenecen a un grupo diverso de compuestos químicos, cada uno de los cuales exhibe mecanismos tóxicos específicos en vertebrados (Tabla 4.1) [24]. Dependiendo de la estructura del cuerpo humano afectada, las cianotoxinas se clasifican en: hepatotoxinas, neurotoxinas, citotoxinas, dermatotoxinas y toxinas irritantes [18, 20, 25]. Alternativamente, pueden clasificarse con base en su estructura química en péptidos cíclicos, alcaloides y lipopolisacáridos (LPS) [12, 20]. En la mayoría de los casos, las cianotoxinas existen naturalmente intracelularmente (en el citoplasma) y se mantienen dentro de la célula. Para estas especies, cuando la célula muere o la membrana celular se descompone, las toxinas son liberadas al agua (toxinas extracelulares) [13, 48].

Tabla 4.1: Características toxicológicas de las cianotoxinas [18].

Toxina	Modo de acción	Principal efecto	DL_{50} ($\mu g/kg$)^a
Microcistinas	Inhibe la proteína fosfatasa	Insuficiencia hepática y hemorragia hepática	25-150 (para la más toxica)
Nodularinas	Inhibe la proteína fosfatasa	Insuficiencia hepática y hemorragia hepática	30-70
Cilindrospermopsina	Inhibe la síntesis de proteínas	Insuficiencia hepática y renal	2100
Anatoxina-a	Se une a los receptores nicotánicos de la acetilcolina	Parálisis muscular	375
Anatoxina-a(s)	Inhibe la acetilcolinesterasa	Debilidad muscular, disnea y convulsiones	31
Saxitoxinas	Se une a los canales de sodio	Ataxia, convulsiones y parálisis	10 (para la más toxica)
β -N-metilamino-L-alanina	Se une a los receptores de glutamato	Síndrome neurodegenerativo	No especificado
Aplisiatoxinas	Activan la proteína quinasas C	Promoción tumoral e irritación de la piel	No especificado
Lingbiatoxinas	Activan la proteína quinasas C	Promoción tumoral e irritación de la piel	25 (ratones inmaduros)

^a Después de la inyección intraperitoneal en ratones.

Las hepatotoxinas son el grupo de cianotoxinas que se presentan con mayor frecuencia. Las microcistinas y nodularinas se clasifican en este grupo [57]. Las microcistinas son heptapéptidos cíclicos y sin duda son las cianotoxinas más importantes en términos de su impacto mundial en la salud y la calidad del agua [54]. Están formados no ribosómicamente en el citoplasma con pesos moleculares de 900 a 1100 Da y cuya estructura común es ciclo (D-Ala-X-D-MeAsp-Z-Adda-D-Glu-Mdha) en la que X y Z representan aminoácidos variables, D-MeAsp es D-eritro- β -ácido metilaspártico, Mdha es N-metildehidroalanina y Adda es (2S,3S,8S,9S)-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-ácido dienoico [40, 57]. La Figura 4.1 proporciona la estructura de la microcistina. Aunque las sustituciones ocurren principalmente en las posiciones X e Y, se han reportado otras modificaciones para todos los aminoácidos [52, 66]. Los congéneres más comunes son MC-LR, MC-RR y MC-YR, resultantes de la presencia de la forma L de leucina (L), arginina (R) o tirosina (Y) en las posiciones 2 y 4 (las letras son los que se utilizan como abreviatura para identificar los aminoácidos que se encuentran en las proteínas) [2]. La dosis letal media (LD_{50}) de MC-LR por

vía intraperitoneal es de 25 a 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corporal en ratones [67].

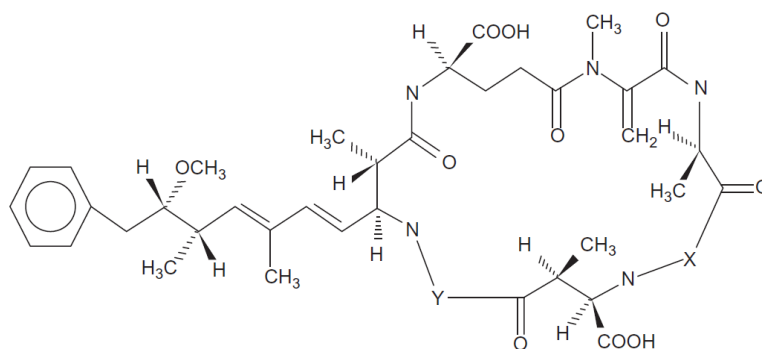


Figura 4.1: Estructura genérica de las microcistinas [68].

Las microcistinas son solubles en agua. En ambientes acuáticos, tienden a permanecer contenidas dentro de la célula cianobacteriana y se liberan en cantidades sustanciales solo después de la lisis celular [24, 64]. *Microcystis* spp., en particular *Microcystis aeruginosa*, son productores comunes y generalizados de microcistinas, pero también pueden ser producidas por otros géneros de cianobacterias de agua dulce, incluyendo *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Aphanizomenon*, *Planktothrix*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Rivularia* y *Fisherella* [39, 54]. Las microcistinas son potentes inhibidores de las proteínas fosfatasa, con una amplia gama de efectos tóxicos. Pueden causar daño hepático severo pero también afectar a otros tejidos de mamíferos, y pueden tener efectos pulmonares, neurológicos y reproductivos, así como promotores de tumores. Las microcistinas han sido implicadas en la muerte de diversas aves, peces y mamíferos, incluyendo ovejas, perros, ganado e incluso nutrias marinas. También se conocen algunas muertes humanas. Se han registrado al menos 246 variantes de microcistina que difieren en la composición de aminoácidos y toxicidad [4].

Como se muestra en la Figura 4.2, las nodularinas son pentapéptidos cíclicos con la estructura ciclo (D-MeAsp-L-arginina-Adda-D-glutamato-Mdhb) donde Mdhb es 2-(metilamino)-2-ácido deshidrobutírico [18, 69]. Estas son producidas por la especie de agua salobre *Nodularia spumigena* y una especie única de *Nodularia harveyana*, actualmente se conocen 10 variantes estructurales [4, 68, 69]. Tanto la microcistina como la nodularina inhiben las proteínas eucariotas fosfatasa 1 y 2A y son reconocidas como potenciales promotores tumorales y carcinógenos, por lo que es importante identificar la producción o síntesis potencial de estas toxinas en el ambiente para eliminar incluso una exposición de bajo nivel a los seres humanos [69].

Las microcistinas y nodularinas son sintetizados por complejos multienzimáticos gigantes compuestos de péptido sintetasas no ribosomales (NRPS), policétido sintasas (PKS) y enzimas de adaptación adicionales. Las cianobacterias que son capaces de producir microcistinas contienen el grupo de genes denominados *mcy* que en *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 abarca 55 kb y 10 marcos abiertos de lectura (ORFs, por sus siglas en inglés) (*mcyA-J*), mientras que las cianobacterias que producen nodularinas contienen el grupo de genes *nda* que en *Nodularia spumigena* NSOR10 abarca 48 kb y codifica 9 ORFs [40]. Numerosos factores bióticos y abióticos pueden influir no solo en el predominio de las cianobacterias dentro de la comunidad de fitoplancton en general, sino también en la proporción de cianobacterias toxigénicas en relación con las cianobacterias no

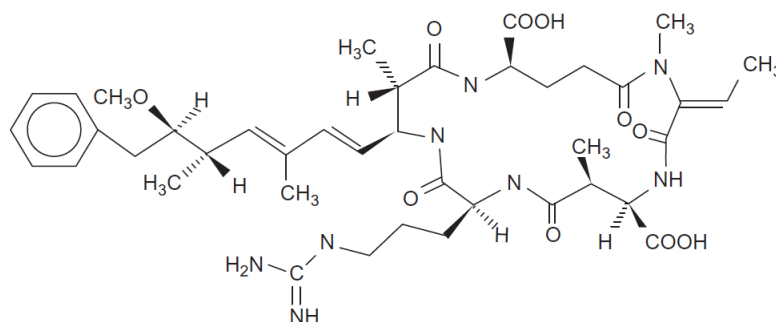


Figura 4.2: Estructura de la nodularina [68].

productoras de toxinas [64]. El porcentaje de células que contienen genes de toxinas puede variar significativamente tanto en el espacio como en el tiempo y hay poca comprensión de qué factores ambientales controlan los cambios en la fracción de células capaces de producir toxinas [70]. Los dos factores principales que se ha demostrado que afectan la producción de toxinas son la luz y la temperatura. La temperatura óptima para la producción de toxinas en las cianobacterias está entre 20 y 25 °C, lo que sugiere que las cianobacterias son más tóxicas durante los períodos de clima cálido y en áreas con climas cálidos. Sin embargo, la temperatura óptima puede cambiar de un país a otro. La toxicidad de las cianobacterias aumenta con un aumento en la intensidad de la luz por debajo de 40 microeinstein/ m^2 por segundo y, por lo tanto, disminuye con la profundidad del agua [71]. Dado que la producción de toxinas varía mucho entre diferentes cepas de la misma especie, las diferencias genéticas y los procesos metabólicos también pueden ser importantes en la producción de estas toxinas. Los estudios han demostrado que la capacidad de producir toxinas puede variar temporal y espacialmente en un sitio particular o dentro de la propia floración [71].

Los seres humanos pueden estar expuestos por vía oral a las cianotoxinas al beber agua contaminada, a través del consumo de peces de agua dulce, cultivos, verduras y suplementos alimenticios que contienen cianotoxinas, o al ingerir agua durante las actividades recreativas [2]. El riesgo para la salud humana de la exposición a las cianobacterias y sus toxinas durante el uso recreativo del agua surge a través de tres vías de exposición: 1) el contacto directo de las partes expuestas del cuerpo, incluidas las áreas sensibles como los oídos, los ojos, la boca y la garganta, y las áreas cubiertas por un traje de baño (que puede acumular material celular); 2) absorción accidental de agua que contiene células por ingestión; y 3) absorción de células que contienen agua por aspiración (inhala-ción) [71]. En mayo de 2019 la US EPA emitió nuevas recomendaciones para los criterios de calidad del agua recreativa y los valores de advertencia de natación para las cianotoxinas [72]. Estableció concentraciones recomendadas, iguales o inferiores a las que protegen la salud pública, para las cianotoxinas, microcistinas de 8 $\mu g/L$ y cilindrospermopsina de 15 $\mu g/L$ [64]. De forma similar la OMS publicó una serie de valores de referencia para la exposición recreativa a las cianobacterias, donde se considera una probabilidad relativa baja de efectos adversos para la salud cuando se tiene <20000 células/ml, correspondiente a <10 $\mu g/L$ de clorofila si dominan las cianobacterias y niveles de microcistina estimados de <10 $\mu g/L$ de microcistinas [73].

La OMS estableció un valor guía provisional para la MC-LR, uno de los congéneres de microcistina mas frecuente, de 1 $\mu g/L$ en el agua potable basado en una ingesta diaria de agua de 2 L por un adulto de 60 kg [14], teniendo en cuenta sus efectos nocivos sobre la salud; mientras que la US

EPA incluyó las cianotoxinas: anatoxina-a, cilindrospermopsina, microcistinas y saxitoxina, en la Lista de Candidatos Contaminantes más reciente (CCL, por sus siglas en inglés) [23]. Con base en estas directrices muchos países han adoptado medidas para regular las cianotoxinas en agua potable y recreativa, así como para implementar medidas de manejo frente a los blooms [13]. Sin embargo, la presencia de estas sustancias en las aguas aún no es tenida en cuenta en la legislación ambiental colombiana [5], como tampoco existe un registro sistemático de las floraciones de cianobacterias, a pesar de la gran diversidad de ecosistemas acuáticos [10]. De acuerdo a revisiones sobre floraciones de cianobacterias, en Colombia existen pocos registros, publicaciones científicas y estudios relacionados con su toxicidad [5, 10, 28]. Los estudios publicados están enfocados en la composición taxonómica y abundancia de las cianobacterias, señalando la identificación de especies que son potencialmente tóxicas, ya sea por medio de observación en el microscopio [29–32] o por técnicas moleculares [33–36], asociados a sistemas lagunares, ciénagas, ríos y embalses. Recientemente se publicó un estudio de detección y cuantificación de cianotoxinas en embalses del noreste de Colombia, utilizando la técnica analítica UHPLC MS/MS [37].

4.4. Análisis de la abundancia de cianobacterias

Las cianobacterias se enumeran e identifican con mayor frecuencia mediante recuentos microscópicos y concentraciones de pigmentos (por ejemplo, clorofila y ficocianina) [70], y tradicionalmente se han estudiado sobre la base de su morfología microscópica [74]. El método convencional para determinar la composición taxonómica de cianobacterias basado en técnicas de microscopía, así como su enumeración, presenta varias desventajas: requiere de mucho tiempo y conduce a una alta frecuencia de errores, demanda personal con un alto grado de experiencia en el tema y, taxones que no sean muy abundantes en la muestra pueden no lograrse observar [41, 56, 75]. En los últimos años se han realizado avances en los métodos moleculares utilizados para evaluar la diversidad microbiana en entornos naturales que han permitido desarrollar nuevas técnicas de identificación y cuantificación de microorganismos. Las ventajas de los métodos filogenéticos en comparación con los métodos tradicionales de identificación y cuantificación son las siguientes. i) Los métodos moleculares son más precisos: a diferencia de la morfología, fisiología y características de tinción, la identidad filogenética conservada no cambia con el tiempo o bajo diferentes condiciones. ii) Estos métodos pueden producir datos cuantitativos específicos del objetivo [75]. Técnicas moleculares como la PCR cuantitativa (qPCR) se utilizan ampliamente para cuantificar el número de copias de genes específicos o de interés y, por tanto, cuantificar las propiedades estructurales y funcionales de las comunidades de cianobacterias en campo y en condiciones de laboratorio. De esta forma, se han desarrollado ensayos de qPCR dirigidos a regiones conservadas del gen 16S rARN para determinar el número total de cianobacterias [50], dando una idea de la abundancia de las poblaciones en una muestra. En el caso del presente trabajo se realizó la amplificación y cuantificación del gen 16S rARN de cianobacterias por qPCR empleando los cebadores específicos para cianobacterias CYAN 108F y CYAN 377R, y la sonda CYAN 328R (Taq).

La qPCR es un potente avance de la técnica básica de PCR, que permite monitorear el progreso de la amplificación del ADN en tiempo real y visualizar la fase de amplificación exponencial [50, 76]. Así en la qPCR la cantidad de ADN se mide después de cada ciclo mediante el uso de marcadores fluorescentes que se incorporan en el producto de PCR. El aumento de la señal fluorescente es

directamente proporcional al número de amplicones (moléculas de producto de PCR) generados en la fase exponencial de la reacción [50]. Entre los diversos sistemas reporteros de fluorescencia que existen, los ensayos SYBR Green I y TaqMan son los métodos más utilizados en los estudios actuales de ecología microbiana ambiental [76, 77]. En ambos métodos de ensayo, la cuantificación del número de copias de genes mediante qPCR se determina durante la fase exponencial de la amplificación, cuando la cantidad de gen objetivo amplificado es proporcional a la plantilla inicial. Esto asegura una determinación más precisa de la cantidad inicial de ADN objetivo. La cuantificación de la cantidad inicial de secuencias objetivo (números de copias de genes) se extrapola de los valores de C_t (ciclo umbral). El C_t es el número de ciclo en el que la señal fluorescente muestra un aumento estadísticamente significativo sobre el nivel de fondo calculado. Cuanto mayor sea la concentración inicial de la plantilla objetivo, menor será el C_t [50].

4.5. Análisis de composición y diversidad bacteriana

Los blooms nocivos de cianobacterias son fenómenos complejos que implican un riesgo asociado con la producción de toxinas, por lo que se hace indispensable contar con herramientas que permitan realizar seguimiento a las cianobacterias y a la dinámica de las toxinas, con el objetivo de prevenir impactos y costos relacionados con su presencia en el agua [78, 79]. Teniendo en cuenta que las floraciones a menudo están compuestas por cepas tóxicas y no tóxicas coexistentes dentro de cada especie (a menudo morfológicamente idénticas), y que no todas las cianobacterias se pueden cultivar en el laboratorio con el fin de rastrear específicamente a los productores de cianotoxinas, el uso de herramientas moleculares independientes de cultivo se vuelve esencial para revelar patrones subespecíficos *in situ* [78]. Las tecnologías de secuenciación de ADN de nueva generación (NGS) han permitido un análisis más completo de las comunidades bacterianas en muchos entornos y han promovido significativamente la comprensión de la distribución ecológica y el papel funcional de estas comunidades [80]. En los últimos años, varios estudios han estado utilizando enfoques de secuenciación de alto rendimiento, incluida la NGS, proporcionando una comprensión más completa y de alta resolución de las comunidades bacterianas. Dichos estudios han identificado distintos ensamblajes microbianos asociados con diferentes géneros de cianobacterias, especies y cepas presentes, así como las variaciones de la comunidad durante las diferentes etapas de floración [81].

En la secuenciación de nueva generación, la ADN polimerasa cataliza la incorporación de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) marcados con fluorescencia en una hebra de plantilla de ADN durante los ciclos secuenciales de síntesis de ADN. Durante cada ciclo, en el punto de incorporación, los nucleótidos se identifican mediante la excitación del fluoróforo. Los métodos de NGS se han utilizado con éxito para caracterizar comunidades bacterianas en aguas marinas, suelos, aguas residuales y varios microbiomas humanos [82]. Más recientemente, la difusión de la secuenciación de alto rendimiento/nueva generación ha impulsado la investigación sobre cianobacterias/metagenómica de microalgas en aguas dulces en todo el mundo. En cianobacterias de agua dulce, la NGS se ha utilizado para evaluar la diversidad general basada principalmente en Unidades de Taxonomía Operativa (OTU) derivadas de amplicones de rARN 16S (también conocidos como metabarcoding) [78]. Aunque los métodos de base molecular combinados con la secuenciación ofrecen la capacidad no solo de identificar posibles productores de toxinas, sino también de toxinas específicas de especies específicas, validando la presencia o ausencia de vías relacionadas con las

toxinas, estos no pueden predecir si se están produciendo y liberando toxinas al medio ambiente [79]. Se tiene registro de que en Colombia se realizó una investigación utilizando NGS basado en amplicones del gen 16S- y 18S-rRNA, para identificar comunidades bacterianas y eucariotas en cuatro lagos recreativos urbanos en parques metropolitanos y un arroyo en Bogotá [83]. Para nuestro conocimiento, el presente trabajo es uno de los primeros estudios en los que se realiza la caracterización de la comunidad bacteriana en un embalse colombiano empleando NGS utilizando la plataforma Illumina Miseq, enfocados en la identificación de cianobacterias potencialmente tóxicas.

4.6. Detección y cuantificación de cianotoxinas

La detección, cuantificación y seguimiento de cianotoxinas es fundamental para garantizar la seguridad pública [67]. Existen numerosos métodos analíticos para la determinación de varias toxinas de cianobacterias [21], que abarcan métodos con enfoque biológico (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas -ELISA-, técnicas basadas en anticuerpos, ensayos basados en la inhibición de la enzima proteína fosfatasa, enfoques moleculares y biosensores) y los basados en química analítica (técnicas cromatográficas) [39]. Según el método analítico, las muestras requieren una preparación específica antes del análisis. Las técnicas de separación se utilizan comúnmente porque permiten la discriminación de las diversas toxinas que coexisten dentro de un solo análisis, incluso con un detector no específico [18]. En el presente trabajo la técnica analítica seleccionada es la cromatografía líquida de ultra alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas triple cuadrupolo (UHPLC-QqQ-MS/MS). Esta técnica ha demostrado los parámetros de calidad indispensables para bajos límites de cuantificación y permite la detección inequívoca de las moléculas deseadas en las muestras de agua [37].

La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem es una técnica para el análisis de varios analitos en una amplia variedad de matrices debido a su sensibilidad y selectividad [39, 47]. Por una parte, la cromatografía líquida (LC) normalmente con una columna C18 fase inversa o HILIC y metanol/agua o agua/acetonitrilo como fase móvil, es el método de separación más común para las cianotoxinas porque permite la flexibilidad, la velocidad y la adaptabilidad a una amplia gama de detectores basados en la absorbancia UV, la fluorescencia o la espectrometría de masas [47, 63, 84]. Además, la espectrometría de masas (MS) detecta compuestos en función de su masa y carga mejorando la selectividad. Del mismo modo, el desarrollo de la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) ha mejorado la especificidad para los compuestos más exigentes con masa y carga similares a través de su patrón de fragmentación específica cuando chocan con las moléculas de gas inerte. Como consecuencia las cianotoxinas se detectan principalmente por LC-MS o LC-MS/MS, lo que permite la detección simultánea de una mayor cantidad de toxinas con un procedimiento de preparación de muestra más sencillo [18, 46]. Hasta la fecha, la preconcentración de toxinas por medio de SPE acoplada a la separación cromatográfica con detección de MS sigue siendo una de las herramientas analíticas más poderosas para la identificación y cuantificación de cianotoxinas de agua dulce individualmente y como mezclas [67]. Sin embargo, también se observan limitaciones similares observadas para los métodos de HPLC relacionadas con el costo, la disponibilidad de estándares y la experiencia técnica específica [85].

5. Metodología

5.1. Zona de estudio

La Central Hidroeléctrica Sogamoso está ubicada en el departamento de Santander, al noroccidente de Colombia, en el cañón donde el río Sogamoso atraviesa la cordillera de La Paz, 75 km aguas arriba de su desembocadura en el río Magdalena y 62 km aguas abajo de la confluencia de los ríos Suárez y Chicamocha. El área de influencia está conformada por 9 municipios: Betulia, Zapatoca, Girón, Lebrija, Los Santos, San Vicente de Chucurí, Sabana de Torres, Puerto Wilches y Barrancabermeja [86] (Figura 5.1).

El embalse Topocoro almacena el agua que se utiliza para la generación de la energía eléctrica en la central Sogamoso. Su extensión es de 6960 hectáreas y tiene un volumen de 4800 millones de m^3 , siendo el de mayor capacidad del país [86]. Algunas características del embalse se presentan en la Tabla 5.1. El uso principal del embalse Topocoro es la generación de energía y la conservación de la biodiversidad, pero existen algunos usos complementarios propuestos en el Plan de Ordenamiento del Embalse que incluyen: pesca, uso de agua para consumo humano y agrícola, ecoturismo y actividades recreativas, deportes náuticos y transporte fluvial [45].

Como tributarios del embalse se tienen los ríos Chicamocha, Suárez, Chucurí y la Quebrada Aguas Blancas. El río Sogamoso se forma por la confluencia de los ríos Suárez y Chicamocha, que después de la presa retoma su nombre y desemboca en el río Magdalena. Algunas características de estos ríos se observan en la Tabla 5.2. Cerca a estos ríos se encuentran principalmente agrocultivos como el cacao, café, lulo, entre otros, e industrias como la de explotación de lechos para extracción de material para la construcción [87].

Tabla 5.1: Características del embalse Topocoro [86, 87].

Características	Valor
Caudal promedio	474.6 m^3/s
Área de la cuenca tributaria	2117800 ha
Superficie del espejo de agua	6960 ha
Volumen de almacenamiento	4800 Mm^3

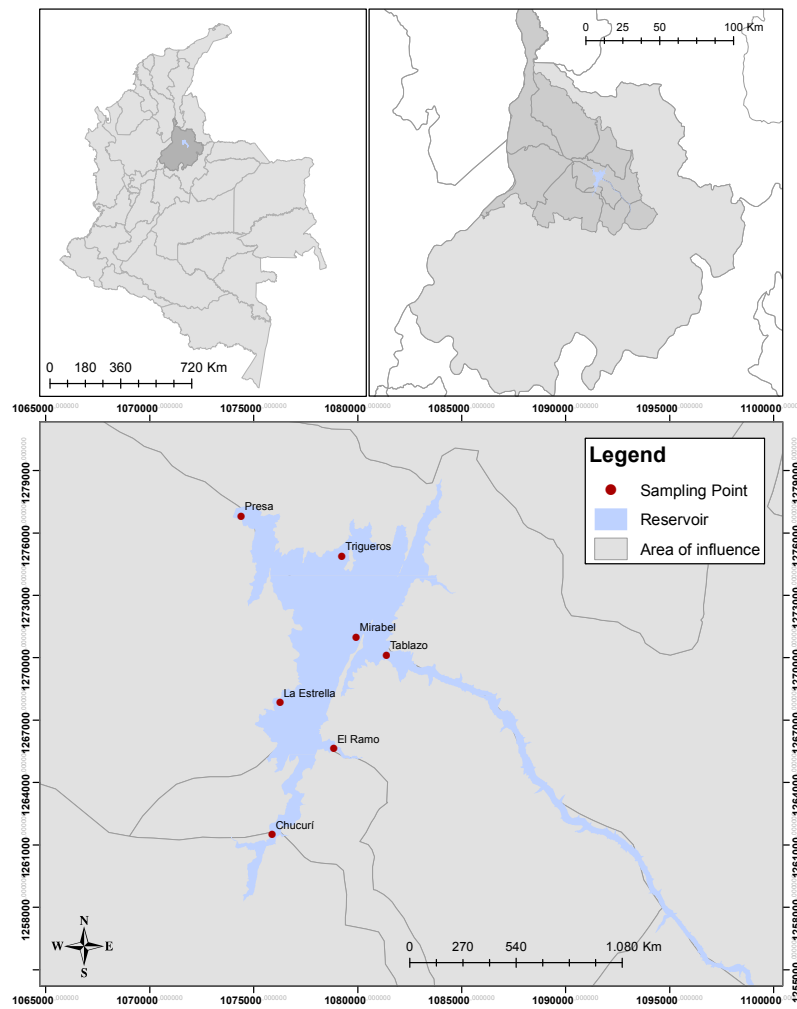


Figura 5.1: Ubicación del embalse Topocoro.

Tabla 5.2: Características importantes tributarios [87].

Tributario		Departamento	Desembocadura nacimiento	Descarga multianual (m/s)	Área de la cuenca (ha)		Temperatura promedio (°C)	Precipitación
Río Chicamocha		Boyaca	Río Sogamoso	135	133200		25.5	945.35
Río Suárez		Cundinamarca	Río Sogamoso	195	982300		25.9	2328.70
Río Chucurí		Santander	Río Sogamoso	8.7	No disponible	26	1814.05	
Quebrada Blancas	Aguas	Santander	Río Sogamoso	0.88	No disponible	30.9	1627.90	
Río Sogamoso		Santander	Río Magdalena	540	111944		32.2	2883.50

5.1.1. Precipitación

En el área de influencia del Proyecto Hidroeléctrico Sogamoso se observa un comportamiento bimodal de la precipitación, originado por el doble paso de la Zona de Confluencia Intertropical por el territorio Colombiano. Este régimen bimodal se caracteriza por la presencia de dos períodos secos o de menor intensidad de lluvias alternado con dos períodos invernales de fuertes lluvias. La precipitación promedio anual en la zona de obras principales es de 3432 mm. En el área se presenta un periodo de lluvias de septiembre a diciembre en el cual se registra el 44.7 % de la lluvia anual y un segundo periodo lluvioso durante abril y mayo con 22.7 % de la precipitación. Estas dos temporadas lluviosas, están separadas por un veranillo entre junio y agosto, el cual presenta el 17.3 % de la precipitación. La temporada seca más importante corresponde a los meses de enero a marzo, durante los cuales se registra el 15.31 % de la lluvia anual [88].

5.2. Toma de muestra

Inicialmente se realizó una visita de reconocimiento en el embalse Topocoro el 24 de octubre de 2016, con el objetivo de hacer un recorrido por varios sitios, observar sus condiciones e identificar la presencia de células de cianobacterias en el agua. Se seleccionaron seis estaciones de muestreo considerando la entrada de los afluentes al embalse, la zona central del cuerpo de agua y el área cercana a la presa. Para la segunda campaña de monitoreo se incluyó una séptima estación, El Ramo, por las características morfológicas particulares del sitio (Figura 5.1).

Se llevaron a cabo cuatro campañas de monitoreo durante un año entre junio 2017 y marzo de 2018, cada tres meses aproximadamente para incluir las variaciones entre la época de lluvias, la época seca, y el período de transición entre ellas (Tabla 5.3). En cada campaña se midió la transparencia del agua (Disco Secchi) y las variables *in situ* en la superficie de la columna de agua, usando un medidor portátil con diferentes sondas (Tabla 5.4). Se recogieron muestras para el análisis de variables fisicoquímicas, cianobacterias y cianotoxinas en el laboratorio (Tabla 5.5).

Tabla 5.3: Campañas de muestreo.

Campaña	Fecha	Época	Volumen (Mm^3)	Volumen (%)
M1	5-7/06/2017	Transición	4776.96	98.50
M2	20-21/09/2017	Seca	3469.95	71.00
M3	27-28/11/2017	Lluvia	4735.96	96.70
M4	12-13/03/2018	Seca	2184.34	50.70

Para recolectar la muestra de carbono orgánico total y disuelto se utilizó un recipiente de vidrio ámbar, y para los demás parámetros fisicoquímicos botellas de plástico. Las muestras de cianotoxinas se recogieron por triplicado en botellas de plástico o vidrio ámbar (ver Sección 5.5). Para la cuantificación de cianobacterias planctónicas se recolectaron muestras de agua con una red de plancton (marca Enthos, tamaño de poro de 20 μm , ver Figura 5.2) en arrastres horizontales a una velocidad promedio de 6.4 km/h durante aproximadamente 3 minutos, las muestras se alma-

cenaron en envases plásticos. Todas las muestras fueron transportadas al laboratorio Diagnóstico y Control de la Contaminación - GDCON- de la Universidad de Antioquia, en neveras a una temperatura entre 0 y 4 °C en un lapso de 24 horas. En la Tabla 5.5 se encuentra la descripción de los parámetros, el volumen de muestra y la preservación.

Tabla 5.4: Métodos de análisis de variables *in situ* y parámetros fisicoquímicos.

Parámetro	Unidades	Método de referencia
pH	Unidades de pH	SM 4500- H^+ B
Temperatura	°C	Parámetro asociado a las otras medidas directas
Conductividad eléctrica	$\mu S/cm$	SM 2510 B
Oxígeno disuelto	mg/L	SM 4500-O H
Límite de la zona fótica	m	Disco Secchi
Nitratos	mg/L	SM 4110 B
Hierro disuelto	mg/L	Método interno
Fósforo total	mg/L P	Kit analítico NANOCOLOR orto Fosfato y Fosfato total 1. REF 985076.
Amonio	mg/L NH_4^+	Kit analítico Spectroquant Test Amonio. REF 114752.
Nitrógeno total	mg/L N	Kit analítico NANOCOLOR Nitrógeno total TNb 22. REF 985083.
Carbono orgánico disuelto	mg/L	SM 5310 B
Carbono orgánico total	mg/L	SM 5310 B
Clorofila-a	mg/cm^3	SM 10200 H

Además de las campañas de muestreo descritas anteriormente, fue necesario realizar un muestreo adicional en septiembre de 2019, con el fin de realizar un estudio de la composición y diversidad

de la comunidad bacteriana en el embalse. Para ello se recolectaron 5 réplicas de muestra en las estaciones Chucurí y El Ramo, cada una con un volumen de 5 L, mediante arrastres horizontales con una red de plancton; en condiciones similares a las mencionadas para las muestras empleadas en la cuantificación de cianobacterias planctónicas. En este caso, el tiempo total estimado durante el arrastre fue de 2 horas en cada punto. También se midió la transparencia del agua y las variables *in situ* en la superficie, y se recogieron las muestras para el análisis de parámetros fisicoquímicos y cianotoxinas en el laboratorio.

Tabla 5.5: Análisis de laboratorio y preservación de las muestras.

Parámetro	Preservación	Volumen
Nitratos	Refrigeración	500 mL
Hierro disuelto	Acidificar a pH 1-2 con HNO_3 y refrigeración	200 mL
Fósforo total Amonio Nitrógeno total	Acidificar a pH 1-2 con H_2SO_4 y refrigeración	500 mL
Carbono orgánico disuelto Carbono orgánico total	Acidificar a pH 1-2 con H_2PO_4 y refrigeración	100 mL
Clorofila-a	Congelar a -20 °C	500 mL
Cianotoxinas	Congelar a -20 °C o refrigeración	500 o 100 mL
Cianobacterias (qPCR)	Congelar a -20 °C	750 L
Composición y diversidad bacteriana (NGS)	Refrigeración	5 L

5.3. Análisis de variables *in situ* y parámetros fisicoquímicos

Para el análisis de los parámetros *in situ* se utilizó un conductímetro WTWTM Cond 3210TM para medir la conductividad eléctrica (CE), un equipo multiparametro HACH HQ40d para la medición del oxígeno disuelto (OD) y, un pH metro WTWTM pH 7110TM para la lectura del pH y la temperatura (Tabla 5.4). Los análisis de nitratos, carbono orgánico total (COT), carbono orgánico disuelto (COD), hierro disuelto y clorofila-a se realizaron siguiendo métodos estandarizados [89]. Para los análisis de nitrógeno total (NT), amonio y fósforo total se emplearon kits de ensayo comercial (Tabla 5.4). Todos los análisis fueron realizados en el laboratorio del grupo GDCON, laboratorio acreditado para el análisis de aguas por el IDEAM bajo la norma técnica colombiana

NTC-ISO/IEC 17025, Resolución 1665 del 12 de julio de 2011.



Figura 5.2: Red de plancton empleada en la toma de muestra para la cuantificación de cianobacterias planctónicas.

El límite de la zona fótica (LZF) se calculó mediante el producto del promedio de las 4 mediciones realizadas de la transparencia del agua (d) y 2.7, como se presenta en la siguiente ecuación:

$$LZF = 2.7 \times d \quad (5.1)$$

Para realizar una estimación del estado trófico de las estaciones del embalse, se estimaron los índices de estado trófico (IET) según Carlson [90] y Toledo en Klippel et al. [91], empleando las variables individuales profundidad del disco Secchi (DS) y clorofila-a (Cla).

Para el IET de Carlson (IET-Ca) se utilizaron las siguientes ecuaciones [90]:

$$IET_{DS} = 10 \left(6 - \frac{\ln DS}{\ln 2} \right) \quad (5.2)$$

$$IET_{Cla} = 10 \left(6 - \frac{2.04 - 0.68 \ln Cla}{\ln 2} \right) \quad (5.3)$$

Para el IET de Toledo (IET-To) se utilizaron las siguientes ecuaciones [91]:

$$IET_{DS} = 10 \left(6 - \frac{0.64 + \ln DS}{\ln 2} \right) \quad (5.4)$$

$$IET_{Cla} = 10 \left(6 - \frac{2.04 - 0.695 \ln Cla}{\ln 2} \right) \quad (5.5)$$

En la tabla 5.6 se presentan los umbrales y la clasificación de los índices de estado trófico por niveles [91].

Tabla 5.6: Clasificación de los índices de estado trófico.

Índice	Categoría	Umbral
IET-Ca	Oligotrófico	$IET \leq 40$
	Mesotrófico	40-50
	Eutrófico	50-60
	Hipereutrófico	$IET \geq 60$
IET-To	ultra-oligotrófico	$IET \leq 24$
	Oligotrófico	24-44
	Mesotrófico	44-54
	Eutrófico	54-74
	Hipereutrófico	$IET \geq 74$

5.4. Cianobacterias

Las muestras se descongelaron, homogenizaron y concentraron empleando una centrifuga para llevarlas desde un volumen de 750 mL a 50 μL aproximadamente. Para ello se centrifugaron en tubos cónicos de 50 mL en la centrifuga 5810 R (Eppendorf) a 10000 rpm y 4 °C, durante 15 minutos; seguidamente se pasaron a microtubos de 1.5 mL para centrifugar a 13000 rpm durante 10 minutos en centrifuga MiniSpin®(Eppendorf). De esta forma se recolectó la biomasa o el pellet que contenía la materia prima para llevar a cabo las extracciones de ADN. Las extracciones se realizaron usando el protocolo para muestra de plantas frescas o congeladas del kit comercial E.Z.N.A.®Plant DNA kit (Omega bio-tek), siguiendo las instrucciones del fabricante, modificando el volumen final de elución de ADN a 75 μL . La concentración (ABS260) y pureza del ADN (ABS260/ABS280) se cuantificación en un NanoDrop™ 2000 UV-Vis espectrofotómetro (Thermo Scientific).

La amplificación y cuantificación del gen 16S rRNA de cianobacterias por qPCR se hizo en un termociclador LightCycler 1.5 y software versión LCS4 4.1.1.21 (Roche) utilizando el kit LightCycler®FastStart DNA Master HybProbe (Roche), empleando los cebadores específicos para cianobacterias CYAN 108F y CYAN 377R, y la sonda CYAN 328R (Tabla 5.7). La mezcla de qPCR se preparó de acuerdo con Múnera [35], con un volumen final de 20 μL . La reacción contenía Master Mix 1X, $MgCl_2$ 2.5 mM, cebadores 0.5 μM (una mezcla equimolar de CYAN 108F y CYAN 377R), sonda CYAN 328R 0.25 μM y alrededor de 20 ng de ADN extraído de las muestras. El programa

para la PCR incluyó un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 30 segundos y 72 °C por 25 segundos. Por último, una extensión final a 40 °C por 30 segundos. Todos los ensayos se realizaron por triplicado en capilares de vidrio de 20 μ L (Roche), se incluyó un control negativo libre de ADN (agua grado molecular) y cepa de cianobacterias tóxicas como control positivo.

Tabla 5.7: Conjunto de cebadores de PCR y sonda de ensayo Taq nucleasa.

Primer	Secuencia (5'-3')	Referencia
CYAN 108F	ACG GGT GAG TAA CRC GTR A	[92]
CYAN 377R	CCA TGG CGG AAA ATT CCC C	
CYAN 328R (Taq) ^a	CTC AGT CCC AGT GTG GCT GNT C	

^a La sonda estaba marcada en el extremo 5' con FAM y en el extremo 3' con TAMRA.

Los cálculos del punto de cruce o “crossing point” (Cp) se realizaron para cada ensayo de qPCR mediante el software LightCycler® versión LCS4 4.1.1.21, empleando el método Auto. Las copias de genes por muestra se calcularon utilizando una curva estándar (número de copias de gen objetivo vs Cp), desarrollada previamente en el laboratorio GDCON [35]. La curva se elaboró utilizando ADN genómico de la cianobacteria *Microcystis aeruginosa* cepa NIES - 843 provista por el Laboratorio de ecofisiología y toxicología de cianobacterias, Universidad Río de Janeiro, Brasil. A partir de este ADN de concentración conocida, se realizaron diluciones seriadas 1:10 hasta 10⁻⁶ utilizando como diluyente agua de PCR.

5.5. Cianotoxinas

Para el análisis de cianotoxinas en las muestras de agua, se empleó una metodología desarrollada en el laboratorio GDCON, que consiste en la extracción en fase sólida (SPE) y detección de cuatro cianotoxinas, tres microcistinas (MCs), microcistina-RR (MC-RR), microcistina-LR (MC-LR), microcistina-YR (MC-YR), y una nodularina (NOD), por UHPLC-QqQ-MS/MS (Tabla 5.8). En las campañas de monitoreo uno y dos, se tomaron 500 mL de muestra de agua cruda en un recipiente plástico de 1 L, para evitar ruptura de los envases, debido a que éstas se sometieron a tres ciclos de congelado/descongelado. Las muestras se almacenaron a -20 °C, hasta procesamiento y análisis. Durante la segunda y tercera campaña de muestreo se adoptaron las recomendaciones del método EPA 544 [93], por lo que las muestras se recolectaron en un recipiente de vidrio ámbar de 100 mL, que contenía los siguientes reactivos de preservación: cristales de trizma pre-establecidos pH 7.0 (7.75 g/L), 2-cloroacetamida (2 g/L), y ácido etilendiaminotetraacético, sal trisódica (0.35 g/L). Las muestras se almacenaron a una temperatura entre 0 y 4 °C, hasta procesamiento y análisis en el laboratorio.

Tabla 5.8: Cianotoxinas analizadas.

Cianotoxina	Fórmula molecular	Sigla
Microcistina-RR	$C_{49}H_{75}N_{13}O_{12}$	MC-RR
Microcistina-LR	$C_{49}H_{74}N_{10}O_{12}$	MC-LR
Microcistina-YR	$C_{52}H_{72}N_{10}O_{13}$	MC-YR
Nodularina	$C_{41}H_{60}N_8O_{10}$	NOD

Inicialmente se llevaron a cabo tres ciclos de congelado/descongelado para provocar la lisis celular, con la consiguiente liberación de cianotoxinas intracelulares. Luego, cada muestra se pasó a través de filtros de membrana de éster de celulosa estériles (tamaño de poro de $0.45\ \mu m$). El filtrado fue sometido a SPE para su limpieza y concentración de las cianotoxinas. Para la extracción se emplearon cartuchos de extracción Oasis HLB 6 cc 200 mg (Waters). El volumen de la elución se recogió en un vial de 25 mL, para luego ser reducido a sequedad con corriente suave de nitrógeno (N_2 99.995 %). Se adicionó al vial 1 mL de agua metanol grado LC/MS 1:1. Finalmente la solución fue llevada a un vial certificado para LC-MS/MS.

Los análisis de todas las muestras se realizaron por UHPLC-QqQ-MS/MS con un equipo Waters Acquity H-Class, con las siguientes condiciones:

Columna: UPLC EC-C18 POROSHELL Agilent $2.7\ \mu m$ de tamaño de partícula, $2.1\ mm \times 100\ mm$

Temperatura de la columna: $30\ ^\circ C$

Flujo: $0.25\ mL/min$

Tiempo de corrido: 7 minutos

Temperatura de las muestras (compartimiento de viales): $10\ ^\circ C$

Volumen de inyección: $20\ \mu L$

En la Tabla 5.9 se describen las condiciones de gradiente para el método de separación de cianotoxinas.

Tabla 5.9: Condiciones gradiente método de separación de cianotoxinas.

Tiempo (min)	Fase móvil A: ^a Acuosa	Fase móvil B: ^b Orgánica
1.3	20	80
3.2	0	100
3.85	10	90
4.5	50	50
5	90	10
7	90	10

^a Fase móvil A: Aguas: Metanol (95:5) 5 mM formiato de amonio.

^b Fase móvil B: Agua:Metanol (5:95) 5 mM formiato de amonio.

Los parámetros del espectrómetro de masas se describen a continuación:

Temperatura de la fuente: 150 °C

Temperatura de desolvatación: 350 °C

Flujo gas de desolvatación: 650 L/h

Flujo gas del cono: 50 L/h

Ionización: ESI (+)

Voltaje de capilaridad: 3.7 kV

Por último, se realizó la curva de calibración para cada cianotoxina. El rango de trabajo fue de 5 - 50 $\mu\text{g/L}$. Para preparar los puntos, se empleó un mix de cianotoxinas de 200 $\mu\text{g/L}$ en metanol grado LC/MS. Se prepararon 6 puntos a concentraciones de 5, 10, 20, 30, 40, y 50 $\mu\text{g/L}$. El límite de cuantificación se determinó como el menor valor al que se le calculó precisión y exactitud, en este caso 5 $\mu\text{g/L}$. El menor valor cuantificado en las muestras con un factor de concentración de 100, es 0.05 $\mu\text{g/L}$. Valores detectados en las muestras por debajo a este valor, fueron reportados como menor al límite de cuantificación (<LC). Las muestras fueron cuantificadas con las regresiones lineales obtenidas de cada curva de calibración.

5.6. Composición y diversidad bacteriana

El estudio de las comunidades microbianas se realizó con el objeto de indagar sobre la presencia de géneros de cianobacterias potencialmente tóxicos en el embalse. Este se hizo en 5 réplicas de muestras tomadas en las estaciones Chucurí y El Ramo, en el mes de septiembre de 2019. Se seleccionaron estas dos estaciones teniendo en cuenta los resultados de abundancia de cianobacterias obtenidos en los muestreos anteriores y las actividades contempladas para realizarse en estas zonas, según el Plan de Ordenamiento del Embalse.

Inicialmente, cada réplica de muestra se homogenizó y centrifugó en tubos cónicos de 500 mL en la centrifuga 5810 R (Eppendorf) a 3500 rpm y 4 °C, durante 20 minutos, para llevarlas de un volumen de 5 L a 250 mL. El agua se recuperó para luego filtrarla a través de filtros de membrana de éster de celulosa estériles (tamaño de poro de 0.45 μm), y recoger el material suspendido. Para extraer la biomasa de los filtros, se colocaron los filtros con perlas de vidrio en frascos de 200 mL, a los cuales se adicionaron 6 mL de NaCl 0.85 %, y se llevaron al vortex durante 5 minutos aproximadamente. La solución resultante se mezcló con la porción de la muestra centrifugada. Luego, toda la muestra se centrifugó en tubos cónicos de 50 mL en la centrifuga 5810 R (Eppendorf) a 10000 rpm y 4 °C durante 15 minutos; seguidamente se pasó a microtubos de 1.5 mL para centrifugar a 13000 rpm durante 10 minutos en centrifuga MiniSpin®(Eppendorf). De esta forma se recolectó la biomasa o el pellet que contenía la materia prima para llevar a cabo las extracciones de ADN. Las extracciones se realizaron usando el protocolo para muestras de 100-200 mg suelo del kit comercial E.Z.N.A.® Soil DNA kit (Omega bio-tek), siguiendo las instrucciones del fabricante, modificando el volumen final de elución de ADN a 50 μL . La integridad del material genético se verificó mediante electroforesis, además, se cuantificó la concentración (ABS260) y pureza del ADN

(ABS260/ABS280) en un NanoDrop™ 2000 UV-Vis espectrofotómetro (Thermo Scientific).

La construcción de la librería y la secuenciación de las muestras se llevó a cabo en MacroGen Inc. (Seúl, Corea del Sur) utilizando la plataforma Illumina Miseq. La librería se construyó mediante la fragmentación aleatoria de la muestra de ADN seguida de la ligadura de los adaptadores 3' y 5', la amplificación por PCR y la purificación en gel. La secuenciación de Illumina MiSeq (300 pb, lecturas de extremos emparejados) se realizó utilizando cebadores dirigidos a la región V3-V4 del gen 16S rARN (Tabla 5.10). Los datos crudos se procesaron en el entorno Qiime2 (v2019.10) [94]. Después de la demultiplexación se obtuvieron tablas de variantes de secuencia de amplicones (ASV) implementando DADA2 [95]. Las secuencias forward se recortaron en la posición 18 y se truncaron en 275, y las lecturas reverse se recortaron en la posición 25 y se truncaron en 220. Se asignó la taxonomía a cada secuencia representativa utilizando la base de datos SILVA [96] entrenada con las secuencias de cebadores de MacroGen. El árbol enraizado se generó en QIIME2 y se importó junto con la tabla ASV y la taxonomía a R v3.6.1 (<https://www.r-project.org/>) como un objeto 'phylo-seq' [97] para un análisis más detallado. Se eliminaron las secuencias sin clasificación a nivel de filo o pertenecientes a Archaea, Cloroplastos y Mitocondrias. Teniendo en cuenta el análisis de McKnight et al. [98] y McMurdie and Holmes [99], se utilizaron diferentes procedimientos de normalización de acuerdo con cada análisis: abundancias relativas para gráficos de composición, para los análisis de alfa y beta diversidad se utilizó la mediana de la profundidad de secuenciación, y para el análisis de abundancia diferencial se normalizó por la estabilización de varianza del paquete 'DeSeq2' [100].

Tabla 5.10: Primers empleados en la secuenciación de nueva generación.

Primer	Secuencia (5'-3')
Bakt 341F	CCTACGGGNGGCWGCAG
Bakt 805R	GACTACHVGGGTATCTAATCC

5.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó en el software libre R versión 3.6.3 (<https://www.r-project.org/>), implementando varios paquetes. Se empleó el ANOVA de una vía para comparar las medias de las variables *in situ*, parámetros fisicoquímicos y la concentración de cianobacterias entre las distintas estaciones de muestreo y entre campañas de muestreo. La normalidad y la homogeneidad de varianzas de las variables se evaluaron por medio de las pruebas de Shapiro-Wilks y de Levene, respectivamente. En los casos donde no se cumplió el supuesto de normalidad se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, y en los casos donde no se cumplió la suposición de homogeneidad de varianzas se empleó el ANOVA con corrección de Welch. Se determinó la existencia de diferencias entre las categorías de las variables cuando al comparar el *valor - p* con el nivel de significancia α , se cumplió que $\text{valor} - p < \alpha$, con $\alpha = 0.05$. Fue necesario transformar las variables que no cumplieron con los supuestos mediante transformaciones de potencia, para aplicar los análisis mencionados. Las comparaciones *post hoc* se hicieron mediante la prueba de Tukey o Holm. Adicionalmente, se calcularon las correlaciones de Spearman, y se realizó un análisis de componentes principales (ACP) estandarizado, para examinar la relación entre las variables de estudio.

Para los análisis diversidad de la comunidad bacteriana y dentro del grupo Cianobacteria, se calcularon los índices de riqueza observada y de Shannon utilizando la función ‘estimate_richness’ del paquete ‘phyloseq’. Posteriormente, se verificó que estos índices cumplieran con los supuestos de normalidad y homocedasticidad con las pruebas de Shapiro-Wilks y Barlett, respectivamente, y se realizó un ANOVA para observar las diferencias entre las estaciones de muestreo. Por otro parte, se calculó el índice de disimilitud de Bray-Curtis y sobre este se realizó un análisis de coordenadas principales (ACoP), utilizando la función ‘ordinate’, y se probó la influencia de cada estación de muestreo con la función ‘Adonis’ (999 permutaciones) del paquete ‘vegan’ [101]. La abundancia diferencial se probó con el paquete ‘DeSeq2’ y los resultados se filtraron para aquellos con un valor de p ajustado igual o inferior a 0.05 [100].

6. Resultados

6.1. Variables *in situ* y parámetros fisicoquímicos

En la Tabla 6.1 se muestran las medidas descriptivas de las variables *in situ* y parámetros fisicoquímicos. En la Tabla 6.2 se presenta un resumen de los resultados de la ANOVA, con un 95 % de confianza, donde se indica en negrilla la variable que tuvo cambios por campaña o por estación. En los casos donde no se cumplieron los supuestos se aplicó una prueba alternativa. De las variables medidas en laboratorio se muestran los resultados para el COD, COT y clorofila-a, las demás variables (nitrógeno total, amonio, nitratos, fósforo total y hierro disuelto) presentaron, en su mayoría, valores por debajo del límite de cuantificación de los métodos.

Tabla 6.1: Medidas descriptivas de las variables *in situ* y parámetros fisicoquímicos.

Variable	Media	Varianza	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Mínimo	Máximo
LZF (m)	4.05	0.80	0.90	22 %	1.50	5.46
pH	8.72	0.09	0.31	4 %	8.22	9.26
T (°C)	29.84	1.26	1.12	4 %	27.30	32.10
CE ($\mu S/cm$)	185.67	489.87	22.13	12 %	140.20	228.00
OD (mg/L)	7.76	0.21	0.45	6 %	7.06	8.92
COD (mg/L)	2.91	0.32	0.57	19 %	2.03	3.68
COT (mg/L)	3.18	0.41	0.64	20 %	2.31	4.08
Clorofila-a (mg/L)	10.8	478.60	21.88	202 %	0.00	90.78

La dinámica de las variables *in situ* en el embalse se muestra en la Figura 6.1, donde el LZF estuvo en un intervalo entre 1.50 y 5.46 m. Se encontró que en la estación Trigueros el LZF permaneció por debajo de la media (4.05 ± 0.80 m) en todos los muestreos, sin embargo, el valor mínimo

corresponde a la estación Chucurí, que presentó una disminución notable en esta variable a partir del muestreo M2. El promedio de la temperatura superficial del agua durante el periodo de estudio fue de 29.84 ± 1.26 °C (Tabla 6.1). En general, la temperatura del agua en Presa fue menor que en las demás estaciones y se mantuvo por debajo del promedio en los 4 muestreos; posiblemente por la hora en la que se realizó la toma de muestra en este punto, que normalmente fue en las primeras horas de la mañana o finalizando el día, mientras que las demás estaciones se muestrearon cerca del mediodía. A pesar de ello, no se encontraron diferencias significativas en la temperatura por estaciones de acuerdo con los resultados de la ANOVA ($F(6, 20) = 1.95$, $p > 0.05$). Adicionalmente, se aprecia que hay una disminución generalizada en la temperatura superficial del agua en el embalse durante el muestreo M2. El pH del agua fue básico en los 4 muestreos, con un promedio de 8.72 ± 0.31 .

Tabla 6.2: Diferencias en las variables *in situ* y parámetros fisicoquímicos, respecto a la campaña y la estación de muestreo.

Variable	Campaña valor-p	Estación valor-p
LZF	0.12	0.23
T	0.12	0.12
CE	0.00017^a	0.92
OD	0.057	0.74 ^b
COT	0.0028^a	0.68 ^a
COD	0.012^a	0.40 ^a
Clorofila-a	0.00022^b	0.84

p < 0.05, ANOVA para la campaña y la estación de muestreo.

En negrilla, factor significativo.

^a Prueba de Kruskal-Wallis.

^b ANOVA con corrección de Welch.

En cuanto a la CE, esta fue similar en las estaciones Chucurí, El Ramo, La Estrella, Mirabel y Tablazo, mostrando una disminución gradual en el transcurso de las campañas de muestreo, hasta alcanzar el mínimo en el muestreo M4. De hecho hubo una diferencia significativa en la CE entre las campañas de muestreo ($H(3) = 19.98$, $p = 0.00017$), y las comparaciones entre las campañas indicaron que la CE fue significativamente mayor en el M1. Se observa que, en general, la CE en Chucurí fue superior al resto de las estaciones. Esto no se cumple para la estación Presa donde hubo un pico en la CE en el muestreo M2, y para la estación Trigueros, que mostró un comportamiento contrario al resto del embalse en el muestreo M4. Finalmente, se puede identificar una tendencia de incremento en el OD durante el periodo de estudio. Dicho patrón no ocurrió en la estación Chucurí, donde el OD aumentó durante el muestreo M1 y M3, y disminuyó en los muestreos M2 y M4.

Algunos de los parámetros fisicoquímicos monitoreados, presentaron valores por debajo del límite de cuantificación de los métodos, entre ellos, las distintas formas de nitrógeno, el fósforo total y el hierro disuelto. Para los nitratos hubo tres observaciones por encima del límite de cuantificación ($LC = 0.200$ mg/L), en la estación Mirabel en la campaña M1 (0.244 mg/L) y M2 (0.217 mg/L), y en la estación La Estrella en la campaña M2 (0.244 mg/L). En el caso del nitrógeno

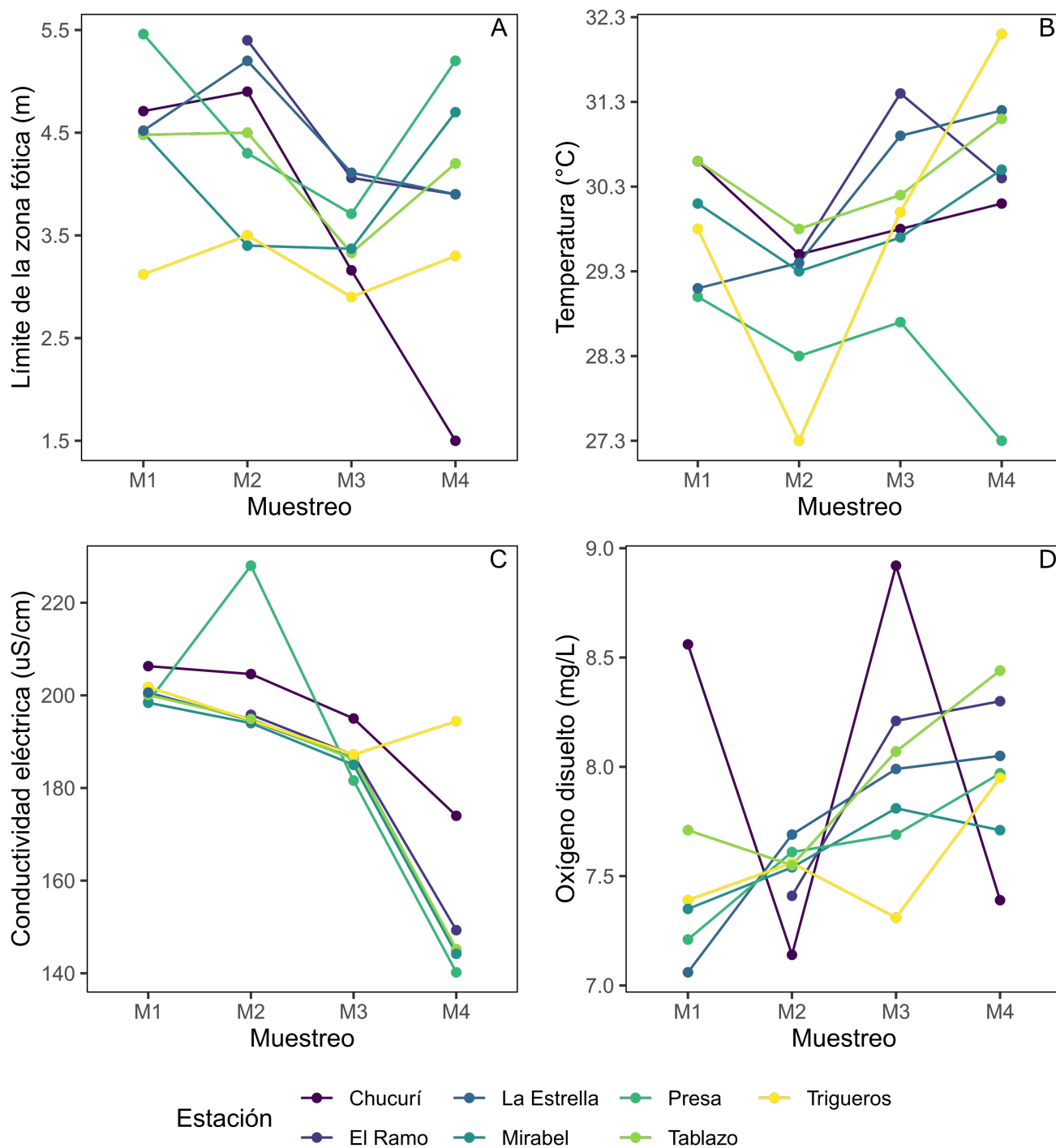


Figura 6.1: Dinámica de las variables *in situ* en el embalse Topocoro entre junio de 2017 y marzo de 2018; límite de la zona fótica (A), temperatura (B), conductividad eléctrica (C) y oxígeno disuelto (D).

total Kjeldahl, se encontraron nueve resultados dentro del rango de trabajo del método ($0.5 - 22.0$ mg/L N) a partir del muestreo M2 en distintas estaciones; se destacan los resultados de la estación Chucurí en el muestreo M2 (1.0 mg/L N) y M4 (1.1 mg/L N) ya que superaron 1.0 mg/L N. Así mismo, se observaron ocho resultados dentro del rango de trabajo establecido por el método del amonio ($0.06 - 3.86$ mg/L NH_4^+) especialmente en la campaña de muestreo M4, donde todas las estaciones a excepción de Tablazo y Mirabel, tuvieron concentraciones por encima de 0.06 mg/L NH_4^+ ; nuevamente se distingue el resultado de Chucurí por ser el mas elevado con un valor de 0.14 mg/L NH_4^+ . Por último, en la campaña de muestreo M1 todas las estaciones mostraron valores dentro del rango de trabajo del fósforo total ($0.05 - 1.50$ mg/L P), mientras que para el hierro disuelto ($LC = 0.050$ mg/L Fe) se hallaron valores cuantificables en cuatro de las seis estaciones monitoreadas, estas son: Chucurí (0.076 mg/L Fe), Mirabel (0.050 mg/L Fe), Presa (0.101 mg/L Fe), y Tablazo (0.069 mg/L Fe).

En la Figura 6.2 se muestra la dinámica de los parámetros físicoquímicos. Tanto el COD como el COT, en general, tuvieron valores inferiores en los muestreos M3 y M4, siendo menor en el muestreo M3. De hecho hubo una diferencia significativa del COT ($H(3) = 14.11$, $p = 0.0028$) y COD ($H(3) = 10.90$, $p = 0.012$) por muestreo. Para el COT se encontró diferencia entre los muestreos M1 y M2, con el M3 y M4; mientras que para el COD se encontró diferencia entre los muestreos M1 y M2, con el M4. Las estaciones Chucurí y Tablazo no siguieron este patrón, ya que la concentración de ambas variables se mantuvo en el mismo nivel durante los primeros 3 muestreos, y luego disminuyó en la campaña M4. En promedio, la relación entre el COT y COD en el embalse fue de 0.91 ± 0.08 , por lo que predomina la forma disuelta del carbono. Finalmente, se destaca el comportamiento de la clorofila-a en el muestreo M2, donde todas las estaciones exhibieron concentraciones mayores al resto de las campañas de muestreo; especialmente en las estaciones Chucurí, El Ramo y Presa, donde se alcanzaron valores de 61.94 , 52.96 y 90.78 mg/L, respectivamente. Para el resto de los muestreos, la clorofila-a se mantuvo por debajo de 5.00 mg/L.

6.2. Cianobacterias

Para el período de estudio, se obtuvieron concentraciones de cianobacterias en un rango entre $4.02(\pm 0.18) \times 10^4$ y $2.72(\pm 0.28) \times 10^7$ copias de Cyan 16S/ μL , el mínimo corresponde a la estación Mirabel en M1 y el máximo a la estación Chucurí en la campaña M4. En la Tabla 6.3 se muestra un resumen de los resultados de la cuantificación basada en qPCR de la abundancia del gen 16S rARN de cianobacterias en el embalse Topocoro.

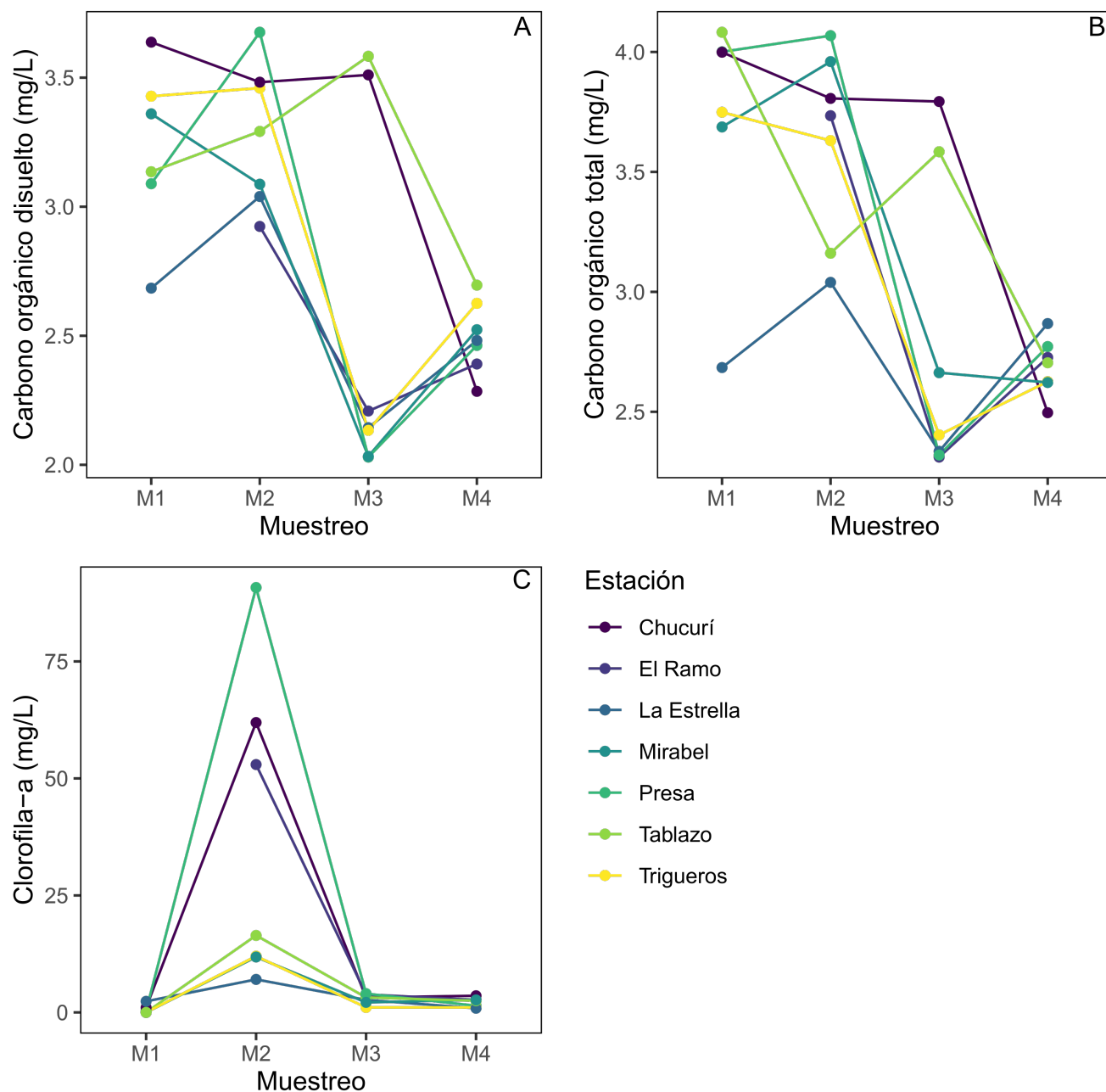


Figura 6.2: Dinámica de los parámetros fisicoquímicos en el embalse Topocoro entre junio de 2017 y marzo de 2018; carbono orgánico disuelto (A), carbono orgánico total (B) y clorofila-a (C).

Tabla 6.3: Abundancia de cianobacterias en número de copias del gen Cyan 16S rARN de cianobacterias por μL (copias de Cyan 16S/ μL), en las distintas estaciones de muestreo en el embalse Topocoro, por campaña de muestreo.^a

Estación	Campaña de muestreo			
	M1	M2	M3	M4
Chucurí	$1.95(\pm 0.08) \times 10^6$	$2.68(\pm 0.10) \times 10^7$	$9.11(\pm 2.00) \times 10^6$	$2.72(\pm 0.28) \times 10^7$
El Ramo	NA	$9.35(\pm 0.59) \times 10^6$	$3.25(\pm 0.13) \times 10^6$	$3.10(\pm 1.04) \times 10^6$
La Estrella	$8.18(\pm 0.18) \times 10^6$	$2.24(\pm 0.13) \times 10^6$	$3.08(\pm 0.63) \times 10^6$	$2.87(\pm 0.37) \times 10^6$
Mirabel	$4.02(\pm 0.11) \times 10^4$	$3.89(\pm 2.26) \times 10^6$	$4.43(\pm 0.06) \times 10^5$	$9.20(\pm 0.70) \times 10^4$
Presa	$2.43(\pm 1.11) \times 10^6$	$5.08(\pm 0.16) \times 10^6$	$2.44(\pm 0.17) \times 10^6$	$9.80(\pm 3.06) \times 10^4$
Tablazo	$8.15(\pm 0.56) \times 10^5$	$6.70(\pm 0.27) \times 10^6$	$8.55(\pm 0.48) \times 10^5$	$4.19(\pm 0.78) \times 10^4$
Trigueros	$1.79(\pm 0.12) \times 10^6$	$6.40(\pm 0.36) \times 10^6$	$2.88(\pm 1.73) \times 10^6$	$7.28(\pm 0.58) \times 10^4$

^a Promedio de las réplicas de laboratorio $n = 3$ ($\pm$ desviación estándar), a excepción de la estación Mirabel en el muestreo M2 donde $n = 2$.

NA: Dato no disponible, debido a que en el muestreo M1 no se monitoreó la estación El Ramo.

En la Figura 6.3 se muestra la concentración de cianobacterias en el embalse en relación con las campañas de muestreo. En términos generales, se evidencia que la concentración de cianobacterias en el agua es mayor en el muestreo M2 durante la época seca, que en las otras tres campañas de muestreo; hecho que coincide con el aumento de la clorofila-a (ver Figura 6.3). Además, se destaca para cada campaña de muestreo un valor extremo, que corresponde a las estaciones La Estrella ($8.18(\pm 0.18) \times 10^6$ copias de Cyan 16S/ μL) en el M1 y Chucurí del M2 al M4 ($2.68(\pm 0.10) \times 10^7$, $9.11(\pm 2.00) \times 10^6$, y $2.72(\pm 0.28) \times 10^7$ copias de Cyan 16S/ μL , respectivamente). Los resultados de la ANOVA no mostraron diferencias significativas en la abundancia de cianobacterias por campaña de muestreo ($F(3, 23) = 2.56$, $p > 0.05$).

En cuanto a las diferencias observadas de la concentración de cianobacterias entre las estaciones de muestreo (Figura 6.4), resalta el comportamiento de la estación Chucurí, ya que esta presenta una variabilidad mayor con respecto a las demás estaciones y, en general, valores más elevados de la concentración de cianobacterias. Continúan en el orden de concentración de cianobacterias, las estaciones El Ramo y La Estrella. Estas tres estaciones (Chucurí, El Ramo y La Estrella) se encuentran ubicadas en el margen izquierdo del embalse por la zona donde ingresan las aguas del Río Chucurí; Chucurí se localiza en el área más próxima al ingreso del tributario y El Ramo en un sitio con características morfológicas especiales, donde se forma una concavidad en la línea costera, por lo que se esperan aguas más quietas (Figura 5.1). Las demás estaciones, con menor concentración de cianobacterias, se encuentran en la zona central y cerca de la presa. En las estaciones La Estrella, Mirabel, Presa y Tablazo, se observa un valor extremo correspondiente a la concentración de cianobacterias en el muestreo M1 para La Estrella, y M2 para las demás estaciones. Como se

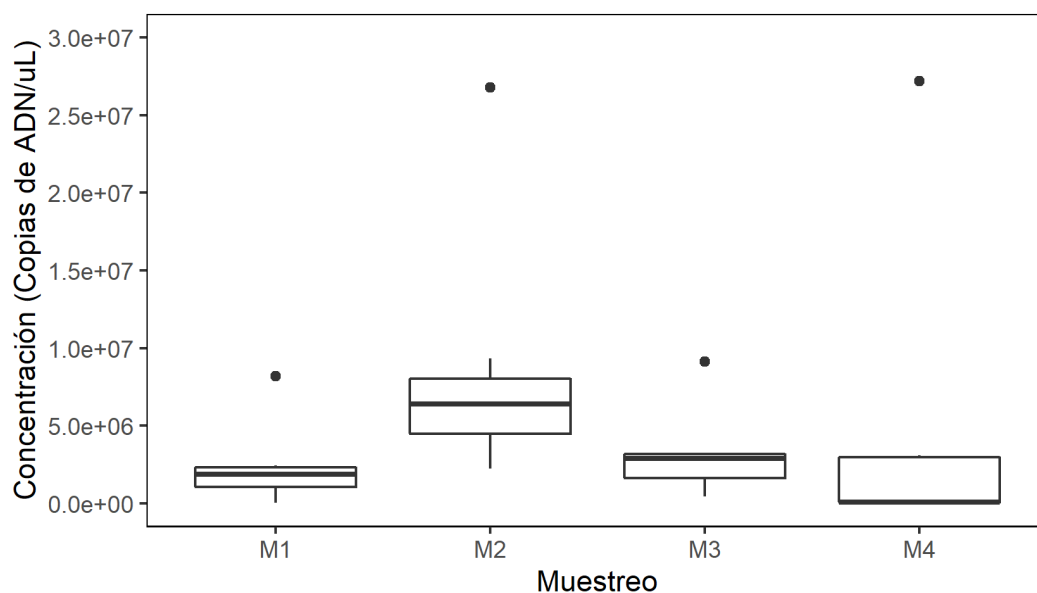


Figura 6.3: Diagrama de cajas y bigotes de la concentración de cianobacterias por campaña de muestreo.

había mencionado anteriormente el muestreo M2, fue donde se encontró mayor concentración de cianobacterias y clorofila-a. Según los resultados de la ANOVA ($F(6, 20) = 2.74, p < 0.05$), existen diferencias significativas en la concentración de cianobacterias por estación, y el análisis de Tukey reveló una diferencia significativa entre Chucurí y Mirabel ($t = -3.57, p < 0.03$).

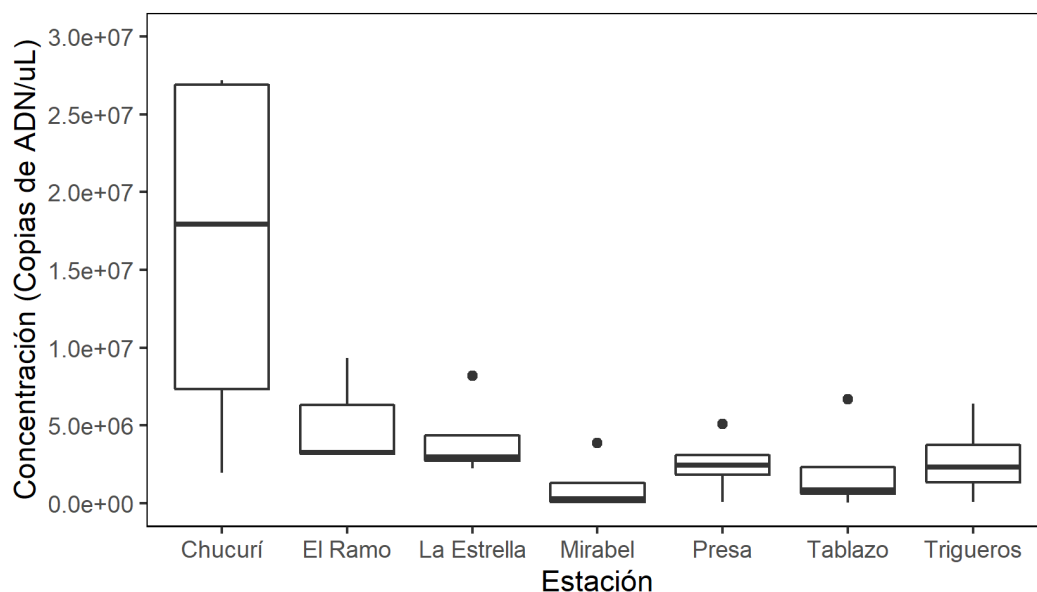


Figura 6.4: Diagrama de cajas y bigotes de la concentración de cianobacterias por estación de muestreo.

6.3. Variables *in situ*, parámetros fisicoquímicos y concentración de cianobacterias

Se realizó un análisis de componentes principales para evaluar la relación entre las variables *in situ*, parámetros fisicoquímicos y la concentración de cianobacterias en el embalse. La regla de Kaiser y la prueba Scree sugieren que se deben retener 3 componentes principales (CP), estas resumen el 71.94 % (CP1 = 38.68 %, CP2 = 18.72 %, CP3 = 14.53 %) de la variabilidad de los datos. En la Figura 6.5 se aprecia que hay un agrupamiento de las observaciones por campaña de muestreo y, que la CP1 señala un patrón temporal que separa las observaciones de las campañas de muestreo M2 y M4. Las muestras de agua recolectadas durante el muestreo M2 presentaron altos valores de CE, COT y COD, así como altas concentraciones de clorofila-a y cianobacterias, pero concentraciones bajas de OD; lo contrario ocurrió durante el muestreo M4. Precisamente, en la estación Chucurí donde se evidenció un comportamiento distinto, se presentaron en promedio valores más elevados de dichas variables durante el periodo de estudio (CE: $194.98 \pm 14.84 \mu S/cm$, COT: 3.52 ± 0.69 mg/L, COD: 3.23 ± 0.63 mg/L, y cianobacterias: $1.62(\pm 1.27) \times 10^7$ copias de Cyan 16S/ μL); e incluso concentraciones de nitrógeno total por encima de 0.5 mg/L N a partir del muestreo M2, mientras que en las demás estaciones los resultados estuvieron en su mayoría por debajo del límite de cuantificación del método. A pesar de esto, la concentración de cianobacterias no mostró una correlación significativa con el resto de las variables ambientales a excepción de la clorofila-a ($\rho = 0.66$, $p = 0.0002$). La CP2 sitúa la variable cianobacterias con oxígeno disuelto en sentidos opuestos, con una correlación negativa entre ellas ($\rho = -0.31$, $p > 0.05$). La matriz de correlaciones se muestra en la Figura 6.6.

6.4. Estado trófico

Con el fin de determinar el estado trófico del embalse, se estimaron los índices de estado trófico de acuerdo con Carlson [90] y Toledo en Klippel et al. [91], empleando las variables individuales profundidad del disco Secchi y clorofila-a. Los resultados se muestran promediados por estación de muestreo en la Tabla 6.4. Se observa que hay discrepancia entre el índice calculado a partir de la profundidad del disco Secchi y la clorofila-a en el IET-Ca, donde todas las estaciones del embalse resultaron clasificadas como eutróficas según el IET DS, mientras que mediante el IET Cla solo la estación El Ramo se clasificó como eutrófica. Los resultados del IET-To mostraron mayor correspondencia entre las dos variables, indicando condiciones oligotróficas y mesotróficas en el embalse. En el IET-To solo se presentaron diferencias en las estaciones El Ramo y Trigueros.

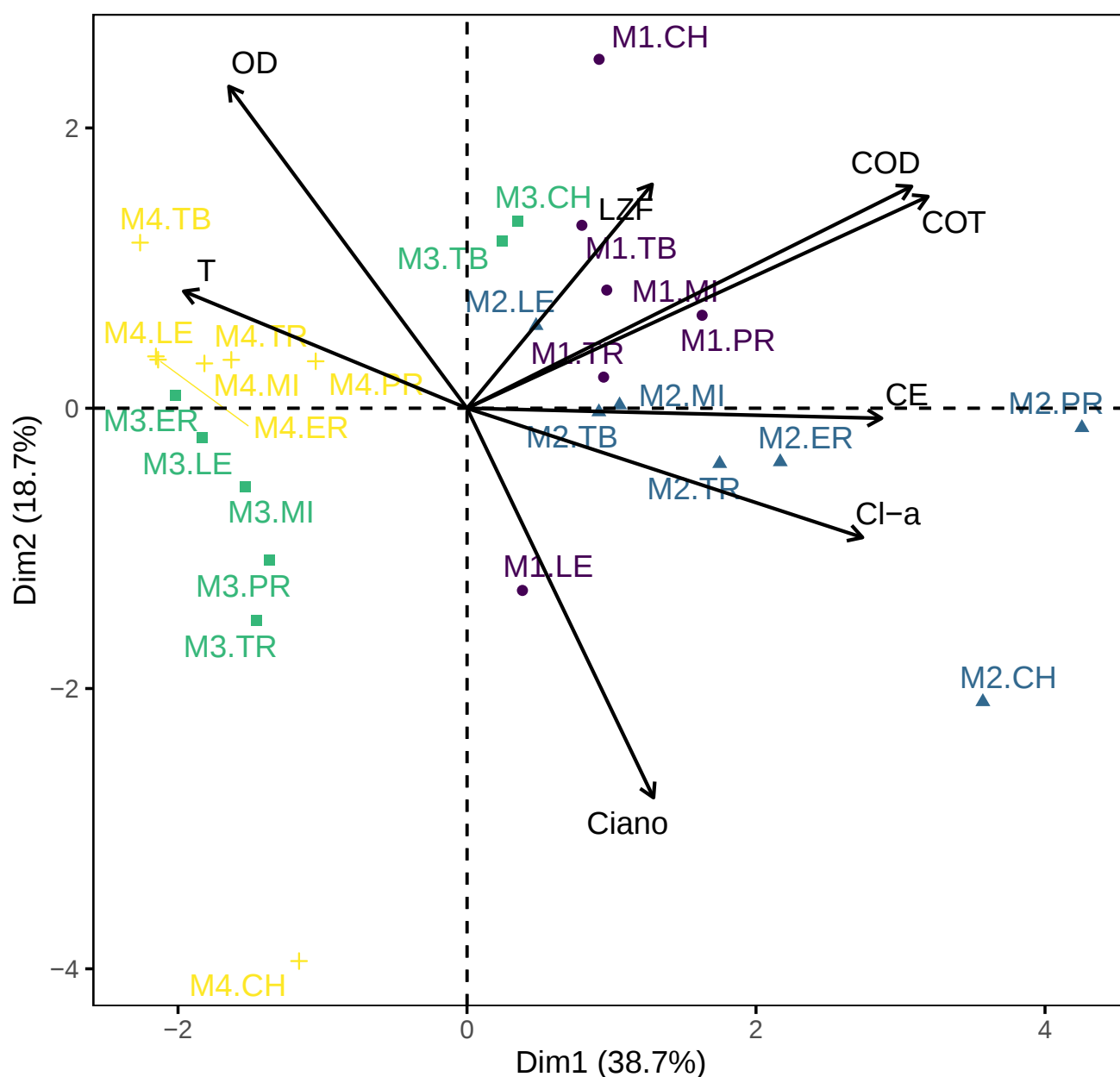


Figura 6.5: Ordenación bidimensional de ACP de las muestras de agua tomadas en el embalse Topocoro entre junio de 2017 y marzo de 2018. Las variables *in situ*, parámetros fisicoquímicos y cianobacterias aparecen como vectores. Los puntos están identificados por la campaña de muestreo, seguidos de dos letras que abrevian la estación de muestreo. Las formas indican la campaña de muestreo (círculo: M1, triángulo: M2, cuadrado: M3 y cruz: M4.). Abreviaturas: CH: Chucurí, ER: El Ramo, LE: La Estrella, MI: Mirabel, PR: Presa, TB: Tablazo y TR: Trigueros.

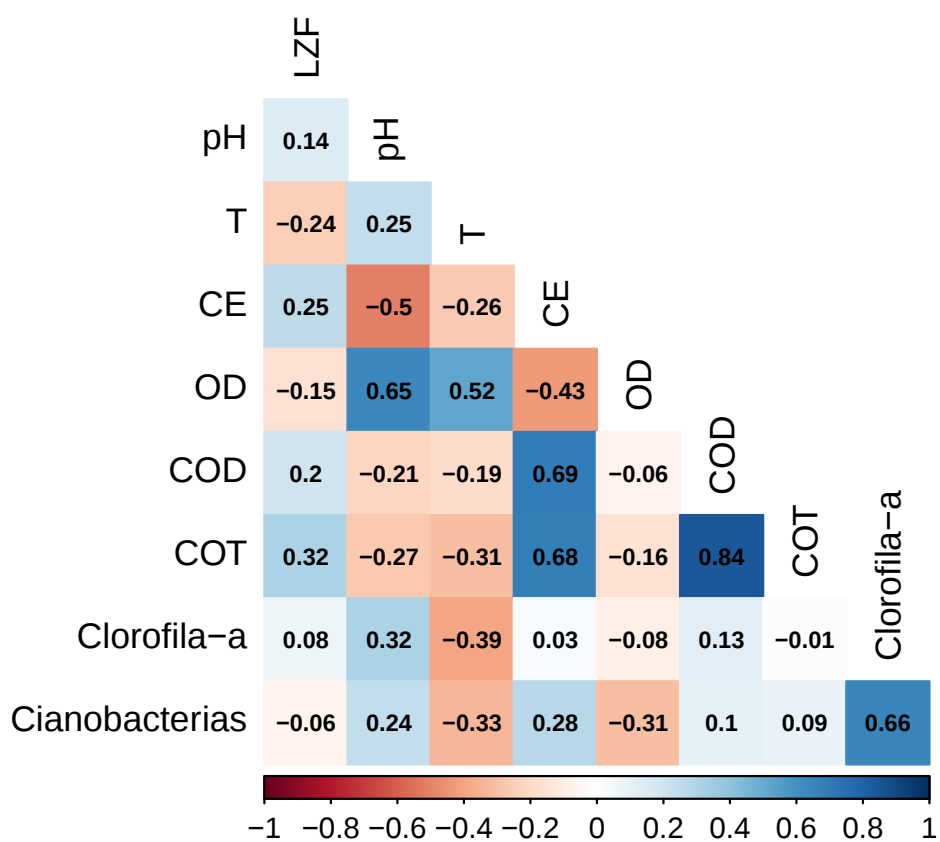


Figura 6.6: Matriz de correlaciones para las variables *in situ*, parámetros fisicoquímicos y la concentración de cianobacterias en el embalse.

Tabla 6.4: Índices de estado trófico de variables individuales.

IET-Ca				
Estación	IET DS	Clasificación	IET Cla	Clasificación
Chucurí	57.39 ± 7.85	Eutrófico	46.73 ± 7.85	Mesotrófico
El Ramo	52.96 ± 2.58	Eutrófico	51.16 ± 2.58	Eutrófico
La Estrella	52.95 ± 1.85	Eutrófico	39.60 ± 1.85	Oligotrófico
Mirabel	54.52 ± 2.56	Eutrófico	44.35 ± 2.56	Mesotrófico
Presa	52.28 ± 2.59	Eutrófico	43.45 ± 2.59	Mesotrófico
Tablazo	53.97 ± 2.07	Eutrófico	46.51 ± 2.07	Mesotrófico
Trigueros	57.55 ± 1.19	Eutrófico	39.14 ± 1.19	Oligotrófico
IET-To				
Estación	IET DS	Clasificación	IET Cla	Clasificación
Chucurí	48.16 ± 7.85	Mesotrófico	47.09 ± 7.85	Mesotrófico
El Ramo	43.73 ± 2.58	Oligotrófico	51.62 ± 2.58	Mesotrófico
La Estrella	43.72 ± 1.85	Oligotrófico	39.80 ± 1.85	Oligotrófico
Mirabel	45.28 ± 2.56	Mesotrófico	44.66 ± 2.56	Mesotrófico
Presa	43.05 ± 2.59	Oligotrófico	43.73 ± 2.59	Oligotrófico
Tablazo	44.74 ± 2.08	Mesotrófico	46.87 ± 2.08	Mesotrófico
Trigueros	48.33 ± 1.19	Mesotrófico	39.33 ± 1.19	Oligotrófico

Abreviaturas: IET-Ca, índice del estado trófico de Carlson; IET-To, índice del estado trófico de Toledo; IET DS, promedio del índice del estado trófico de la profundidad del disco secchi $\pm$ desviación estándar; IET Cla, promedio del índice del estado trófico de la clorofila-a $\pm$ desviación estándar.

6.5. Cianotoxinas

Los resultados del análisis de cianotoxinas estuvieron por debajo del límite de cuantificación del método de $0.05 \mu\text{g}/L$, para todas las estaciones de muestreo en todas las campañas; a pesar de ello, se detectó la presencia de cianotoxinas en al menos seis de las siete estaciones monitoreadas en las distintas campañas de muestreo. En el muestreo M1 se detectó MC-RR en la estación La Estrella y Mirabel, y MC-LR en la estación Mirabel. De forma similar, se detectó MC-LR en la estación La Estrella durante el muestreo M2, y MC-YR en el muestreo M3. Por último, en el muestreo M4 se detectó MC-LR en las estaciones Presa y Trigueros, MC-YR en El Ramo, y NOD en la estación Tablazo. La toxina NOD solo se detectó en la estación Tablazo. Se destaca el hecho de que en la estación Chucurí, que fue la estación con mayor concentración de cianobacterias en el embalse, no se reportó la presencia de cianotoxinas. Por el contrario, en la estación Mirabel que mostró el valor mínimo de cianobacterias, se detectó la presencia de dos variantes de MC en el M1. Esto puede asociarse con el hecho de que las poblaciones de cianobacterias pueden estar dominadas por una sola especie o estar compuestas por una variedad de especies, algunas de las cuales pueden no ser tóxicas. Incluso dentro de una floración de una sola especie puede haber una mezcla de cepas tóxicas y no tóxicas [24].

Es importante resaltar que en todas las estaciones de muestreo y en todas las campañas, la concentración de las toxinas detectadas se encontró por debajo de $0.05 \mu\text{g}/\text{L}$, que es el límite de cuantificación del método, por lo que en el embalse no se superó el valor guía establecido por la OMS para agua potable de $1.0 \mu\text{g}/\text{L}$ de MC-LR [14], ni el valor guía para el nivel de riesgo bajo de exposición en cuerpos de agua para uso recreativo ($< 10 \mu\text{g}/\text{L}$ de MC-LR equivalente) [27, 73]. De lo anterior, es posible afirmar que es seguro realizar las actividades complementarias propuestas en el Plan de Ordenamiento del Embalse como: pesca, uso de agua para consumo humano y agrícola, ecoturismo y actividades recreativas, deportes náuticos y transporte fluvial [45], en términos de exposición a las toxinas de cianobacterias.

6.6. Comunidades microbianas

Se realizó un análisis de la composición y diversidad de las comunidades microbianas en las muestras recolectadas en las estaciones Chucurí y El Ramo, el 03 y 04 de septiembre de 2019, con el fin de identificar la presencia de cianobacterias potencialmente productoras de cianotoxinas en el embalse. Estos puntos fueron seleccionados debido a que presentaron los valores más elevados de la concentración de cianobacterias dentro del embalse. Aunque las muestras se recopilaron con 5 réplicas en ambas estaciones, se presentaron dificultades en el procesamiento de una de las réplicas de la estación El Ramo, por lo que no se presentan sus resultados. En la Tabla 6.5 se encuentran los resultados de las variables *in situ* y parámetros fisicoquímicos para estas muestras. En general los resultados fueron similares en ambas estaciones, a excepción del nitrógeno total y el amonio, que para Chucurí estuvieron por debajo del límite de cuantificación de los métodos, y para la clorofila-a que fue mayor en Chucurí. Esta campaña de monitoreo se desarrolló durante la época seca, el volumen de llenado del embalse Topocoro era de 3822.05 Mm^3 , con un porcentaje de llenado de 88.60 %.

Tabla 6.5: Variables *in situ* y parámetros fisicoquímicos correspondientes a las muestras para análisis de la composición y diversidad de las comunidades microbianas, en las estaciones Chucurí y El Ramo.

Variable	Chucurí	El Ramo
LZF (m)	3.00	4.00
pH	8.09	8.30
T ($^{\circ}\text{C}$)	29.90	31.70
CE ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	201.00	198.90
OD (mg/L)	7.18	7.86
P_{Total} (mg/L)	0.07	0.05
N_{Total} (mg/L)	<0.50	0.90
Amonio (mg/L NH_4^+)	<0.06	0.09
Nitratos (mg/L NO_3)	0.45	0.37
COD (mg/L)	4.16	4.72
Fe_{Disuelto} (mg/L)	<0.05	<0.05
Clorofila-a (mg/L)	1.83	0.04

En la Tabla 6.6 se muestran los resultados del análisis de abundancia de cianobacterias en las dos

estaciones. Los resultados del análisis de las 4 cianotoxinas estuvieron por debajo del límite de cuantificación del método de $0.05 \mu\text{g}/L$, para ambas estaciones de muestreo.

Tabla 6.6: Abundancia de cianobacterias en número de copias de Cyan 16S/ μL , correspondientes a las muestras para análisis de la composición y diversidad de las comunidades microbianas, en las estaciones Chucurí y El Ramo.^a

Réplica	Chucurí	El Ramo
1	$2.61(\pm 0.59) \times 10^7$	$1.33(\pm 0.10) \times 10^7$
2	$5.28(\pm 0.74) \times 10^7$	$6.48(\pm 0.82) \times 10^6$
3	$2.36(\pm 0.16) \times 10^7$	$1.66(\pm 0.53) \times 10^7$
4	$1.97(\pm 0.22) \times 10^7$	$1.14(\pm 0.32) \times 10^7$
5	$5.85(\pm 0.80) \times 10^7$	NA

^a Promedio de las réplicas de laboratorio $n = 2$ ($\pm$ desviación estándar).

NA: Dato no disponible.

6.6.1. Barras de composición

En las muestras analizadas se identificaron 1652 ASVs bacterianos correspondientes a 20 filos, 48 clases, 106 órdenes, 174 familias y 287 géneros. En la Figura 6.7 se muestran los filos que contenían ASVs con una abundancia mayor al 1 %, los demás se agruparon en la categoría “Otros”. Los filos con mayor abundancia relativa en ambas estaciones fueron Proteobacteria y Cyanobacteria, con un promedio de 40.81 ± 2.41 % y de 31.29 ± 4.71 %, respectivamente; seguido del filo Bacteroidetes con un promedio de 11.83 ± 4.45 %. Los filos Firmicutes, Planctomycetes y Verrucomicrobia mostraron una abundancia relativa promedio entre 2.13 y 6.41 %. En la categoría Otros se encontraron 14 filos, entre los que se destacan Actinobacteria y Deinococcus-Thermus, porque fueron los de mayor abundancia relativa dentro de este grupo.

A nivel de filo, no se apreciaron diferencias entre la abundancia relativa de las categorías Proteobacteria y Cyanobacteria de las dos estaciones. Sin embargo, al observar en detalle las clases de Proteobacteria, se encontró que la abundancia de Alphaproteobacteria y Deltaproteobacteria fue mayor en la estación Chucurí, mientras que la abundancia de Gammaproteobacteria fue superior en la estación El Ramo. Tanto en Chucurí como en El Ramo, la presencia de Deltaproteobacteria fue menor con respecto a la abundancia relativa de las otras clases de Proteobacteria. Adicionalmente, se evidenció que las abundancias relativas de los filos Bacteroidetes y Firmicutes fueron mayor en la estación El Ramo, mientras que las abundancias relativas de Planctomycetes y Verrucomicrobia fueron mayor en Chucurí.

En la Figura 6.8 se presenta la abundancia relativa de los géneros dentro del grupo Cyanobacteria identificados en la zona de estudio. En promedio el género que predominó en ambas estaciones de muestreo fue *Cyanobium PCC-6307*, con el 98.36 ± 2.79 % en Chucurí y el 71.44 ± 29.47 % en El Ramo. El siguiente género con mayor abundancia relativa fue *Microcystis PCC-7914*, cuya abundancia es superior en la estación El Ramo, especialmente en la réplica 1 con un porcentaje

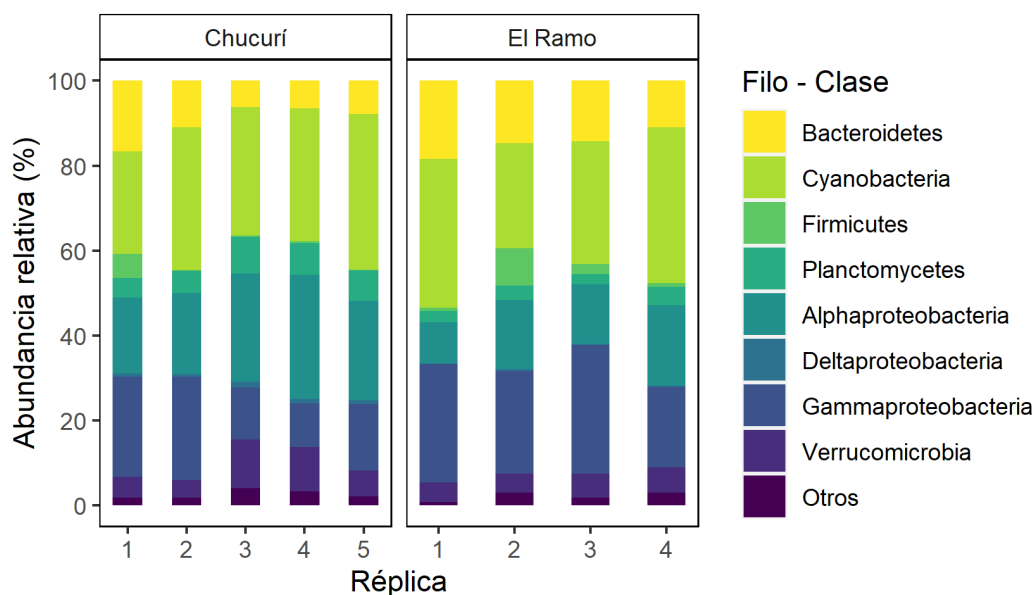


Figura 6.7: Barras de abundancia relativa de los filos en las estaciones Chucurí y El Ramo, para cada réplica. En el caso de Proteobacteria se muestran sus clases Alphaproteobacteria, Deltaproteobacteria y Gammaproteobacteria.

de 71.22 % dentro del filo Cyanobacteria. La presencia de *Microcystis PCC-7914* en Chucurí, solo fue apreciable en la réplica 1 con un porcentaje de 2.31 %. El género *Microcystis PCC-7914* está ampliamente documentado como productor de hepatotoxinas y neurotoxinas en ambientes de agua dulce [2, 13, 18, 19, 40, 68]. En menor proporción se encontró en las muestras el género *Merismopedia 0BB39S01*, que fue más abundante en El Ramo y, *Nodosilinea PCC-7104* que fue más abundante en Chucurí. Los géneros *Cyanobium* y *Merismopedia* han sido asociados con la producción de hepatotoxinas [57, 102]. El género *Chrysosporum KA1.1* fue hallado con una abundancia relativa mínima en la réplica 1 de El Ramo (0.03 %), correspondiente a un único ASV. De acuerdo con varios estudios [4, 7, 10, 103], la toxina Cilindrospermopsina ha sido detectada en la especie *Chrysosporum ovalisporum*. De la categoría Uncultured cyanobacterium solo se encontró un ASV en la réplica 5 de Chucurí y, la categoría N/A estuvo presente en proporciones reducidas en todas las réplicas de la estación Chucurí y en la réplica 2 de El Ramo.

6.6.2. Alfa diversidad y Beta diversidad

Alfa-diversidad

En la Figura 6.9 se muestra la riqueza observada (número de ASVs encontrados) y el índice de Shannon para ambas estaciones. El intervalo de la riqueza observada para Chucurí está comprendido entre 439 y 599, mientras que para El Ramo está entre 389 y 540. En promedio la riqueza observada es menor en El Ramo (462.20 ± 62) que en Chucurí (501.60 ± 61.55), pero según los resultados de la ANOVA ($F(1, 7) = 0.91, p > 0.05$), no se encontraron diferencias significativas entre las estaciones de muestreo. De forma similar, el índice de Shannon en promedio es menor en El Ramo (4.25 ± 0.46) que en Chucurí (4.65 ± 0.21), aunque tampoco se encontraron diferencias significativas de acuerdo con la ANOVA ($F(1, 7) = 2.94, p > 0.05$).

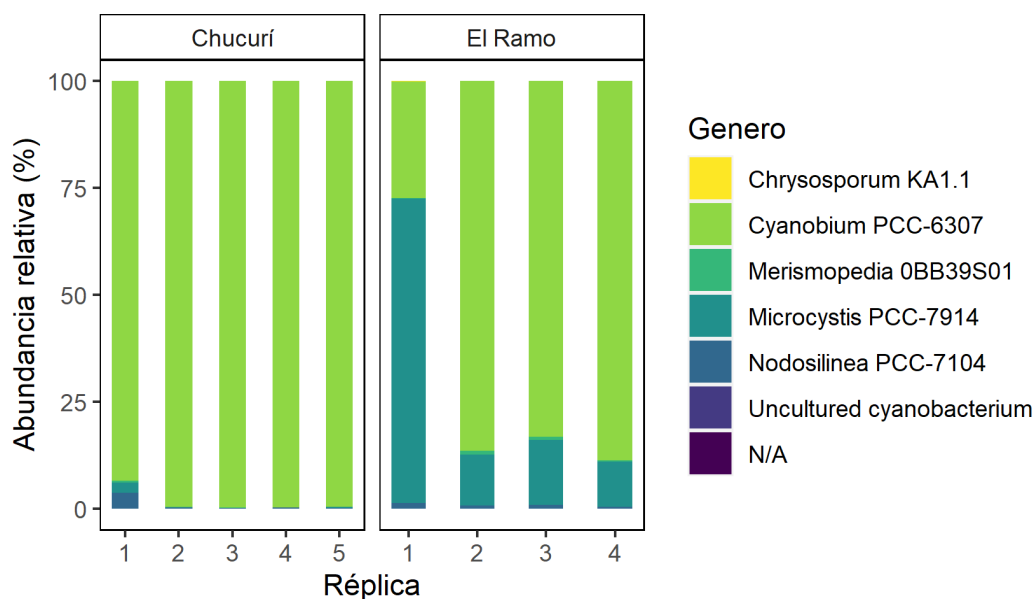


Figura 6.8: Barras de abundancia relativa de los géneros de Cianobacteria en las estaciones Chucurí y El Ramo, para cada réplica.

También se calculó la riqueza observada y el índice de Shannon específicamente del filo Cianobacteria (Figura 6.10). En la estación Chucurí el promedio de la riqueza observada y el índice de Shannon es de 25.60 ± 5.03 y 1.79 ± 0.20 , respectivamente; en la estación El Ramo es de 22.00 ± 3.16 y 1.69 ± 0.41 , respectivamente. Se aprecia que la riqueza observada es ligeramente menor en la estación El Ramo, en cambio, el índice de Shannon es similar en ambas estaciones. Se destaca el hecho de que, en El Ramo una de las réplicas presenta un resultado menor del índice de Shannon con respecto al resto del grupo, esta corresponde a la réplica 1. Dicho comportamiento coincide con lo que se había mencionado anteriormente, sobre la diferencia entre las réplicas asociadas al muestreo. Sin embargo, los resultados de la ANOVA no indican diferencias significativas entre las estaciones para la riqueza observada ($F(1, 7) = 1.54$, $p > 0.05$) ni para el índice de Shannon ($F(1, 7) = 0.21$, $p > 0.05$).

Beta-diversidad

Para visualizar el índice de Bray-Curtis de toda la comunidad microbiana se realizó un análisis de coordenadas principales (Figura 6.11). Se distinguen claramente dos grupos que corresponden a las estaciones de muestreo, cuya diferencia en el índice de Bray-curtis es significativa según los resultados del Adonis ($R^2 = 0.44$, $p = 0.005$). Adicionalmente, en el grupo de El Ramo se observó que la réplica 1 se encuentra distanciada del resto del cluster, lo que expone nuevamente las diferencias subyacentes entre las réplicas por su forma de recolección.

Aunque también se logró identificar dos grupos en el análisis de coordenadas principales sobre las distancias de Bray-Curtis dentro del filo Cianobacteria (Figura 6.12), la separación entre estos es

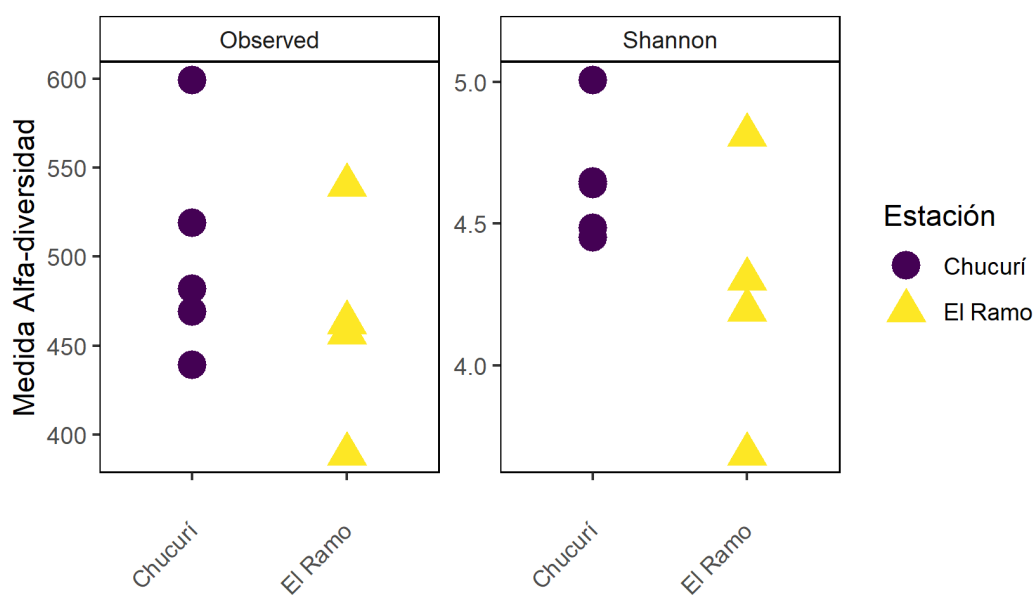


Figura 6.9: Riqueza observada e índice de Shannon de la comunidad microbiana para las estaciones Chucurí y El Ramo.

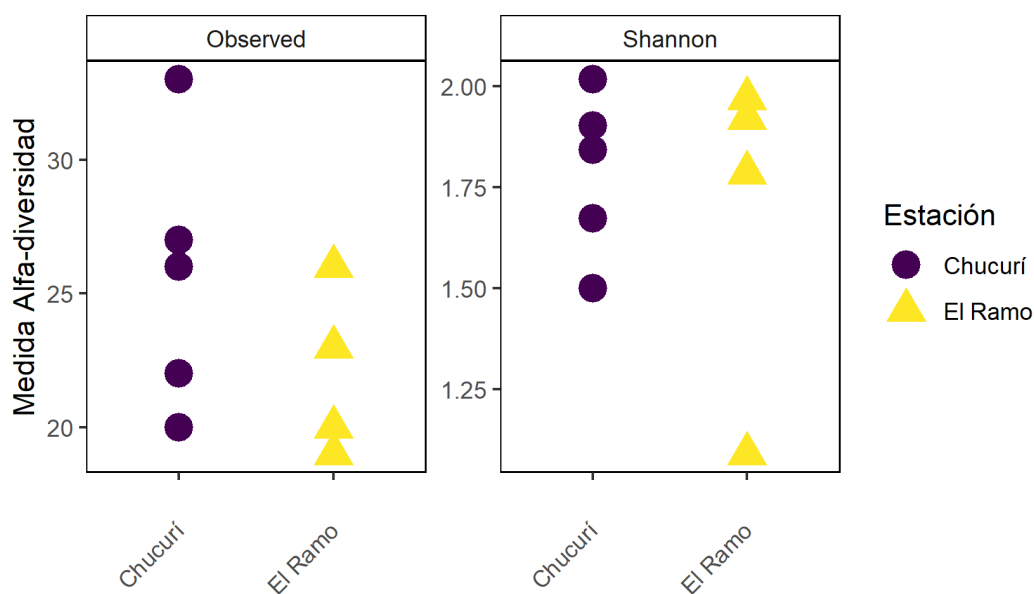


Figura 6.10: Riqueza observada e índice de Shannon del filo Cyanobacteria para las estaciones Chucurí y El Ramo.

menor comparado con el caso de toda la comunidad microbiana; de hecho, se superponen en el eje 1 la réplica 1 de Chucurí y la réplica 4 de El Ramo. Aun así, los resultados del Adonis indican que hay una diferencia significativa ($R^2 = 0.34$, $p = 0.015$) entre el índice de Bray-Curtis de las estaciones de muestreo. Para la estación El Ramo sigue apareciendo la réplica 1 distanciada del resto del grupo.

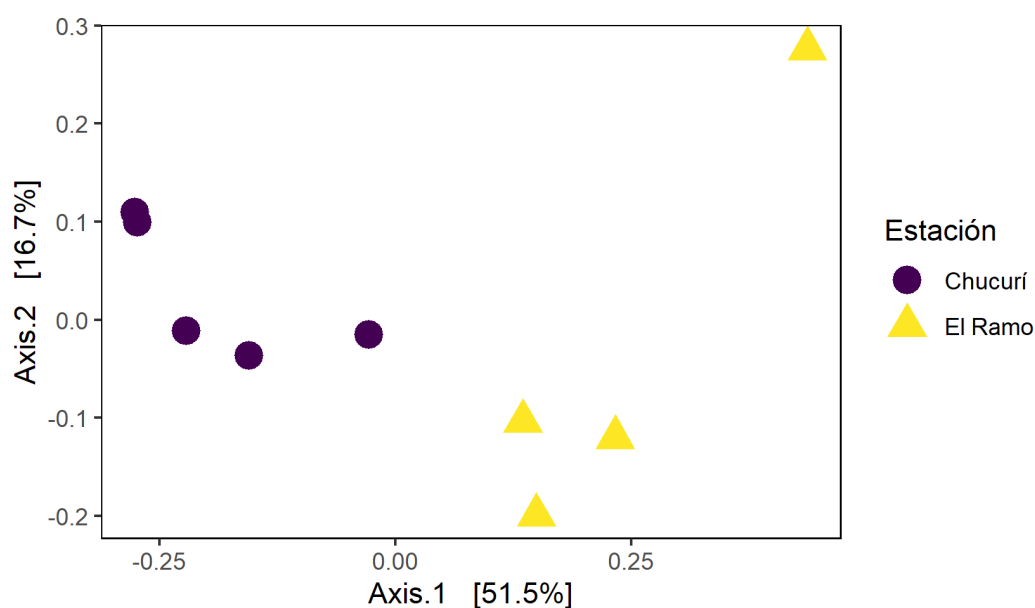


Figura 6.11: Análisis de coordenadas principales sobre las distancias Bray-curtis de la comunidad microbiana para las estaciones Chucurí y El Ramo.

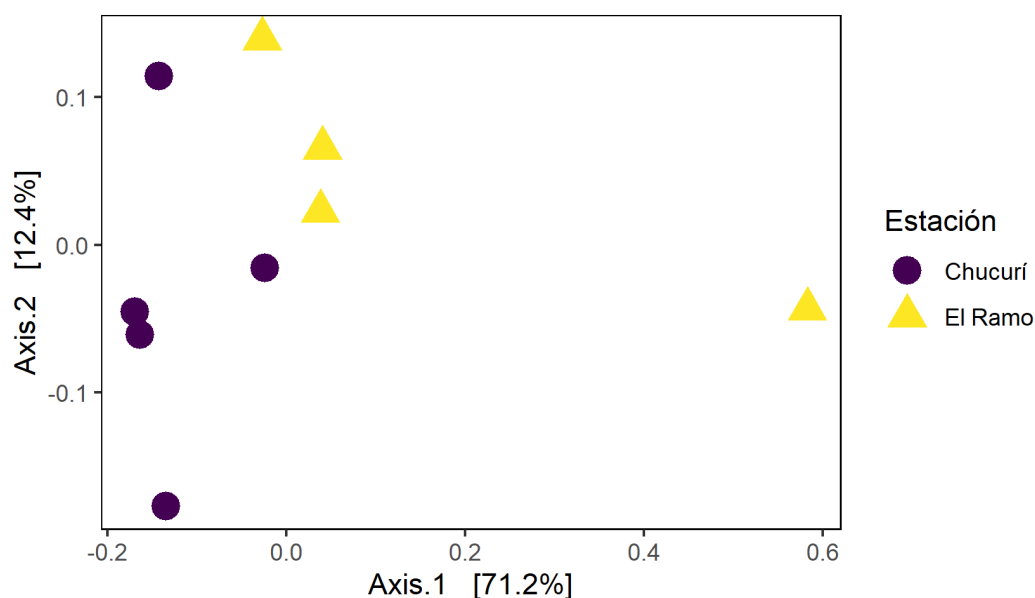


Figura 6.12: Análisis de coordenadas principales sobre las distancias Bray-curtis del filo Cyanobacteria para las estaciones Chucurí y El Ramo.

6.6.3. Análisis de abundancia diferencial

En la Figura 6.13 se muestran los resultados del análisis de abundancia diferencial para las estaciones objeto de estudio. Se encontró que hay un mayor número de ASVs con abundancia diferencial en la estación El Ramo (66) que en Chucurí (53), y estos pertenecían en su mayoría al filo Proteobacteria (59.09%), donde predominó la contribución de la clase Gammaproteobacteria. En la estación Chucurí también los ASVs con mayor abundancia diferencial forman parte del filo Pro-

teobacteria (81.13%), pero en este caso la participación más importante corresponde a la clase Alphaproteobacteria. Resalta el hecho de que en la estación Chucurí hubo ASVs con abundancia diferencial en las tres clases de Proteobacteria, mientras que en El Ramo solo hubo ASVs con abundancia diferencial en las clases Alphaproteobacteria y Gammaproteobacteria.

Entre los filos con menor número de ASVs con abundancia diferencial, se destacan Deinococcus-Thermus y Firmicutes, que se encontraron exclusivamente en la estación El Ramo; y los filos Actinobacteria y Planctomycetes que exhibieron abundancia diferencial solamente en la estación Chucurí. Tanto en El Ramo como en Chucurí hubo un único ASV con abundancia diferencial en el filo Cyanobacteria, dicho ASV corresponde al género *Microcystis PCC-7914* en el Ramo y a *Cyanobium PCC-6307* en Chucurí. Indicando que hay una diferencia significativa en la presencia del género *Microcystis PCC-7914* entre las estaciones.

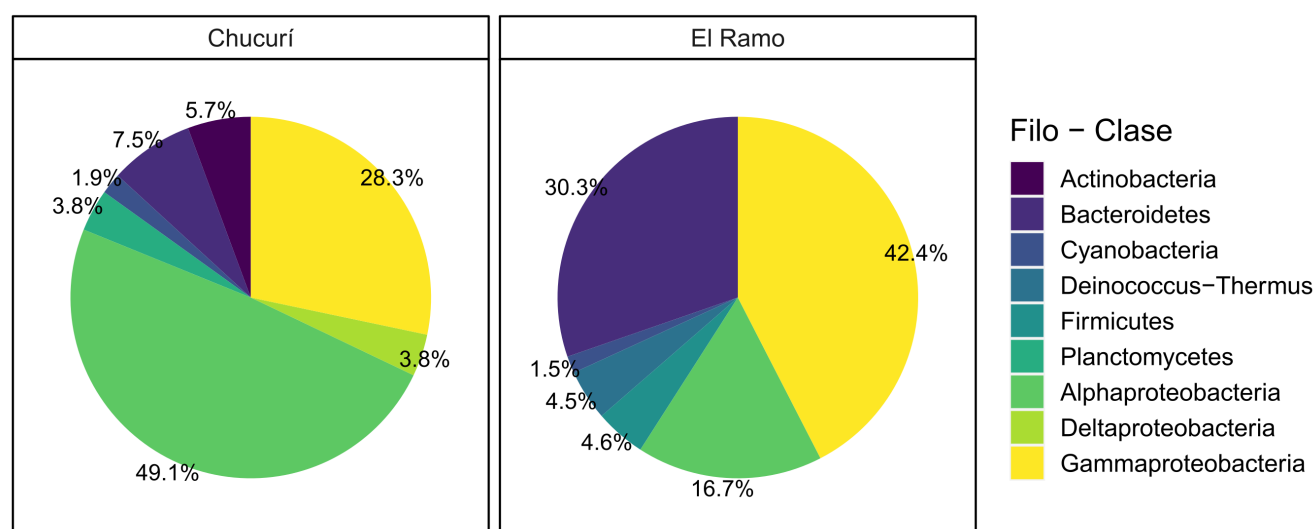


Figura 6.13: Géneros con abundancia diferencial entre las estaciones Chucurí y El Ramo. En el caso del filo Proteobacteria se muestra la clase en vez del género.

7. Discusión

7.1. Cianobacterias, cianotoxinas y variables ambientales

En zonas tropicales y subtropicales productivas, las condiciones ambientales que favorecen la dominancia de las cianobacterias tienden a ocurrir durante todo el año, e incluyen: aguas cálidas, una columna de agua estable, altas concentraciones de nutrientes limitantes para el crecimiento como nitrógeno y fósforo, y pH alto [12, 18]. Se ha reportado que la mayoría de cianobacterias alcanzan tasas máximas de crecimiento a temperaturas superiores a 25 °C [4, 8, 19, 24, 104]. También, se conoce que el pH alto favorece el crecimiento de cianobacterias porque pueden realizar la fotosíntesis cuando los niveles de dióxido de carbono disuelto son muy bajos [64]. Durante el tiempo de estudio la temperatura en el embalse estuvo en un rango entre 27.30 y 32.10 °C, y el pH entre 8.22 y 9.26, condiciones adecuadas para el crecimiento de las cianobacterias.

El aumento de la frecuencia y extensión de los blooms de cianobacterias en los sistemas acuáticos está estrechamente relacionado con las actividades humanas y el cambio climático [2], debido a que producen condiciones ambientales que promueven el crecimiento de estos organismos [12, 18, 58]. La construcción de presas en los ríos aumenta el tiempo de retención y reduce la mezcla de la columna de agua [11, 12]; en el caso del embalse Topocoro el tiempo de residencia es de 165 días, lo que puede clasificarse como un tiempo de residencia largo [105]. La contaminación antropogénica derivada de las actividades desarrolladas en las áreas de captación que rodean los lagos y las cuencas de los ríos que desembocan en los lagos, aceleran el enriquecimiento de nutrientes en el agua [12]. En el embalse Topocoro se encontraron mayores concentraciones de cianobacterias en la margen izquierda, por la zona donde ingresan las aguas del río Chucurí. La sub-cuenca del río Chucurí se encuentra en jurisdicción del municipio de San Vicente de Chucurí, que según el Censo Nacional de Población y Vivienda - CNPV [106] cuenta con una población ajustada total de 33133 habitantes. El municipio de San Vicente de Chucurí no cuenta con tratamiento previo al vertimiento de sus aguas residuales en fuentes hídricas de la zona [107]. Además, la economía del municipio se sustenta en el sector primario, basado históricamente en el sistema productivo del cacao y en menor proporción del café [108]. Por lo que se entiende que las actividades desarrolladas en el área de drenaje de este tributario podrían propiciar la presencia abundante de cianobacterias en esta zona del embalse.

En otros estudios se reportaron comportamientos similares a las de este trabajo, con respecto a

la dinámica espacial de la abundancia de cianobacterias en el agua. Por ejemplo en el lago Erie, se reportó que la mayor abundancia de los genes 16S rADN de cianobacterias se detectó en la desembocadura de uno de los tributarios del lago, el río Maumee [92]. Asimismo, en investigación realizada en embalses colombianos se encontró que la concentración de cianobacterias en copias de ADN/ μL mostró diferencias significativas para uno de los puntos de muestreo, asociado al hecho de que las condiciones fisicoquímicas del agua en dicho punto se vieron influenciadas por la mezcla con el agua que recibe del mayor tributario [35]. De forma similar, se identificó un desarrollo masivo de cianobacterias en la primera estación de muestreo ubicada en el ingreso de aguas del Río Nare al embalse El Peñol- Guatapé, estación que presentó altas concentraciones de nitrógeno y fósforo [29]. Además en el embalse tropical Kranji en Singapur, una de las tres estaciones monitoreadas mostró una variabilidad mayor en la población de *Microcystis* y *Anabaena* con respecto a las otras, posiblemente relacionado con que dicha estación se ubicaba en un brazo tributario mientras que las otras se encontraban en aguas “abiertas” [42]; semejante a lo que ocurrió en la estación Chucurí, que exhibió una variabilidad mayor en la abundancia de cianobacterias que el resto de las estaciones.

En el embalse Topocoro se encontró que las distintas formas de nitrógeno (nitrógeno total, amonio y nitratos) y el fósforo total estuvieron, en su mayoría, por debajo de los límites de cuantificación de los métodos. A pesar de que los blooms de cianobacterias están típicamente asociados con el enriquecimiento de nutrientes, su aparición se ha relacionado con varios factores, como la capacidad para almacenar fósforo y limitación de nitrógeno [58]. Las cianobacterias exhiben mecanismos de absorción y almacenamiento de nutrientes altamente eficientes [8], y algunas especies son capaces de utilizar dinitrógeno atmosférico (N_2) como fuente de nitrógeno para apoyar el crecimiento mediante fijación de N_2 [3, 8, 10]. De hecho, la expansión de algunos géneros de blooms perjudiciales de cianobacterias ha ocurrido incluso en algunos lagos que no han experimentado ningún aumento reciente en la carga de nutrientes (N y P), lo que indica que en ciertos casos el aumento de la temperatura puede desempeñar un papel independiente en la promoción de la expansión geográfica de algunos blooms perjudiciales de cianobacterias [8]. De forma similar, en Kosten et al. citado en Giani et al. [109], reportaron que temperaturas más altas pueden reducir el umbral de concentración de nutrientes necesario para el inicio de un bloom. Por lo que se explica que a bajas concentraciones de estos nutrientes se haya identificado la presencia de cianobacterias en todas las estaciones a las que se les realizó seguimiento en el embalse.

El ACP permitió identificar un patrón temporal que distancia las observaciones de las campañas de muestreo M2 y M4, ambas realizadas durante la época seca. En el M2 se obtuvieron valores altos de CE, COT, y COD, así como altas concentraciones de clorofila-a y cianobacterias, pero concentraciones bajas de OD. Sin embargo, no se encontró una relación significativa entre la concentración de cianobacterias y las demás variables ambientales, a excepción de la clorofila-a. Aunque las altas temperatura en la zona ecuatorial favorecen el crecimiento de las cianobacterias en el agua, esta variable mostró menor variabilidad en comparación con las demás (Tabla 6.1), por lo que probablemente no se observó una correlación significativa, tal y como lo reportaron Te and Gin [42]. Además, en el ACP no se incluyeron las variables relacionadas con la carga de nutrientes en el embalse, debido a que estas se hallaron con valores por debajo del límite de cuantificación de los métodos. En contraste, en otros cuerpos de agua como en Taihu (lago Tai) en China [60], lago Lo Galindo en Chile [38], o el embalse Kranji en Singapur [42], se identificó una relación positiva entre la abundancia de cianobacterias y los principales nutrientes (nitrógeno y fósforo). La correlación positiva entre la abundancia de cianobacterias y la clorofila-a, demuestran que este último

parámetro puede ser empleado como indicador de la biomasa en el embalse, siendo este un enfoque comúnmente usado para detectar y monitorear la presencia de blooms de cianobacterias [18]. Los fotopigmentos, así como la microscopía y los análisis fisicoquímicos, se utilizan para detectar y monitorear cianobacterias toxigénicas/no tóxicas y toxinas en muestras naturales [41]. Pero, debido a que la clorofila-a representa la biomasa de algas en general, es una herramienta de monitoreo de primer nivel y se necesitan pruebas adicionales para confirmar la presencia de cianobacterias [110].

Los resultados del análisis de las cianotoxinas en el embalse se encontraron por debajo del límite de cuantificación del método de $0.05 \mu\text{g/L}$, para todas las estaciones de muestreo en todas las campañas. Sin embargo, se detectó la presencia de tres variantes de MC, que son las toxinas de cianobacterias que se encuentran con mayor frecuencia y están más extendidas alrededor del mundo [2, 12, 18, 37, 71] y, la presencia de la toxina NOD, únicamente en la estación Tablazo durante el muestreo M4. Las MCs y las NODs, son hepatotoxinas que actúan mediante la inhibición de la proteína fosfatasa 1 y 2A, y son potenciales promotores de tumores [18, 69]. En Colombia, se reportó la presencia de MCs en tres embalses del oriente antioqueño monitoreados entre mayo de 2015 y octubre de 2016, las cianotoxinas encontradas con mayor frecuencia tanto en las muestras integradas de la zona fótica como en las muestras de agua superficial de los tres embalses fueron MC-LR, MC-YR, $[D - Asp^3, (E) - Dhb^7]$ -MC-RR y MC-LF [37].

En la estación Chucurí, que fue la estación con mayor concentración de cianobacterias en el embalse, no se reportó la presencia de cianotoxinas. Por el contrario, en la estación Mirabel que mostró el valor mínimo de cianobacterias, se detectó la presencia de dos variantes de MC en el M1. La biomasa de cianobacterias a menudo se correlaciona con los niveles de cianotoxinas, sin embargo, varios autores destacan que las toxinas no siempre pueden estar directamente relacionadas con la cantidad total de células cianobacterianas, y que se debe considerar la variación en la proporción entre genotipos tóxicos y no tóxicos [39]. Lo anterior teniendo en cuenta que no todas las cepas de cianobacterias son tóxicas, dado que las cianotoxinas son producidas solo por las cepas que tienen los genes apropiados; incluso las cepas tóxicas no producen automáticamente toxinas, ya que varias de ellas parecen tener la capacidad de activar o desactivar ciertos genes dependiendo de las condiciones ambientales [18]. Más aún, en un cuerpo de agua pueden coexistir las cepas tóxicas y no tóxicas [24, 111].

En el embalse no se excedió el valor guía establecido por la OMS para agua potable de $1.0 \mu\text{g/L}$ de MC-LR [14], ni el valor guía para el nivel de riesgo bajo de exposición en cuerpos de agua para uso recreativo ($< 10 \mu\text{g/L}$ de MC-LR equivalente) [27, 73]. A pesar de ello, es aconsejable seguir monitoreando las cianotoxinas en el cuerpo de agua debido a que fue posible detectar la presencia de estos compuestos en varias estaciones, así como la presencia de cianobacterias, teniendo en cuenta el potencial riesgo a su exposición con las actividades previstas en el Plan de Ordenamiento del Embalse [45]. De hecho, la OMS indica que es prudente suponer potencial tóxico en cualquier población de cianobacterias [71].

7.2. Comunidad bacteriana

Se realizó una caracterización de la comunidad bacteriana del embalse Topocoro en muestras recolectadas en las estaciones Chucurí y El Ramo en septiembre de 2019, con el propósito de identificar la presencia de cianobacterias potencialmente productoras de cianotoxinas. En estas dos estaciones se encontró la mayor concentración de cianobacterias en el embalse. Además, se contempla dentro del Plan de Ordenamiento, el funcionamiento de embarcaderos de transporte público y actividades recreativas; en Chucurí actividades como turismo de naturaleza y una zona de manejo especial para la pesca, mientras que El Ramo está incluida dentro de las zonas de recreación [45]. Estas actividades podrían ser eventuales vías de exposición a las cianotoxinas. El filo Proteobacteria fue el más abundante en ambas estaciones de muestreo seguido del filo Cyanobacteria, resultados consistentes con otros estudios donde se señala que la presencia de estos grupos es común en sistemas de agua dulce [83, 112, 113]. En el embalse durante este muestreo se presentaron condiciones de temperatura ($30.8 \pm 1.27^\circ\text{C}$) y pH (8.20 ± 0.15) adecuadas para el crecimiento de las cianobacterias [12, 18, 83]. Su abundancia se encontró en un rango entre $6.48(\pm 0.82) \times 10^6$ y $5.85(\pm 0.80) \times 10^7$ copias de Cyan 16S/ μL , con valores ligeramente menores en la estación El Ramo. Los resultados del análisis de las 4 cianotoxinas (MC-RR, MC-LR, MC-YR y NOD) evaluadas estuvieron por debajo del límite de cuantificación del método de $0.05 \mu\text{g/L}$ para ambas estaciones de muestreo, por lo que no se superó el valor guía establecido por la OMS para agua potable de $1.0 \mu\text{g/L}$ de MC-LR [14], ni el valor guía para el nivel de riesgo bajo de exposición en cuerpos de agua para uso recreativo ($< 10 \mu\text{g/L}$ de MC-LR equivalente) [27, 73]. De acuerdo a Pineda-Mendoza et al. [80], estos resultados indican una toxicidad potencial baja en el embalse en términos de riesgos para la salud humana y animal por exposición aguda.

A pesar de que no se detectó la presencia de cianotoxinas en el embalse, dentro del grupo Cyanobacteria se identificaron 4 géneros potencialmente tóxicos: *Chrysosporum KA1.1*, *Cyanobium PCC-6307*, *Merismopedia 0BB39S01*, y *Microcystis PCC-7914*. El género *Microcystis* está ampliamente documentado como productor de hepatotoxinas y neurotoxinas en ambientes de agua dulce [2, 13, 18, 19, 40, 68], y es conocido por su capacidad para producir la hepatotoxina microcistina [66]. Las microcistinas son potentes inhibidores de las proteínas fosfatasa, que causan daño hepático, promueven la actividad tumoral y suponen un daño grave para un amplio grupo de organismos del ecosistema [9]. Se han reportado proliferaciones de *Microcystis* en todos los continentes a excepción de Antártica [66], en cuerpos de agua de distintos tamaños distribuidos geográficamente desde regiones templadas-frías hasta los trópicos [114]. En otros trabajos realizados en Colombia se ha determinado la presencia del género *Microcystis*, como es el caso de los embalses Abreo - Malpaso, El Peñol - Guatapé y Playas en el oriente antioqueño [29], el embalse Riogrande II al norte de Antioquia [31], el antiguo delta del río Sinú en el departamento de Córdoba [30], y en la curva de Salguero del río Cesar, al nororiente del departamento del Cesar [32].

El género *Chrysosporum* ha sido identificado como uno de los productores de la toxina cilindrospermopsina [4, 7, 10, 103]. La cianobacteria *Chrysosporum ovalisporum* se encuentra en áreas tropicales, subtropicales y mediterráneas, es un mejor competidor a temperaturas superiores a los 30°C o incluso cercanas a los 35°C , y junto con *Cylindrospermopsis raciborskii*, se considera uno de los productores de Cilindrospermopsina más ampliamente distribuidos [22]. La toxina cilindrospermopsina es un alcaloide derivado de policétidos con efectos hepatotóxicos, nefrotóxicos y

citotóxicos generales [40], y es considerada una seria amenaza para los organismos que viven en nichos ecológicos similares a las cianobacterias y para las personas que utilizan reservorios acuáticos en los que se producen floraciones de algas nocivas [51]. De acuerdo con la revisión presentada por Munoz et al. [5] sobre cianobacterias y cianotoxinas en aguas dulces de países iberoamericanos, en Colombia no hay reportes de la presencia del género *Crysosporum*.

Los géneros *Microcystis* PCC-7914 y *Chrysosporum* KA1.1 no fueron los más abundantes dentro del filo Cyanobacteria, hecho que se asemeja con los resultados hallados en el embalse Rosarito (España) durante floración presentada en el 2013, donde la mayoría de las cianobacterias toxigénicas pertenecían a taxones de baja abundancia, entre ellas *Microcystis aeruginosa* [78]. En contraste, en estudio realizado en tres lagos urbanos de Ciudad de México se determinó que dentro del filo Cyanobacteria, *Microcystis* fue el género dominante en todos los lagos en las dos épocas del año evaluadas (seca y húmeda) [80]. Al igual que el caso del embalse San Juan en Madrid con floraciones periódicas de cianobacterias tóxicas, donde el análisis mostró la dominancia de dos OTU en todas las muestras de agua, las cuales fueron asignadas a *Microcystis* sp. [9]. Estos resultados demuestran la utilidad de emplear herramientas como NGS en el estudio de las comunidades bacterianas, y en la identificación de géneros de cianobacterias potencialmente tóxicos que no necesariamente destacan por su abundancia, como un insumo valioso para la gestión del recurso hídrico.

En el embalse se identificó la presencia de los géneros de cianobacterias picoplanctónicas *Cyanobium* y *Merismopedia*. Las picocianobacterias son un grupo de organismos comunes de los ecosistemas marinos y de agua dulce que han sido relacionados con la producción de toxinas [57]. Estas desempeñan un papel fundamental en la producción primaria y su dominio en la biomasa del fitoplancton es común tanto en aguas oligotróficas como eutróficas, a pesar de ello son raros los estudios del potencial de las picocianobacterias como productoras de compuestos bioactivos [102]. Mediante pruebas ELISA se identificaron seis aislados de cianobacterias productoras de microcistina provenientes de una laguna de estabilización de residuos en Cajati, Estado de São Paulo, entre ellas la cepa *Merismopedia* CENA 106 [115]. También, se determinó la producción de la neurotoxina β -N-metilamino-L-alanina (BMAA) mediante el método HPLC-FD en la cepa picocianobacteriana *Cyanobium* sp. LEGE 06068 aislada del estuario portugués Duero [116]. Recientemente en otro estudio realizado en Colombia en cuatro lagos recreativos urbanos y una quebrada en Bogotá, se reportó la presencia del género *Cyanobium* con abundancias relativas entre 1 y 6 % [83], mientras que en el embalse fue el género más abundante del grupo de las cianobacterias con una abundancia relativa promedio de 26.85 ± 8.32 % dentro de la comunidad. Lo anterior resalta la importancia de ampliar las investigaciones sobre el potencial de toxicidad de las picocianobacterias en los sistemas acuáticos colombianos.

Se ha reportado que muchas bacterias tienen diferentes tipos de interacción con las cianobacterias, como parasitismo, comensalismo y mutualismo [9]; y que existen otras interacciones ecológicas más crípticas entre cianobacterias y bacterias heterótrofas como, por ejemplo, la guerra química utilizando sustancias alelopáticas y competencia por nutrientes y oligoelementos [112]. En el ambiente natural de agua dulce, las cianobacterias siempre están asociadas con bacterias heterótrofas que se incrustan en su mucílago. Este hábitat, en el que se producen interacciones intensas entre cianobacterias y bacterias, se denomina “ficosfera” por analogía con la rizosfera de las plantas [117]. Los grupos Proteobacteria, Bacteroidetes y Actinobacteria se han asociado con floraciones de cia-

nobacterias, a pesar de las diferencias en las especies de fitoplancton, la geografía y el clima [113]. Algunas Proteobacterias como *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Aquimonas*, *Brevundimonas*, *Delfia*, *Hydrogenophaga*, *Porphyrobacter*, *Pseudomonas*, *Rhodobacter* y *Sphingomonas* parecen tener capacidades para degradar cianotoxinas y formar espumas de cianobacterias que podrían actuar como una especie de control biológico de las floraciones [80]. La mayoría de los géneros de Proteobacteria mencionados anteriormente fueron identificados en el embalse a excepción de *Aquimonas* y *Delfia*. En la revisión presentada por Kormas and Lymperopoulou [118] sobre la diversidad molecular de cepas bacterianas que poseen algún tipo de característica de degradación de cianotoxinas, se encuentran miembros del filo Actinobacteria y Firmicutes, y de la clase Alpha y Gammaproteobacteria entre las bacterias degradantes de microcistina aisladas; de los cuales algunos géneros también fueron identificados en el embalse, como es el caso de *Microbacterium*, *Bacillus*, *Sphingomonas*, *Sphingopyxis* y *Pseudomonas*. Lo anterior podría ser un indicio del motivo por el cual no se hallaron concentraciones mayores de cianotoxinas en el embalse, a pesar de la presencia de géneros potencialmente tóxicos. Sin embargo, son necesarios estudios adicionales como la cuantificación de genes asociados con la producción de cianotoxinas, el análisis de otros tipos de cianotoxinas o descartar la inhibición de la producción de toxinas por factores ambientales, para validar dicha hipótesis.

8. Conclusiones

En el presente estudio se evaluó la presencia de cianobacterias y cianotoxinas en el embalse tropical de agua dulce Topocoro. Se realizó seguimiento a la concentración de cianobacterias y cianotoxinas en el cuerpo de agua, así como a las variables ambientales, y se realizó un análisis de la composición de la comunidad bacteriana, empleando un enfoque multidisciplinario; mediante el uso de parámetros fisicoquímicos en combinación con la cromatografía líquida de alta eficiencia (UHPLC-QqQ-MS/MS), y técnicas moleculares (qPCR y NGS).

- Se evidenció la complejidad para establecer una relación entre las variables ambientales y la presencia de cianobacterias y cianotoxinas en los sistemas acuáticos. Como se ha reportado previamente, cada cuerpo de agua exhibe unas interacciones específicas entre los distintos factores que pueden determinar la presencia de estos organismos y la producción de sus metabolitos tóxicos. En el embalse Topocoro, en el tiempo donde hubo mayor abundancia de cianobacterias en el agua se presentaron altos valores de conductividad eléctrica, carbono orgánico total y disuelto, y clorofila-a, pero concentraciones bajas de oxígeno disuelto. Sin embargo, la correlación entre dichas variables y la concentración de cianobacterias no fue significativa.
- Se determinó la presencia de cianobacterias en el embalse en todas las estaciones monitoreadas durante todo el periodo de estudio. Se encontró que la mayor abundancia de cianobacterias ocurrió en la zona donde ingresa uno de los ríos tributarios al cuerpo de agua. Por lo tanto, la dinámica espacial de la presencia de cianobacterias en el embalse estuvo influenciada por las actividades humanas realizadas en el área de drenaje de uno de los tributarios al embalse. Lo que expone las actividades antropogénicas como uno de los factores que favorecen el aumento en la distribución y abundancia de las cianobacterias alrededor del mundo, en concordancia con lo reportado en la literatura. Además, con este hallazgo se manifiesta la necesidad de realizar seguimiento continuo a la carga de nutrientes que ingresan al embalse, como una medida de manejo para prevenir la aparición de blooms nocivos de cianobacterias.
- La concentración de las formas de nitrógeno y fósforo a las que se hizo seguimiento en el embalse se mantuvieron en su mayoría por debajo del límite de cuantificación de los métodos, resaltando el papel de la temperatura en la expansión geográfica de la presencia de cianobacterias en el agua, junto con la capacidad de estos microorganismos para absorber y almacenar nutrientes. Por lo que se deduce que, el aumento de la temperatura bajos los escenarios de cambio climático en Colombia, podrían jugar un papel importante en el aumento de la abundancia de cianobacterias no solo en el caso concreto del embalse Topocoro, sino en la

gran diversidad de ecosistemas acuáticos del país. Los anterior, considerando las adaptaciones eco-fisiológicas de las cianobacterias que les pueden conferir ventajas competitivas frente a otros miembros de la comunidad de fitoplancton, bajo las condiciones de un clima cambiante.

- Se detectó la presencia de las cianotoxinas MC-RR, MC-LR, MC-YR y NOD en al menos seis de las siete estaciones monitoreadas en las distintas campañas de muestreo. La concentración de dichas toxinas no excedió el valor guía establecido por la Organización Mundial de la Salud de 1.0 $\mu\text{g/L}$ de MC-LR, de lo que se concluye que es seguro realizar las actividades propuestas en el Plan de Ordenamiento del Embalse, en términos de exposición a las toxinas de cianobacterias por ingestión de agua. Sin embargo, es aconsejable seguir monitoreando el sistema teniendo en cuenta que existe un riesgo latente, ya que se ha identificado en este estudio la presencia de cianobacterias potencialmente tóxicas en el embalse.
- En este estudio se describió la composición de la comunidad bacteriana en el embalse Topoco mediante secuenciación de nueva generación, haciendo énfasis en el grupo de las cianobacterias. Aunque no se determinó la presencia de cianotoxinas en el agua, fue posible identificar cuatro géneros de cianobacterias potencialmente tóxicos, destacando la importancia de continuar el monitoreo de cianobacterias y cianotoxinas en el embalse e implementarlo en otros cuerpos de agua en distintas regiones del país, con el fin de ampliar la información que se tiene en este campo, considerando que su presencia se ha extendido gracias a fenómenos como el cambio climático. Adicionalmente, surge la necesidad de ampliar el uso técnicas moleculares como la secuenciación de nueva generación para evaluar la composición de las comunidades bacterianas, determinar los riesgos asociados a la presencia de cianobacterias potencialmente tóxicas en los ecosistemas acuáticos y determinar su relación con otros miembros de la comunidad, permitiendo la formulación y adopción de medidas de manejo apropiadas para la gestión del recurso hídrico.

9. Recomendaciones

Es importante dar continuidad al monitoreo de cianobacterias, cianotoxinas y parámetros fisicoquímicos en el embalse, teniendo en cuenta que se registraron condiciones adecuadas de temperatura y pH para el crecimiento de cianobacterias, y considerando los escenarios de cambio climático a los que se enfrenta el país, en el contexto de la variabilidad climática global que puede favorecer la proliferación de cianobacterias potencialmente tóxicas. Se recomienda dar prioridad al seguimiento de las características del agua en la zona de ingreso del Río Chucurí al embalse, dado que esta zona reportó la mayor abundancia de cianobacterias relacionado con actividades desarrolladas en la cuenca. Además, se sugiere emplear métodos analíticos con menor límite de cuantificación para observar el comportamiento de las variables ambientales con el paso del tiempo, y su influencia en la presencia de cianobacterias y la producción de cianotoxinas, sobretodo los parámetros referentes a la carga de nutrientes. Del mismo modo, es conveniente abordar el estudio de otros factores abióticos que pueden influenciar el proceso de floración de cianobacterias y la producción de toxinas, como el perfil de temperatura y nutrientes en la columna de agua, hidrodinámica del embalse, e incluso análisis de variables meteorológicas como precipitación y radiación solar.

Se recomienda realizar análisis para la identificación y cuantificación de genes involucrados en la producción de cianotoxinas empleando cebadores específicos para este fin, con el objeto de determinar la proporción de cianobacterias con potencial tóxico en el embalse. También, es necesario realizar análisis de otros tipos de cianotoxinas que no fueron evaluadas en este trabajo, ya que como resultado del estudio de la comunidad bacteriana se identificó la presencia de géneros con potencial de producción de toxinas como cilindrospermopsina y β -N-metilamino-L-alanina. Finalmente, se destaca la utilidad de emplear métodos moleculares como la secuenciación de nueva generación en la identificación de géneros potencialmente tóxicos, haciendo énfasis en las picocianobacterias y/o grupos que no destacan por su abundancia. De esta manera, se alienta a extender su implementación en otros puntos del embalse, e incluso en otros cuerpos de agua del país, lo que permitirá generar información para la formulación de medidas de manejo apropiadas para la gestión del recurso hídrico, en cuanto a los riesgos asociados con la toxicidad de las cianobacterias.

Referencias

- [1] J. R. Beaver, C. E. Tausz, K. C. Scotese, A. I. Pollard, and R. M. Mitchell, “Environmental factors influencing the quantitative distribution of microcystin and common potentially toxigenic cyanobacteria in U.S. lakes and reservoirs,” *Harmful Algae*, vol. 78, pp. 118–128, Sep. 2018. [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568988318301227>
- [2] F. M. Buratti, M. Manganelli, S. Vichi, M. Stefanelli, S. Scardala, E. Testai, and E. Funari, “Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation,” *Archives of Toxicology*, vol. 91, no. 3, pp. 1049–1130, Mar. 2017. [Online]. Available: <http://link.springer.com/10.1007/s00204-016-1913-6>
- [3] C. C. Carey, B. W. Ibelings, E. P. Hoffmann, D. P. Hamilton, and J. D. Brookes, “Eco-physiological adaptations that favour freshwater cyanobacteria in a changing climate,” *Water Research*, vol. 46, no. 5, pp. 1394–1407, Apr. 2012. [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135411007883>
- [4] J. Huisman, G. A. Codd, H. W. Paerl, B. W. Ibelings, J. M. H. Verspagen, and P. M. Visser, “Cyanobacterial blooms,” *Nature Reviews Microbiology*, vol. 16, no. 8, pp. 471–483, Aug. 2018, number: 8 Publisher: Nature Publishing Group. [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/s41579-018-0040-1>
- [5] M. Munoz, S. Cirés, Z. M. de Pedro, J. A. Colina, Y. Velásquez-Figueroa, J. Carmona-Jiménez, A. Caro-Borrero, A. Salazar, M.-C. Santa María Fuster, D. Contreras, E. Perona, A. Quesada, and J. A. Casas, “Overview of toxic cyanobacteria and cyanotoxins in Ibero-American freshwaters: Challenges for risk management and opportunities for removal by advanced technologies,” *Science of The Total Environment*, vol. 761, p. 143197, Mar. 2021. [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969720367280>
- [6] J. M. O’Neil, T. W. Davis, M. A. Burford, and C. J. Gobler, “The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change,” *Harmful Algae*, vol. 14, pp. 313–334, Feb. 2012. [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568988311001557>
- [7] Z. Svirčev, D. Lalić, G. Bojadžija Savić, N. Tokodi, D. Drobac Backović, L. Chen, J. Meriluoto, and G. A. Codd, “Global geographical and historical overview of cyanotoxin

- distribution and cyanobacterial poisonings,” *Archives of Toxicology*, vol. 93, no. 9, pp. 2429–2481, Sep. 2019. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02524-4>
- [8] H. W. Paerl and V. J. Paul, “Climate change: Links to global expansion of harmful cyanobacteria,” *Water Research*, vol. 46, no. 5, pp. 1349–1363, Apr. 2012. [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135411004386>
- [9] M. A. Lezcano, D. Velázquez, A. Quesada, and R. El-Shehawy, “Diversity and temporal shifts of the bacterial community associated with a toxic cyanobacterial bloom: An interplay between microcystin producers and degraders,” *Water Research*, vol. 125, pp. 52–61, Nov. 2017. [Online]. Available: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135417306875>
- [10] S. Salomón, C. A. Rivera-Rondón, and A. M. Zapata, “Floraciones de cianobacterias en Colombia: estado del conocimiento y necesidades de investigación ante el cambio global,” *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, vol. 44, no. 171, pp. 376–391, Jun. 2020. [Online]. Available: <https://raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1050>
- [11] H. W. Paerl and J. Huisman, “Blooms Like It Hot,” *Science*, vol. 320, no. 5872, pp. 57–58, Apr. 2008. [Online]. Available: <https://science.sciencemag.org/content/320/5872/57>
- [12] H. Chen, J. M. Burke, and E. E. Prepas, “Cyanobacterial Toxins in Fresh Waters,” in *Encyclopedia of Environmental Health*. Burlington: Elsevier, 2011, pp. 860–871. [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444522726003330>
- [13] US EPA, “Cyanobacteria and Cyanotoxins: Information for Drinking Water Systems Fact Sheet,” 2014. [Online]. Available: <https://www.epa.gov/nutrient-policy-data/cyanobacteria-and-cyanotoxins-information-drinking-water-systems-fact-sheet>
- [14] World Health Organization, *Guidelines for drinking-water quality.*, 4th ed., 2017, oCLC: 975491910.
- [15] J. M. Loaiza, M. C. León Salazar, A. Rubio-Clemente, D. C. Rodríguez Loaiza, and G. A. Peñuela Mesa, “Efficiency of the removal of microcystin-LR by UV-radiation and hydrogen peroxide,” *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*, no. 95, pp. 9–19, 2020. [Online]. Available: <https://revistas.udea.edu.co/index.php/ingenieria/article/view/335840>
- [16] A. Sulis, P. Buscarinu, O. Soru, and G. M. Sechi, “Trophic state and toxic cyanobacteria density in optimization modeling of multi-reservoir water resource systems,” *Toxins*, vol. 6, no. 4, pp. 1366–1384, Apr. 2014.
- [17] Y. Liu, W. Chen, D. Li, Z. Huang, Y. Shen, and Y. Liu, “Cyanobacteria-/cyanotoxin-contaminations and eutrophication status before Wuxi Drinking Water Crisis in Lake Taihu, China,” *Journal of Environmental Sciences*, vol. 23, no. 4, pp. 575–581, Apr. 2011. [Online]. Available: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1001074210604500>
- [18] S. Merel, D. Walker, R. Chicana, S. Snyder, E. Baurès, and O. Thomas, “State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins,” *Environment International*, vol. 59, pp. 303–327, Sep. 2013. [Online]. Available: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0160412013001311>

-
- [19] H. W. Paerl and T. G. Otten, “Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences, and Controls,” *Microbial Ecology*, vol. 65, no. 4, pp. 995–1010, May 2013. [Online]. Available: <http://link.springer.com/10.1007/s00248-012-0159-y>
- [20] R. P. Rastogi, D. Madamwar, and A. Incharoensakdi, “Bloom Dynamics of Cyanobacteria and Their Toxins: Environmental Health Impacts and Mitigation Strategies,” *Frontiers in Microbiology*, vol. 6, Nov. 2015. [Online]. Available: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2015.01254/abstract>
- [21] S.-K. Zervou, C. Christophoridis, T. Kaloudis, T. M. Triantis, and A. Hiskia, “New SPE-LC-MS/MS method for simultaneous determination of multi-class cyanobacterial and algal toxins,” *Journal of Hazardous Materials*, vol. 323, pp. 56–66, Feb. 2017. [Online]. Available: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304389416306410>
- [22] S. Cirés and A. Ballot, “A review of the phylogeny, ecology and toxin production of bloom-forming *Aphanizomenon* spp. and related species within the Nostocales (cyanobacteria),” *Harmful Algae*, vol. 54, pp. 21–43, Apr. 2016. [Online]. Available: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568988315301086>
- [23] US EPA, “Chemical Contaminants - CCL 4 | Drinking Water Contaminant Candidate List (CCL) and Regulatory Determination,” 2016. [Online]. Available: <https://www.epa.gov/ccl/chemical-contaminants-ccl-4>
- [24] I. Chorus and J. Bartram, Eds., *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring, and management*. London; New York: E & FN Spon, 1999.
- [25] R. Wood, “Acute animal and human poisonings from cyanotoxin exposure — A review of the literature,” *Environment International*, vol. 91, pp. 276–282, May 2016. [Online]. Available: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0160412016300642>
- [26] J. P. Berry, M. Gantar, M. H. Perez, G. Berry, and F. G. Noriega, “Cyanobacterial toxins as allelochemicals with potential applications as algacides, herbicides and insecticides,” *Marine Drugs*, vol. 6, no. 2, pp. 117–146, May 2008.
- [27] US EPA, “Health Effects Support Document for the Cyanobacterial Toxin Microcystins,” p. 138, 2015.
- [28] F. A. Dörr, E. Pinto, R. M. Soares, and S. M. Feliciano de Oliveira e Azevedo, “Microcystins in South American aquatic ecosystems: Occurrence, toxicity and toxicological assays,” *Toxicon*, vol. 56, no. 7, pp. 1247–1256, Dec. 2010. [Online]. Available: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010110001376>
- [29] K. P. Gómez, E. H. Atilano, G. P. Mesa, N. A. Ramírez, and F. V. Macías, “Características morfológicas de las cianobacterias y fitoplancton dominante en tres embalses de Antioquia: un enfoque basado en la forma y el biovolumen,” *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, vol. 22, no. 2, Oct. 2019, number: 2. [Online]. Available: <https://revistas.udca.edu.co/index.php/ruadc/article/view/1306>
- [30] M. Mogollón, M. P. Aycardi, J. Galeano, J. Villalobos, and C. Arango, “Variación espacio-temporal de las cianoprocariotas del antiguo delta del río Sinú, Córdoba, Colombia,”
-

- Intropica*, vol. 9, pp. 92–101, 2014. [Online]. Available: <http://revistas.unimagdalena.edu.co/index.php/intropica/article/view/1436>
- [31] H. M. Palacio, J. J. Ramírez, R. O. Echenique, J. A. Palacio, and C. L. Sant’anna, “Floristic composition of cyanobacteria in a neotropical, eutrophic reservoir,” *Brazilian Journal of Botany*, vol. 38, no. 4, pp. 865–876, Dec. 2015. [Online]. Available: <http://link.springer.com/10.1007/s40415-015-0185-3>
- [32] M. Rivera González and L. Gómez Gómez, “Identificación de cianobacterias potencialmente productoras de cianotoxinas en la curva de salguero del río Cesar,” *Revista Luna Azul*, no. 31, 2010. [Online]. Available: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=321727233003>
- [33] C. M. Arboleda, “Determinación del potencial tóxico de cianobacterias nostocales y chroococcales en la columna de agua del embalse Riogrande II (Antioquia) a través de la detección del gen *mcy*,” Maestría, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, 2017. [Online]. Available: <http://opac.udea.edu.co/cgi-olimp/?infile=details.glu&lolid=1472065&rs=13487229&hitno=2>
- [34] J. C. Hurtado-Alarcón and J. Polanía-Vorenberg, “Técnicas moleculares para la detección de cianobacterias en los embalses Riogrande II y La Fe, Colombia,” *Revista de Biología Tropical*, vol. 62, no. 1, pp. 381–398, Mar. 2014. [Online]. Available: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0034-77442014000200029&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- [35] L. M. Múnera, “Identificación y cuantificación de cianobacterias planctónicas en los embalses Abreo Malpaso, Peñol-Guatapé y Playas del oriente antioqueño empleando técnicas moleculares,” Maestría, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, 2017.
- [36] M. Sepúlveda, “Cianobacterias nostocales y chroococcales con potencial tóxico en la interfase agua-sedimentos del embalse Riogrande II, Antioquia,” Maestría, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, 2018. [Online]. Available: <http://opac.udea.edu.co/cgi-olimp/?infile=details.glu&lolid=1494329&rs=13487225&hitno=2>
- [37] C. León and G. A. Peñuela, “Detected cyanotoxins by UHPLC MS/MS technique in tropical reservoirs of northeastern Colombia,” *Toxicon*, vol. 167, pp. 38–48, Sep. 2019. [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010119301837>
- [38] V. Almanza, O. Parra, C. E. De M. Bicudo, C. Baeza, J. Beltran, R. Figueroa, and R. Urrutia, “Occurrence of toxic blooms of *Microcystis aeruginosa* in a central Chilean (36° Lat. S) urban lake,” *Revista Chilena de Historia Natural*, vol. 89, no. 1, Dec. 2016. [Online]. Available: http://documentacion.ideam.gov.co/openbiblio/bvirtual/022964/documento_nacional_departamental.pdf
- [39] D. Filatova, M. Picardo, O. Núñez, and M. Farré, “Analysis, levels and seasonal variation of cyanotoxins in freshwater ecosystems,” *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, vol. 26, p. e00091, Jun. 2020. [Online]. Available: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214158820300192>
- [40] L. A. Pearson, E. Dittmann, R. Mazmouz, S. E. Ongley, P. M. D’Agostino, and B. A. Neilan, “The genetics, biosynthesis and regulation of toxic specialized metabolites of cyanobacteria,” *Harmful Algae*, vol. 54, pp. 98–111, Apr. 2016. [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568988315301517>

-
- [41] A. Srivastava, S. Singh, C.-Y. Ahn, H.-M. Oh, and R. K. Asthana, "Monitoring Approaches for a Toxic Cyanobacterial Bloom," *Environmental Science & Technology*, vol. 47, no. 16, pp. 8999–9013, Aug. 2013, publisher: American Chemical Society. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1021/es401245k>
- [42] S. H. Te and K. Y.-H. Gin, "The dynamics of cyanobacteria and microcystin production in a tropical reservoir of Singapore," *Harmful Algae*, vol. 10, no. 3, pp. 319–329, Mar. 2011. [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568988310001265>
- [43] IDEAM, PNUD, MADS, DNP, and CANCELLERÍA, *Nuevos Escenarios de Cambio Climático para Colombia 2011-2100 Herramientas Científicas para la Toma de Decisiones – Enfoque Nacional – Departamental: Tercera Comunicación Nacional de Cambio Climático*, primera edición ed., Bogotá, Colombia, Mar. 2015. [Online]. Available: http://documentacion.ideam.gov.co/openbiblio/bvirtual/022964/documento_nacional_departamental.pdf
- [44] X. He, Y.-L. Liu, A. Conklin, J. Westrick, L. K. Weavers, D. D. Dionysiou, J. J. Lenhart, P. J. Mouser, D. Szlag, and H. W. Walker, "Toxic cyanobacteria and drinking water: Impacts, detection, and treatment," *Harmful Algae*, vol. 54, pp. 174–193, Apr. 2016. [Online]. Available: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568988316300038>
- [45] Fundación Humedales, "Plan de Ordenamiento de usos alternativos a la generación de energía en el embalse Topocoro - Central Hidroeléctrica Sogamoso -," Oct. 2015. [Online]. Available: <https://www.isagen.com.co/documentos/2016/resumen-ejecutivo-POE-sogamoso.pdf>
- [46] J. Wang, X. Pang, F. Ge, and Z. Ma, "An ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determination of microcystins occurrence in surface water in Zhejiang Province, China," *Toxicon*, vol. 49, no. 8, pp. 1120–1128, Jun. 2007. [Online]. Available: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004101010700058X>
- [47] S. A. Oehrle, B. Southwell, and J. Westrick, "Detection of various freshwater cyanobacterial toxins using ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry," *Toxicon*, vol. 55, no. 5, pp. 965–972, May 2010. [Online]. Available: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010109004759>
- [48] T. Nada, D. Damjana, S. Zorica, and L. Dragana, "Cyanotoxins in Serbia and Water Treatment Procedures for their Elimination," *Geographica Pannonica*, vol. 16, no. 4, pp. 155–163, 2012. [Online]. Available: http://www.dgt.uns.ac.rs/pannonica/papers/volume16_4_4.pdf
- [49] J. R. Fonseca, P. C. S. Vieira, P. Kujbida, and I. A. S. d. Costa, "Cyanobacterial occurrence and detection of microcystins and saxitoxins in reservoirs of the Brazilian semi-arid," *Acta Limnologica Brasiliensia*, vol. 27, no. 1, pp. 78–92, Mar. 2015. [Online]. Available: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2179-975X2015000100008&lng=en&nrm=iso&tlng=en
- [50] A. Martins and V. Vasconcelos, "Use of qPCR for the study of hepatotoxic cyanobacteria population dynamics," *Archives of Microbiology*, vol. 193, no. 9, pp. 615–627, Sep. 2011. [Online]. Available: <http://link.springer.com/10.1007/s00203-011-0724-7>
-

-
- [51] M. Adamskia, K. Wołowski, A. Kaminskib, and A. Hindákovác, “Cyanotoxin cylindrospermopsin producers and the catalytic decomposition process: A review.” *Harmful Algae*, vol. 98, p. 101894, Sep. 2020, publisher: Elsevier. [Online]. Available: <https://aplicacionesbiblioteca.udea.edu.co:2062/science/article/pii/S1568988320301736>
- [52] US EPA, “Drinking Water Health Advisory for the Cyanobacterial Microcystin Toxins,” p. 75, 2015.
- [53] B. C. Hitzfeld, S. J. Höger, and D. R. Dietrich, “Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment, and human risk assessment,” *Environmental health perspectives*, vol. 108, no. Suppl 1, p. 113, 2000.
- [54] G. Kaur, “Freshwater Cyanotoxins,” in *Biomarkers in Toxicology*. Elsevier, 2019, pp. 601–613. [Online]. Available: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128146552000359>
- [55] L. Li, R. Jia, Y. Liu, and H. Zhang, “Detection of Microcystin-Producing Cyanobacteria in a Reservoir by Whole Cell Quantitative PCR,” *Procedia Environmental Sciences*, vol. 10, pp. 2272–2279, 2011. [Online]. Available: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878029611005500>
- [56] A. Bukowska, A. Bielczyńska, A. Karnkowska, R. J. Chróst, and I. Jasser, “Molecular (PCR-DGGE) versus morphological approach: analysis of taxonomic composition of potentially toxic cyanobacteria in freshwater lakes,” *Aquatic biosystems*, vol. 10, no. 1, p. 2, 2014.
- [57] N. Jakubowska and E. Szelaǵ-Wasielewska, “Toxic Picoplanktonic Cyanobacteria—Review,” *Marine Drugs*, vol. 13, no. 3, pp. 1497–1518, Mar. 2015. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4377996/>
- [58] T. Dalu and R. J. Wasserman, “Cyanobacteria dynamics in a small tropical reservoir: Understanding spatio-temporal variability and influence of environmental variables,” *Science of The Total Environment*, vol. 643, pp. 835–841, Dec. 2018. [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969718323325>
- [59] M. A. Mariani, B. M. Padedda, J. Kaštovský, P. Buscarinu, N. Sechi, T. Virdis, and A. Lugliè, “Effects of trophic status on microcystin production and the dominance of cyanobacteria in the phytoplankton assemblage of Mediterranean reservoirs,” *Scientific Reports*, vol. 5, p. 17964, Dec. 2015. [Online]. Available: <http://www.nature.com/articles/srep17964>
- [60] S. W. Wilhelm, S. E. Farnsley, G. R. LeCleur, A. C. Layton, M. F. Satchwell, J. M. DeBruyn, G. L. Boyer, G. Zhu, and H. W. Paerl, “The relationships between nutrients, cyanobacterial toxins and the microbial community in Taihu (Lake Tai), China,” *Harmful Algae*, vol. 10, no. 2, pp. 207–215, Jan. 2011. [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568988310001150>
- [61] N. Fortin, V. Munoz-Ramos, D. Bird, B. Lévesque, L. G. Whyte, and C. W. Greer, “Toxic Cyanobacterial Bloom Triggers in Missisquoi Bay, Lake Champlain, as Determined by Next-Generation Sequencing and Quantitative PCR,” *Life*, vol. 5, no. 2, pp. 1346–1380, Jun. 2015, number: 2 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute. [Online]. Available: <https://www.mdpi.com/2075-1729/5/2/1346>
-

-
- [62] J. Heisler, P. Glibert, J. Burkholder, D. Anderson, W. Cochlan, W. Dennison, Q. Dortch, C. Gobler, C. Heil, E. Humphries, A. Lewitus, R. Magnien, H. Marshall, K. Sellner, D. Stockwell, D. Stoecker, and M. Suddleson, “Eutrophication and harmful algal blooms: A scientific consensus,” *Harmful Algae*, vol. 8, no. 1, pp. 3–13, Dec. 2008. [Online]. Available: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568988308001066>
- [63] S. Merel, M. C. Villarín, K. Chung, and S. Snyder, “Spatial and thematic distribution of research on cyanotoxins,” *Toxicon*, vol. 76, pp. 118–131, Dec. 2013. [Online]. Available: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010113003589>
- [64] US EPA, “Recommended Human Health Recreational Ambient Water Quality Criteria or Swimming Advisories for Microcystins and Cylindrospermopsin,” 2019. [Online]. Available: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2019-05/documents/hh-rec-criteria-habs-document-2019.pdf>
- [65] J. A. Westrick, D. C. Szlag, B. J. Southwell, and J. Sinclair, “A review of cyanobacteria and cyanotoxins removal/inactivation in drinking water treatment,” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 397, no. 5, pp. 1705–1714, Jul. 2010. [Online]. Available: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-010-3709-5>
- [66] M. J. Harke, M. M. Steffen, C. J. Gobler, T. G. Otten, S. W. Wilhelm, S. A. Wood, and H. W. Paerl, “A review of the global ecology, genomics, and biogeography of the toxic cyanobacterium, *Microcystis* spp.” *Harmful Algae*, vol. 54, pp. 4–20, Apr. 2016. [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568988315301773>
- [67] M. Jaramillo and K. E. O’Shea, “Analytical methods for assessment of cyanotoxin contamination in drinking water sources,” *Current Opinion in Environmental Science & Health*, vol. 7, pp. 45–51, Feb. 2019. [Online]. Available: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S246858441830076X>
- [68] J. Metcalf and N. Souza, “Cyanobacteria and Their Toxins,” in *Separation Science and Technology*. Elsevier, 2019, vol. 11, pp. 125–148. [Online]. Available: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128157305000065>
- [69] J. Al-Tebrineh, M. Gehringer, R. Akcaalan, and B. Neilan, “A new quantitative PCR assay for the detection of hepatotoxigenic cyanobacteria,” *Toxicon*, vol. 57, no. 4, pp. 546–554, Mar. 2011. [Online]. Available: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010110004496>
- [70] L. J. Beversdorf, S. D. Chaston, T. R. Miller, and K. D. McMahon, “Microcystin mcyA and mcyE Gene Abundances Are Not Appropriate Indicators of Microcystin Concentrations in Lakes,” *PLOS ONE*, vol. 10, no. 5, p. e0125353, May 2015, publisher: Public Library of Science. [Online]. Available: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0125353>
- [71] World Health Organization, “Cyanobacterial toxins: Microcystin-LR in Drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality.” 2003. [Online]. Available: https://www.who.int/water_sanitation_health/water-quality/guidelines/chemicals/cyanobactoxins.pdf?ua=1
-

-
- [72] M. C. Nielsen and S. C. Jiang, “Can cyanotoxins penetrate human skin during water recreation to cause negative health effects?” *Harmful Algae*, vol. 98, p. 101872, Sep. 2020. [Online]. Available: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568988320301517>
- [73] World Health Organization, *Guidelines for safe recreational water environments. Volume 1, Coastal and fresh waters.*, 2003, vol. 1. [Online]. Available: http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/srwe1/en/
- [74] K. Furukawa, N. Noda, S. Tsuneda, T. Saito, T. Itayama, and Y. Inamori, “Highly sensitive real-time PCR assay for quantification of toxic cyanobacteria based on microcystin synthetase a gene,” *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 102, no. 2, pp. 90–96, Aug. 2006. [Online]. Available: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S138917230670634X>
- [75] W. Zhang, I. Lou, W. K. Ung, Y. Kong, and K. M. Mok, “Application of PCR and real-time PCR for monitoring cyanobacteria, *Microcystis* spp. and *Cylindrospermopsis raciborskii* in Macau freshwater reservoir,” *Frontiers of Earth Science*, vol. 8, no. 2, pp. 291–301, 2013. [Online]. Available: <http://link.springer.com/10.1007/s11707-013-0409-4>
- [76] J. Kim, J. Lim, and C. Lee, “Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: Applications and considerations,” *Biotechnology Advances*, vol. 31, no. 8, pp. 1358–1373, Dec. 2013. [Online]. Available: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975013000918>
- [77] T. Zhang and H. H. P. Fang, “Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 70, no. 3, pp. 281–289, Apr. 2006.
- [78] M. C. Casero, D. Velázquez, M. Medina-Cobo, A. Quesada, and S. Cirés, “Unmasking the identity of toxigenic cyanobacteria driving a multi-toxin bloom by high-throughput sequencing of cyanotoxins genes and 16S rRNA metabarcoding,” *Science of The Total Environment*, vol. 665, pp. 367–378, May 2019. [Online]. Available: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969719305649>
- [79] A. P. Semedo-Aguiar, J. B. Pereira-Leal, and R. B. Leite, “Microbial Diversity and Toxin Risk in Tropical Freshwater Reservoirs of Cape Verde,” *Toxins*, vol. 10, no. 5, p. 186, May 2018, number: 5 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute. [Online]. Available: <https://www.mdpi.com/2072-6651/10/5/186>
- [80] R. M. Pineda-Mendoza, C. I. Briones-Roblero, R. Gonzalez-Escobedo, F. N. Rivera-Orduña, F. Martínez-Jerónimo, and G. Zúñiga, “Seasonal changes in the bacterial community structure of three eutrophicated urban lakes in Mexico city, with emphasis on *Microcystis* spp.” *Toxicon*, vol. 179, pp. 8–20, May 2020. [Online]. Available: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010120300647>
- [81] J. G. Jankowiak and C. J. Gobler, “The Composition and Function of Microbiomes Within *Microcystis* Colonies Are Significantly Different Than Native Bacterial Assemblages in Two North American Lakes,” *Frontiers in Microbiology*, vol. 11, May 2020. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7270213/>
-

-
- [82] C. Staley, T. Unno, T. J. Gould, B. Jarvis, J. Phillips, J. B. Cotner, and M. J. Sadowsky, “Application of Illumina next-generation sequencing to characterize the bacterial community of the Upper Mississippi River,” *Journal of Applied Microbiology*, vol. 115, no. 5, pp. 1147–1158, 2013, eprint: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/jam.12323>. [Online]. Available: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jam.12323>
- [83] L. Vega, J. Jaimes, D. Morales, D. Martínez, L. Cruz-Saavedra, M. Muñoz, and J. D. Ramírez, “Microbial Communities’ Characterization in Urban Recreational Surface Waters Using Next Generation Sequencing,” *Microbial Ecology*, vol. 81, no. 4, pp. 847–863, May 2021. [Online]. Available: <https://link.springer.com/10.1007/s00248-020-01649-9>
- [84] W. Xu, Q. Chen, T. Zhang, Z. Cai, X. Jia, Q. Xie, and Y. Ren, “Development and application of ultra performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem triple quadrupole mass spectrometry for determination of seven microcystins in water samples,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 626, no. 1, pp. 28–36, Sep. 2008. [Online]. Available: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267008013494>
- [85] A. B. F. Pacheco, I. A. Guedes, and S. M. F. O. Azevedo, “Is qPCR a Reliable Indicator of Cyanotoxin Risk in Freshwater?” *Toxins*, vol. 8, no. 6, p. 172, Jun. 2016, number: 6 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute. [Online]. Available: <https://www.mdpi.com/2072-6651/8/6/172>
- [86] ISAGEN S.A. E.S.P., “Central Hidroeléctrica Sogamoso. Balance de resultados durante la construcción 2009-2014.” 2015.
- [87] I. N. Gómez, “Emisión de gases de efecto invernadero en Hidrosogamoso a partir de la materia orgánica de los tributarios,” Doctorado, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, 2018.
- [88] ISAGEN S.A.E.S.P. and INGETEC S.A., “Actualización de diseños para la licitación y el estudio de impacto ambiental del Proyecto Hidroeléctrico Sogamoso. Capítulo 3. Caracterización del área de influencia,” 2008.
- [89] E. W. Rice, R. B. Baird, and A. D. Eaton, Eds., *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 23rd ed. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 2017. [Online]. Available: <https://www.standardmethods.org/>
- [90] R. E. Carlson, “A trophic state index for lakes1,” *Limnology and Oceanography*, vol. 22, no. 2, pp. 361–369, 1977. [Online]. Available: <https://aslopubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.4319/lo.1977.22.2.0361>
- [91] G. Klippel, R. L. Macêdo, and C. W. C. Branco, “Comparison of different trophic state indices applied to tropical reservoirs,” *Lakes & Reservoirs: Science, Policy and Management for Sustainable Use*, vol. 25, no. 2, pp. 214–229, 2020. [Online]. Available: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/lre.12320>
- [92] J. M. Rinta-Kanto, A. J. A. Ouellette, G. L. Boyer, M. R. Twiss, T. B. Bridgeman, and S. W. Wilhelm, “Quantification of Toxic Microcystis spp. during the 2003 and 2004 Blooms in Western Lake Erie using Quantitative Real-Time PCR,” *Environmental*
-

- Science & Technology*, vol. 39, no. 11, pp. 4198–4205, Jun. 2005. [Online]. Available: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es048249u>
- [93] J. Shoemaker, D. Tetttenhorst, and A. De la Cruz, “METHOD 544. DETERMINATION OF MICROCYSTINS AND NODULARIN IN DRINKING WATER BY SOLID PHASE EXTRACTION AND LIQUID CHROMATOGRAPHY/TANDEM MASS SPECTROMETRY (LC/MS/MS).” Feb. 2015. [Online]. Available: https://cfpub.epa.gov/si/si_public_record_report.cfm?dirEntryId=306953
- [94] E. Bolyen, J. R. Rideout, M. R. Dillon, N. A. Bokulich, C. Abnet, G. A. Al-Ghalith, H. Alexander, E. J. Alm, M. Arumugam, F. Asnicar, Y. Bai, J. E. Bisanz, K. Bittinger, A. Brejnrod, C. J. Brislawn, C. T. Brown, B. J. Callahan, A. M. Caraballo-Rodríguez, J. Chase, E. Cope, R. Da Silva, P. C. Dorrestein, G. M. Douglas, D. M. Durall, C. Duvallet, C. F. Edwardson, M. Ernst, M. Estaki, J. Fouquier, J. M. Gauglitz, D. L. Gibson, A. Gonzalez, K. Gorlick, J. Guo, B. Hillmann, S. Holmes, H. Holste, C. Huttenhower, G. Huttley, S. Janssen, A. K. Jarmusch, L. Jiang, B. Kaehler, K. B. Kang, C. R. Keefe, P. Keim, S. T. Kelley, D. Knights, I. Koester, T. Kosciulek, J. Kreps, M. G. Langille, J. Lee, R. Ley, Y.-X. Liu, E. Loftfield, C. Lozupone, M. Maher, C. Marotz, B. D. Martin, D. McDonald, L. J. McIver, A. V. Melnik, J. L. Metcalf, S. C. Morgan, J. Morton, A. T. Naimey, J. A. Navas-Molina, L. F. Nothias, S. B. Orchanian, T. Pearson, S. L. Peoples, D. Petras, M. L. Preuss, E. Priesse, L. B. Rasmussen, A. Rivers, M. S. Robeson, II, P. Rosenthal, N. Segata, M. Shaffer, A. Shiffer, R. Sinha, S. J. Song, J. R. Spear, A. D. Swafford, L. R. Thompson, P. J. Torres, P. Trinh, A. Tripathi, P. J. Turnbaugh, S. Ul-Hasan, J. J. van der Hooft, F. Vargas, Y. Vázquez-Baeza, E. Vogtmann, M. von Hippel, W. Walters, Y. Wan, M. Wang, J. Warren, K. C. Weber, C. H. Williamson, A. D. Willis, Z. Z. Xu, J. R. Zaneveld, Y. Zhang, Q. Zhu, R. Knight, and J. G. Caporaso, “QIIME 2: Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science,” *PeerJ Preprints*, preprint, Dec. 2018. [Online]. Available: <https://peerj.com/preprints/27295v2>
- [95] B. J. Callahan, P. J. McMurdie, M. J. Rosen, A. W. Han, A. J. A. Johnson, and S. P. Holmes, “DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data,” *Nature Methods*, vol. 13, no. 7, pp. 581–583, Jul. 2016. [Online]. Available: <http://www.nature.com/articles/nmeth.3869>
- [96] C. Quast, E. Priesse, P. Yilmaz, J. Gerken, T. Schweer, P. Yarza, J. Peplies, and F. O. Glöckner, “The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools,” *Nucleic Acids Research*, vol. 41, no. D1, pp. D590–D596, Nov. 2012. [Online]. Available: <http://academic.oup.com/nar/article/41/D1/D590/1069277/The-SILVA-ribosomal-RNA-gene-database-project>
- [97] P. J. McMurdie and S. Holmes, “phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data,” *PLoS ONE*, vol. 8, no. 4, p. e61217, Apr. 2013. [Online]. Available: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- [98] D. T. McKnight, R. Huerlimann, D. S. Bower, L. Schwarzkopf, R. A. Alford, and K. R. Zenger, “Methods for normalizing microbiome data: An ecological perspective,” *Methods in Ecology and Evolution*, vol. 10, no. 3, pp. 389–400, Mar. 2019. [Online]. Available: <http://doi.wiley.com/10.1111/2041-210X.13115>

-
- [99] P. J. McMurdie and S. Holmes, “Waste Not, Want Not: Why Rarefying Microbiome Data Is Inadmissible,” *PLoS Computational Biology*, vol. 10, no. 4, p. e1003531, Apr. 2014. [Online]. Available: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pcbi.1003531>
- [100] M. I. Love, W. Huber, and S. Anders, “Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2,” *Genome Biology*, vol. 15, no. 12, p. 550, Dec. 2014. [Online]. Available: <http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-014-0550-8>
- [101] Jari Oksanen, F. Guillaume Blanche, Michael Friendly, Roeland Kindt, Pierre Legendre, Dan McGlinn, Peter R. Minchin, R. B. O’Hara, Gavin L. Simpson, Peter Solymos, M. Henry H. Stevens,, Eduard Szoecs, and Helene Wagner, “Package ‘vegan’. Community Ecology Package. Version 2.5-7.” Nov. 2020. [Online]. Available: <https://cran.r-project.org>, <https://github.com/vegandevs/vegan>
- [102] S. Śliwińska Wilczewska, J. Maculewicz, A. Barreiro Felpeto, and A. Latała, “Allelopathic and Bloom-Forming Picocyanobacteria in a Changing World,” *Toxins*, vol. 10, no. 1, p. 48, Jan. 2018, number: 1 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute. [Online]. Available: <https://www.mdpi.com/2072-6651/10/1/48>
- [103] R. Akcaalan, L. Köker, A. Oğuz, L. Spoof, J. Meriluoto, and M. Albay, “First Report of Cylindrospermopsin Production by Two Cyanobacteria (*Dolichospermum mendotae* and *Chrysosporum ovalisporum*) in Lake Iznik, Turkey,” *Toxins*, vol. 6, no. 11, pp. 3173–3186, Nov. 2014, number: 11 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute. [Online]. Available: <https://www.mdpi.com/2072-6651/6/11/3173>
- [104] S. Gkelis, T. Papadimitriou, N. Zaoutsos, and I. Leonardos, “Anthropogenic and climate-induced change favors toxic cyanobacteria blooms: Evidence from monitoring a highly eutrophic, urban Mediterranean lake,” *Harmful Algae*, vol. 39, pp. 322–333, Oct. 2014. [Online]. Available: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568988314001644>
- [105] F. A. M. d. Faria, P. Jaramillo, H. O. Sawakuchi, J. E. Richey, and N. Barros, “Estimating greenhouse gas emissions from future Amazonian hydroelectric reservoirs,” *Environmental Research Letters*, vol. 10, no. 12, p. 124019, Dec. 2015, publisher: IOP Publishing. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1088/1748-9326/10/12/124019>
- [106] DANE, “Censo Nacional de Población y Vivienda -CNPV- 2018,” 2018. [Online]. Available: <https://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/demografia-y-poblacion/proyecciones-de-poblacion>
- [107] Alcaldía San Vicente de Chucurí, “Plan territorial de salud San Vicente de Chucurí 2016 - 2019,” 2017. [Online]. Available: https://sanvicede-chucurisantander.micolombiadigital.gov.co/sites/sanvicede-chucurisantander/content/files/000008/372_plan-de-salud-20162019.pdf
- [108] Centro de estudios, investigaciones y proyectos para la competitividad de Barrancabermeja (Competics), “Resumen comportamiento socioeconómico Barrancabermeja y su área de influencia 2017,” 2017. [Online]. Available: http://www.ccbarranca.org.co/ccbar/images/documentos/estudio_economico_2017.pdf
-

-
- [109] A. Giani, Z. E. Taranu, G. von Rückert, and I. Gregory-Eaves, “Comparing key drivers of cyanobacteria biomass in temperate and tropical systems,” *Harmful Algae*, vol. 97, p. 101859, Jul. 2020. [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568988320301384>
- [110] H. Almuhtaram, F. A. Kibuye, S. Ajampur, C. M. Glover, R. Hofmann, V. Gaget, C. Owen, E. C. Wert, and A. Zamyadi, “State of knowledge on early warning tools for cyanobacteria detection,” *Ecological Indicators*, vol. 133, p. 108442, Dec. 2021. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1470160X21011079>
- [111] S.-H. Joung, H.-M. Oh, S.-R. Ko, and C.-Y. Ahn, “Correlations between environmental factors and toxic and non-toxic Microcystis dynamics during bloom in Daechung Reservoir, Korea,” *Harmful Algae*, vol. 10, no. 2, pp. 188–193, Jan. 2011. [Online]. Available: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568988310001125>
- [112] A. Eiler and S. Bertilsson, “Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish lakes,” *Environmental Microbiology*, vol. 6, no. 12, pp. 1228–1243, 2004, eprint: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1462-2920.2004.00657.x>. [Online]. Available: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1462-2920.2004.00657.x>
- [113] S. H. Te, B. F. Tan, J. R. Thompson, and K. Y.-H. Gin, “Relationship of Microbiota and Cyanobacterial Secondary Metabolites in Planktothricoides-Dominated Bloom,” *Environmental Science & Technology*, vol. 51, no. 8, pp. 4199–4209, Apr. 2017, publisher: American Chemical Society. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05767>
- [114] P. M. Visser, B. W. Ibelings, L. R. Mur, and A. E. Walsby, “The Ecophysiology of the Harmful Cyanobacterium Microcystis,” in *Harmful Cyanobacteria*, J. Huisman, H. C. Matthijs, and P. M. Visser, Eds. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2005, vol. 3, pp. 109–142, series Title: Aquatic Ecology Series. [Online]. Available: http://link.springer.com/10.1007/1-4020-3022-3_6
- [115] A. L. F. F. Furtado, M. d. C. Calijuri, A. S. Lorenzi, R. Y. Honda, D. B. Genuário, and M. F. Fiore, “Morphological and molecular characterization of cyanobacteria from a Brazilian facultative wastewater stabilization pond and evaluation of microcystin production,” *Hydrobiologia*, vol. 627, no. 1, pp. 195–209, Jul. 2009. [Online]. Available: <http://link.springer.com/10.1007/s10750-009-9728-6>
- [116] R. C. Cervantes Cianca, M. S. Baptista, V. R. Lopes, and V. M. Vasconcelos, “The non-protein amino acid β -N-methylamino-L-alanine in Portuguese cyanobacterial isolates,” *Amino Acids*, vol. 42, no. 6, pp. 2473–2479, Jun. 2012. [Online]. Available: <http://link.springer.com/10.1007/s00726-011-1057-1>
- [117] E. Briand, J. Humbert, K. Tambosco, M. Bormans, and W. H. Gerwick, “Role of bacteria in the production and degradation of Microcystis cyanopeptides,” *MicrobiologyOpen*, vol. 5, no. 3, pp. 469–478, Feb. 2016. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4905998/>
-

- [118] K. A. Kormas and D. S. Lymperopoulou, "Cyanobacterial Toxin Degrading Bacteria: Who Are They?" *BioMed Research International*, vol. 2013, p. 463894, 2013. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3690202/>