

Microbiota del complejo *Microcystis aeruginosa* (CMA): su papel en el crecimiento colonial y en la formación de *biofilms*.

Lic. Carolina Croci

Introducción

Floraciones de cianobacterias tóxicas

El filo Cianobacteria del dominio Bacteria comprende un grupo morfológico y ecológicamente heterogéneo de bacterias capaces de realizar fotosíntesis oxigénica (Madigan et al., 2015). Tienen un rol muy importante en los ciclos biogeoquímicos y fueron críticos para la oxigenación de la atmósfera (Madigan et al., 2015). Son organismos cosmopolitas, que habitan desde sistemas de agua dulce y marina hasta sistemas terrestres (Whitton et al., 2012).

En el caso de las cianobacterias fitoplanctónicas (que viven suspendidas en la columna de agua) regulan su crecimiento principalmente en función de la disponibilidad de luz, temperatura, nutrientes, regímenes de lluvias y depredación (Huisman et al., 2005; Bonilla et al., 2009). Bajo condiciones propicias, que se dan debido al enriquecimiento de nutrientes en el agua (eutrofización), tienden a crecer aceleradamente produciéndose lo que se denomina como floraciones (o *bloom*). Estas pueden estar compuestas por una o pocas especies y pueden observarse a simple vista como manchas verdes (Bonilla, 2009; Feola, 2008). El constante estado de eutrofización de los sistemas acuáticos (acelerado por actividades humanas; ej.: actividades agrícolas, ganaderas, así como de vertimientos de aguas residuales industriales o domésticas) junto con el cambio climático (ej.: aumento de la temperatura y cambio en el régimen de precipitaciones) y la baja renovación del agua (ej.: generación de embalses) ha favorecido la intensidad y frecuencia de floraciones (Paerl et al., 2008). El crecimiento masivo de estos organismos puede causar disturbios ecológicos y deteriorar la calidad del agua al producir mal olor, incrementar la turbidez, reducir la biodiversidad y pudiendo llegar a agotar el oxígeno disuelto al descomponerse las grandes biomasas generadas durante la floración (Huisman et al., 2018).

Por otra parte, una de las mayores preocupaciones en torno a las floraciones de cianobacterias es que algunas de ellas son capaces de producir metabolitos tóxicos para los animales y humanos (cianotoxinas) (Paerl et al., 2008). La presencia de cianotoxinas en el agua afecta los usos que hacemos los humanos, desde consumo directo, riego, acuicultura, hasta recreativos (Paerl, 2014; Wang et al., 2021). Debido a los efectos a nivel ecosistémico que tienen las floraciones de cianobacterias, agravados por la presencia de toxinas y sus efectos perjudiciales para la salud animal y humana, en la literatura se los denomina como CyanoHABs (*Cyanobacterial harmful algal blooms*). Los CyanoHABs son cada vez más frecuentes e incluso a veces permanente en todo el mundo y son varios los géneros de cianobacterias capaces de causarlas: *Anabaena*, *Raphidiopsis* (*Cylindrospermopsis*), *Nodularia*, *Microcystis*, *Planktothrix* y *Oscillatoria* (Wang et al., 2021).

Cianobacteria y colaboradores: el holobionte Microcystis aeruginosa (CMA)

En Uruguay, la cianobacteria más frecuentemente asociada a los CyanoHABs son las especies del género *Microcystis*, existiendo registros desde el año 1982 (CARP, SHIN, SOHMA, 1990; Feola, 2008; Martínez de la Escalera et al., 2017). Estas especies forman lo que se denomina complejo *Microcystis aeruginosa* (CMA), que nuclea a todas las especies del género *Microcystis* (tanto tóxicas como no tóxicas, capaces o no de producir microcistina) unificadas en base a características genéticas, genómicas y ecológicas (Otsuka et al., 1999; Otsuka et al., 2001).

Las especies del CMA poseen mecanismos adaptativos morfológicos y fisiológicos que les permiten mantener la dominancia en lagos eutrofizados, tales como control de la flotabilidad mediante vesículas de gas, evasión de la depredación y resistencia al estrés ambiental debido a la formación de grandes colonias embebidas en mucílago (Martínez de la Escalera, 2019; Whitton et al., 2012; Kehr et al., 2015). Esta matriz mucilagínosa que se encuentra rodeando sus colonias está formada por polisacáridos y proteínas y se encuentra habitada por una variedad de organismos, entre ellos bacterias heterótrofas. En dicho ambiente, denominado ficósfera (Bell et al., 1972; Seymour et al., 2017), se dan interacciones entre las cianobacterias y las bacterias heterótrofas en las que cada parte es necesaria para la supervivencia y el éxito de la otra (Cook et al., 2019). Mientras que los principales

beneficios para las bacterias son la protección y la disponibilidad de fuentes de carbono, la cianobacteria se beneficia debido a la capacidad de las bacterias de promover su crecimiento, reciclando nutrientes bajo condiciones limitadas o proveyéndoles con micronutrientes limitantes (como hierro y vitaminas), removiendo especies reactivas de oxígeno y generando CO₂ (Alvarenga et al., 2017; Cook et al., 2019; Wu et al., 2019; Wang et al., 2021). Esto apunta a que puede haber una división genética de trabajo entre *Microcystis* y su microbiota, donde cada parte presenta genes funcionales distintos y complementarios en el marco de *The Black Queen Hypothesis* o BQH (pérdida de genes redundantes) (Morris et al., 2012). De esta forma, *Microcystis* se beneficia por productos generados por su microbiota y elimina dichos genes de su genoma (Cook et al., 2019). Existe también evidencia de eventos de transferencia horizontal de genes (genes compartidos, redundantes). Se ha descrito la pérdida de genes en organismos que viven íntimamente asociados entre sí, lo cual evita la redundancia que es común en organismos menos íntimamente asociados con otros o de vida libre (Pérez-Carrascal et al., 2021). Así, *Microcystis* depende de su microbiota para llenar algunos vacíos metabólicos y por lo tanto algunas funciones de su microbiota deberán mantenerse entre distintas floraciones para que tenga éxito (Cook et al., 2019). Además, gracias a estudios como el realizado por Shen et al., 2011 se logró determinar la importancia de las bacterias heterótrofas que habitan dicho mucílago en la formación de las colonias. En dicho estudio se “trasplantó” el mucílago y sus bacterias de colonias de *Microcystis* a una cepa en cultivo unicelular (única forma que crece en cultivos de largo plazo; Xiao et al., 2018), induciendo la formación de colonias en el último. También se ha observado que la comunidad microbiana difiere a lo largo de la desagregación de colonias (Wang et al., 2015) y entre diferentes tamaños de colonia (Cai et al., 2014).

En el sentido de entender a la cianobacteria-microbiota como análogo a la relación planta(raíz)-microbiota o animal-microbiota, estas dos partes que interactúan pueden definirse como un único organismo u holobionte, de forma que las interacciones cianobacteria-bacteria tienen un efecto a nivel ecosistémico (Vico et al., 2021).

Morfología del CMA

Dado que los rasgos morfológicos resumen aspectos funcionales del fitoplancton, respuestas a cambios ambientales y sus efectos en el ambiente, estos se utilizan para clasificarlos en grupos (Kruk et al., 2010; Deus, 2018). Aspectos del CMA como la tasa de crecimiento, la absorción de recursos y las propiedades de interceptación de la luz dependen de su morfología (ej.: MLD o dimensión lineal máxima, utilizado como tamaño). La gran variabilidad de tamaño del CMA, desde células individuales hasta grandes colonias mucilaginosas, se ha relacionado con etapas fisiológicas y ontogénicas, así como a condiciones ambientales (Kruk et al., 2017; Deus et al., 2020).

Trabajos previos de nuestro grupo de investigación mostraron que las colonias del CMA de tamaño mediano a grande (60-150 μm y $>150 \mu\text{m}$, respectivamente) y con gran cantidad de mucílago son las que presentan mayor toxicidad (Deus, 2018; Deus et al., 2020).

Dado que el mucílago varía en espesor, densidad y composición durante el ciclo de crecimiento colonial, en distintas condiciones ambientales y según la especie de *Microcystis*, esto podría determinar la naturaleza de las interacciones CMA-microbiota (Wang et al., 2021; Komárková et al., 2005).

Las colonias del CMA como biofilms

Los *biofilms* bacterianos se definen como agregados de células microbianas rodeados de una matriz polimérica producida por los propios organismos, pudiendo estar compuestos por una (monoespecíficos) o varias especies (multiespecíficos) viviendo de manera cooperativa (Flemming et al., 2016). El clásico modelo conceptual de formación de *biofilms* involucra células móviles planctónicas que se adhieren a una superficie en respuesta a distintas señales ambientales (Hoffman et al., 2005). Estas células adheridas a superficies producen una matriz hidratada de EPS, ADN extracelular, proteínas y lípidos (Stoodley et al., 2002), cambiando su estructura y relaciones funcionales.

En cianobacterias acuáticas la presencia de *biofilms* se asocia generalmente a especies bentónicas que forman matas en diversos ecosistemas acuáticos (Stal, 2012). Sin embargo, se ha descrito que los *biofilms* bacterianos pueden existir en la interfase aire-líquido, formando *biofilms* flotantes o películas. Esta interfase les provee

de acceso al oxígeno y otros gases del aire y a nutrientes de la fase líquida a través de gradientes (Armitano et al., 2014). En el caso de bacterias heterótrofas formadoras de películas la capacidad de flotación se asegura mediante mecanismos tales como atrapamiento de burbujas de CO₂ generadas durante la respiración, secreción de agentes surfactantes y síntesis de matrices ricas en polisacáridos que evitan la mezcla con el medio líquido. Las colonias del CMA tienen una capacidad excepcional de flotación (Znachor et al., 2006) gracias a la presencia de vesículas de gas (aerotopos) en el citoplasma (Šmarda et al., 2008), que les permite regular su posición vertical en la columna de agua. A su vez, la composición de la matriz de EPS es similar a la de las bacterias que forman *biofilms* (Armitano et al. 2014; Lei et al., 2007; Li et al., 2009). La producción y composición de dicho EPS se asocia a distintas condiciones ambientales, tales como temperatura (Li et al., 2013; Xu et al., 2016; Yang et al., 2012), calcio (Sato et al., 2017; Wang et al., 2011), exposición a iones metálicos (Bi et al., 2013) y presencia de antibióticos (Zhang et al., 2018).

Estudios de Zhai et al. (2012) reportaron evidencia indicando la presencia de moléculas relacionadas con señales de *quorum sensing* como las acil-homoserina lactonas (AHLs por su sigla en inglés) en cultivos de *M. aeruginosa* PCC-7820. Además, la adición de AHLs indujo el cambio de *M. aeruginosa* unicelular a estructuras estilo *biofilm* con una fuerte agregación celular, sugiriendo que el *quorum sensing* podría jugar un papel importante en los cambios morfológicos inducidos por el ambiente sobre *M. aeruginosa*, regulando la formación de colonias (Zhai et al., 2012) a través de un comportamiento multicelular coordinado como el descrito en los *biofilms* bacterianos.

Más recientemente, Herrera y Echeverry (2021) aplicaron distintas AHLs de bacterias Gram negativas a cultivos de *Microcystis* y encontraron una correlación con la formación de colonias para la mayoría de las AHL ensayadas. Mediante estudios de transcriptómica Shi et al. (2022) mostraron además que varios de los transcritos necesarios para las vías de formación de *biofilms* en *Microcystis* pertenecían principalmente a bacterias heterótrofas de su microbiota, revelando la importancia del comportamiento cooperativo en la ficósfera de *Microcystis*. Más aún, se han detectado genes codificantes de pili tipo IV (ej.: *pilT*) en el genoma de *M. aeruginosa* PCC 7806 (Nakasugi and Neilan, 2005). Estos pili se encuentran en muchas especies de bacterias Gram negativas y están involucrados en adhesión celular, motilidad

twitching y transformación natural (Mattick, 2002), todas funciones relacionadas a la formación de *biofilms* (Barken et al., 2008; Klausen et al., 2003; Maldarelli et al., 2016).

En base a las características compartidas entre las colonias del CMA y los *biofilms* bacterianos nuestro grupo de trabajo ha propuesto que las colonias del CMA son en efecto *biofilms* multiespecíficos flotantes (Piccini et al., 2022). En este sentido, es necesario más investigación para confirmar esta hipótesis.

Estrategias de análisis de las microbiotas

Existen diferentes aproximaciones para estudiar la estructura comunitaria de las microbiotas, las clásicas dependen del cultivo de los microorganismos en medios definidos. Sin embargo, mediante aproximaciones independientes de cultivo se pudo determinar que la eficiencia de cultivo a partir de una muestra de suelo o agua es muy baja, dependiendo del ambiente solo el 0,1-1% de las bacterias son cultivables, con lo cual se estaba perdiendo mucha información de quiénes estaban presentes y por qué. En este sentido, en 1985 Staley y Konopka acuñaron el término *the great plate count anomaly*, en referencia a la diferencia entre los microorganismos presentes en una muestra ambiental, aquellos que formaban colonias en medio sólido y aquellos que se podían ver al microscopio (Staley et al., 1985; Connon et al., 2002). Entre los métodos independientes de cultivo, uno ampliamente utilizado es la secuenciación de amplicones del gen ribosomal 16S, utilizado como marcador universal procariota. Para esto se toma una muestra ambiental y se extrae el ADN de todas las células allí presentes (ADN ambiental), a continuación se amplifica todo el gen o una porción de este y se realiza una secuenciación masiva. Las regiones hipervariables (V1-V9) dentro de este gen permiten utilizarlo para estudios filogenéticos y taxonómicos (Van de Peer et al., 1996).

La información obtenida a partir del ADN ambiental da una idea de qué bacterias están presentes, sin determinar si se encuentran o no en crecimiento y por tanto en actividad. Sin embargo, se puede conocer qué taxones bacterianos presentes en una muestra se encuentran activos, y por lo tanto aportando funciones a la comunidad, mediante la extracción de ARN ambiental y secuenciación del correspondiente al gen 16S luego de generar ADN copia (ADNc). Dado que los ribosomas son la maquinaria celular responsable de la síntesis proteica, la

transcripción del ARN ribosomal se toma como un indicador de actividad celular y división (Kambura et al., 2016).

En este trabajo se empleó una aproximación basada en la extracción de ADN ambiental para conocer la estructura comunitaria bacteriana, mientras que el ARN ambiental se utilizó para determinar qué grupos bacterianos se encontraban activos, utilizando como modelo de estudio la comunidad del CMA del embalse de Salto Grande (Martínez de la Escalera et al., 2017).

Hipótesis

Se ha demostrado que el tamaño de las colonias del CMA está asociado a diferentes características genotípicas y ecológicas (toxicidad, morfología, cantidad y composición de los azúcares del mucílago). Estas diferencias determinan variaciones en la microbiota asociada, tanto a nivel de la estructura comunitaria como funcional.

Objetivo general

Conocer las relaciones existentes entre la morfología de las colonias del CMA (evaluada a través del tamaño) y la estructura y función de su microbiota asociada.

Objetivos específicos

1. Seleccionar muestras del CMA compuestas por colonias de distinto tamaño.
2. Conocer la estructura de la comunidad total y de la fracción activa de la microbiota asociada a las colonias seleccionadas en 1.
3. Proponer un modelo conceptual acerca de las relaciones existentes entre las cianobacterias del CMA y la estructura comunitaria de su microbiota a lo largo del ciclo de crecimiento de las colonias.

Estrategia de la investigación

En este trabajo se empleó una aproximación basada en secuenciación masiva del gen ribosomal 16S (región V4), analizando tanto ADN (estructura comunitaria total; sin diferenciar entre bacterias vivas o muertas) como ADNc (fracción activa),

luego de fraccionar muestras de cianobacterias en distintos tamaños que dan cuenta de diferentes etapas de crecimiento así como distinta toxicidad.

Materiales y métodos

Toma y procesamiento de la muestra

Las muestras fueron tomadas durante dos campañas realizadas en el embalse de Salto Grande (Río Uruguay), en diciembre 2016 en el sitio Itapebí (ID) y en enero 2017 en el sitio Gualeguaycito (GE) (**Fig. 1**). En el momento de la toma de muestras se realizaron medidas de variables ambientales *in situ* (pH, temperatura del agua, turbidez), mientras que en el laboratorio se realizaron medidas de clorofila a, biovolumen y número de copias del gen *mcyE* según Deus (2018). En ambos sitios, se tomaron muestras de agua superficial con una botella de plástico estéril.

Para la extracción de ADN y ARN ambiental total se emplearon 250-300 ml de muestra de agua, los cuales fueron filtrados por 0,45 μm de poro para obtener la biomasa microbiana, mientras que muestras de agua de 5 L (o 1 L si había floración) se pasaron secuencialmente a través de tamices con distinto tamaño de malla (150, 60 y 20 μm), de forma de obtener 4 fracciones de tamaño de colonias: <20 μm (Unicelular, U), 20-60 μm (Chica, C), 60-150 μm (Mediana, M) y >150 μm (Grande, G). La fracción U incluye células individuales y colonias de pocas células. Así, se denominó a cada fracción de tamaño de acuerdo al siguiente esquema: ID o GE (si provenía de Itapebí o Gualeguaycito respectivamente) _U, _C, _M, _G o _T si se trataba de la fracción unicelular, chica, mediana, grande o la comunidad total, respectivamente.

Se contó por tanto con 20 muestras para extracción de ácidos nucleicos y análisis de secuenciación, cada una compuesta por miles de réplicas, ya que cada colonia del CMA constituyó una unidad de estudio (organismo o individuo). Los resultados de cada fracción reflejan por tanto la diversidad y función de miles de individuos.

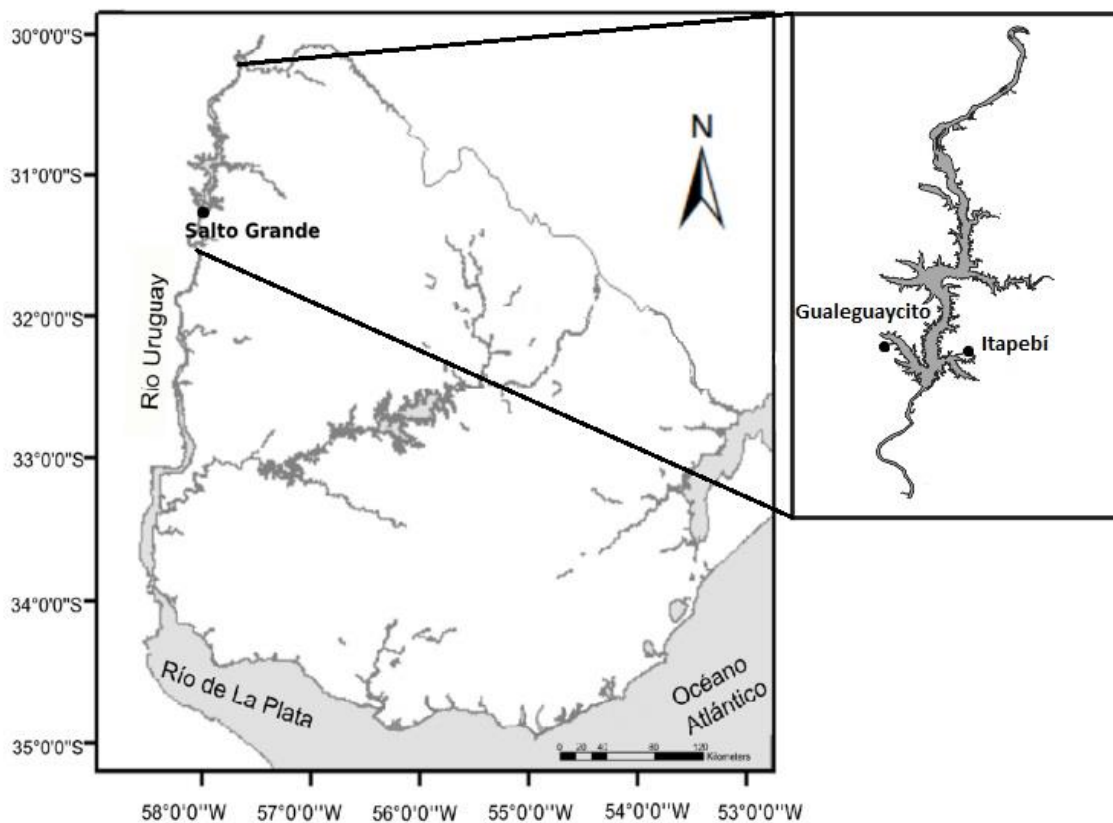


Figura 1. Mapa de Uruguay con los sitios de muestreo: Guleguaycito e Itapebí.

Extracción de ADN y ARN

Se filtraron entre 250-300 ml de la muestra total (GET o IDT) y de la fracción U, y 15 ml de las fracciones C, M y G por filtros de celulosa 0,22 μm . Para la extracción de ADN se siguió el protocolo descrito en Martínez de la Escalera *et al.* (2017) con algunas modificaciones. El protocolo consiste principalmente en: agregado del filtro y el buffer de extracción a un tubo de 2 ml (estéril) con beads de cerámica de 2 mm de diámetro, homogeneización durante 40 s a 6 m/s en el equipo fastprep (MP Biomedicals), separación del ácido nucleico con cloroformo:isoamílico (24:1), precipitación del ácido nucleico con isopropanol e incubación durante una hora a temperatura ambiente, y finalmente el lavado con etanol 70% (v/v) frío.

En el caso de la extracción de ARN, luego del filtrado se conservó el filtro en preservante del ARN hasta el momento de la extracción, para lo que se utilizó un kit comercial PureLink TM / RNA MiniKit, y por último se realizó la retrotranscripción a ADNc (Deus, 2018, Deus *et al.*, 2020). Por tanto, se obtuvieron 10 muestras de ADN

para analizar la estructura comunitaria y 10 muestras de ADNc para analizar a la fracción activa.

Secuenciación 16S y análisis bioinformático

Una vez obtenido el ADN y ADNc de las 20 muestras, se secuenció de forma masiva la región V4 del gen ribosomal 16S utilizando los cebadores universales 515F & 806R, en la plataforma Illumina MiSeq, obteniendo fragmentos paired-ends de 300 pb (University of Minnesota Genomics Center).

Todos los análisis bioinformáticos fueron llevados a cabo con el software libre R, versión 4.2.1 (R Core Team, 2022), siguiendo los *pipeline* de dada2 versión 1.16 (Callahan et al., 2016; Callahan et al., 2017; Dill-McFarland 2017; Castro-Nallar et al., 2019).

Las secuencias crudas fueron enviadas por el servicio ya demultiplexadas, las cuales fueron procesadas para eliminar aquellas de mala calidad según: calidad de secuencia, secuencias con bases ambiguas (N), quimeras y largo de amplicón de 250-300 pb (dado que los cebadores amplifican un fragmento de 291 pb). Las secuencias resultantes, se agruparon en ASVs (*Amplicon Sequence Variant*), es decir, secuencias que tuviesen 100% de identidad de secuencia, que luego se les fue asignada su taxonomía comparando con la base de datos de SILVA SSU v138.1 (Quast et al., 2013; Yilmaz et al., 2014). Una vez generada la tabla de abundancias de las ASV para cada muestra, se continuó trabajando con un *phyloseq* (Paul et al., 2013), objeto de R en el cual se unen la tabla de asignaciones taxonómicas, la tabla de abundancias, el árbol filogenético y la tabla con datos de las muestras (o metadata). De esta forma el posterior trabajo de análisis y gráficos es más simple dado que se trabaja con un único objeto.

Una vez generado el *phyloseq* a este se realizaron filtrados de ASVs, como por ejemplo: se eliminaron aquellas que provenían de cloroplastos, mitocondrias y aquellas que no se pudieron asignar a ningún filo, a su vez también se filtró según la prevalencia y abundancia de las ASVs.

Análisis de los datos

En primer lugar se generaron curvas de rarefacción para verificar que la profundidad de secuenciación haya sido suficiente en todas las muestras y que todas ellas hayan tenido el mismo esfuerzo de muestreo, es decir, que por más que se muestre más no cambie el número de ASVs encontradas.

A continuación, se determinó la α -diversidad con el paquete *vegan* (Oksanen *et al.*, 2022), es decir, la diversidad de la microbiota presente en cada muestra (excluyendo al CMA), para lo cual se calculó la riqueza, los índices de Shannon y Simpson y la Equitatividad. Luego, se estudió la β -diversidad, es decir, qué tan diferentes son la composición y estructura comunitaria entre las distintas muestras, mediante un análisis de ordenación no métrica (NMDS) basado en la distancia de disimilitud Bray-Curtis con la información de la abundancia de las ASVs. Para este caso, se realizó un análisis de PERMANOVA, con el fin de determinar si la separación de las muestras según el sitio o fracción era significativa.

Por último, para visualizar las diferencias entre las distintas fracciones se trabajó con las abundancias relativas de cada taxón (al nivel máximo que pudiese ser identificado, sea filo, clase, orden, familia o género) calculadas en base a cada muestra.

Resultados

Características de los sitios

Gualeguaycito fue el sitio donde se detectaron floraciones de distinta intensidad en todos los muestreos, evidenciado por una mayor abundancia de cianobacterias, en especial de genotipos tóxicos del CMA, asociada a una mayor turbidez y clorofila a.

Tabla 1. Valores de las variables ambientales y biológicas de los dos sitios de muestreo; ID: Itapebí Diciembre, GE: Gualeguaycito Enero. C: Colonia, F: Floración.

Sitio	pH	T agua (°C)	Turbidez (NTU)	Floración	Clorofila ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	<i>mcyE</i> (copias.ml ⁻¹)
ID	8,0	26,3	15,9	C	36	$2,9 \times 10^3$

GE	9,7	29,4	62,8	F	215,3	$2,5 \times 10^5$
----	-----	------	------	---	-------	-------------------

Resultados secuenciación 16S

Se obtuvieron un total de 1.577.106 lecturas con un valor mínimo en la muestra de ADNc de ID_C alcanzando las 35.305 secuencias, mientras que el máximo fue 198.285 alcanzado por la muestra de ADN de GE_T. Luego del procesado de las secuencias, las lecturas se redujeron a 1.059.932. Inicialmente las secuencias se colapsaron en un total de 4.950 ASVs, que luego de los filtrados correspondientes, se redujeron a 2.976 ASVs. Se corroboró que todas las muestras llegaron a la meseta en la curva de rarefacción (**Fig. 2**).

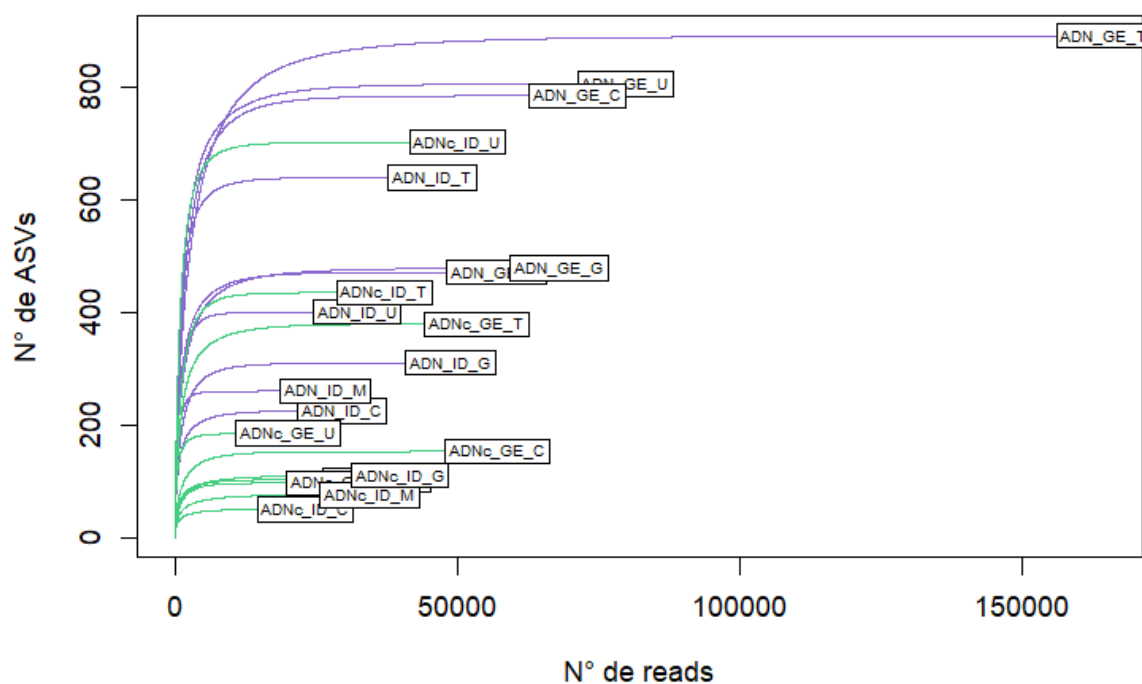


Figura 2. Curva de rarefacción. En violeta se observan las muestras de ADN y en verde las muestras de ADNc. La muestra de ADN_GE_T posee la mayor cantidad de lecturas así como de ASVs. ID: Itapebí Diciembre, GE: Gualeguaycito Enero, U: Unicelular, C: Chica, M: Mediana, G: Grande y T: Total.

Estructura comunitaria de la microbiota

Los resultados de α -diversidad de la microbiota mostraron que en GE la mayor riqueza se encontraba en las fracciones más pequeñas: U y C; pero en cuanto a los

índices de diversidad aplicados (Shannon, 1-Simpson y Equitatividad) no hubo diferencias entre las fracciones, todas mostraron similar diversidad y equitatividad (**Fig. 3**). En cambio, para ID se observó en general que las muestras tenían menor riqueza y diversidad que GE, exacerbado en la fracción C. En cuanto a las muestras totales, se observó que en el caso de GE ésta fue en general una buena estimación global de lo que se observó para cada fracción, pero no así en el caso de ID, donde en todos los casos se observó un valor mayor diversidad en la fracción total con respecto a las fracciones.

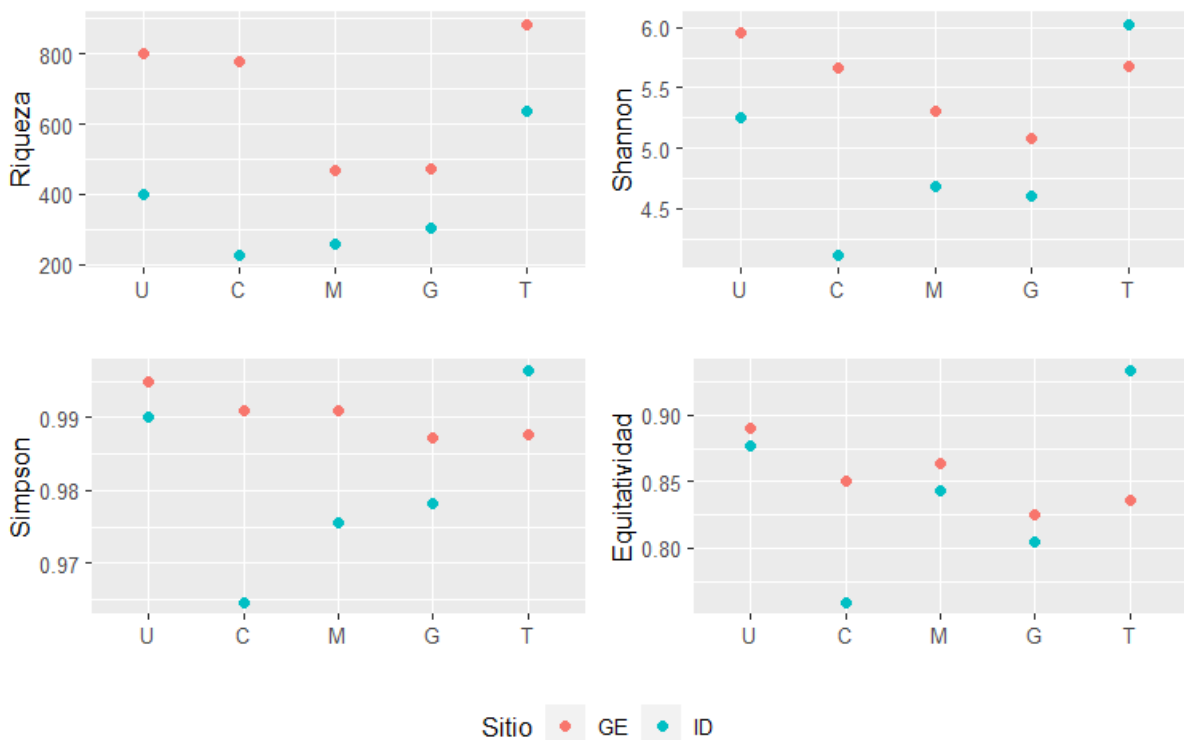


Figura 3. Índices de α -diversidad para las 4 fracciones de tamaño y la fracción total de los dos sitios de estudio. ID: Itapebí Diciembre, GE: Gualeguaycito Enero, U: Unicelular, C: Chica, M: Mediana, G: Grande y T: Total.

A través del análisis de NMDS (**Fig. 4**) se observó y confirmó estadísticamente (p -valor < 0,05), que había una separación de las muestras de ADN según el sitio, por lo tanto el análisis mostró que la composición microbiana de GE era diferente a la de ID.

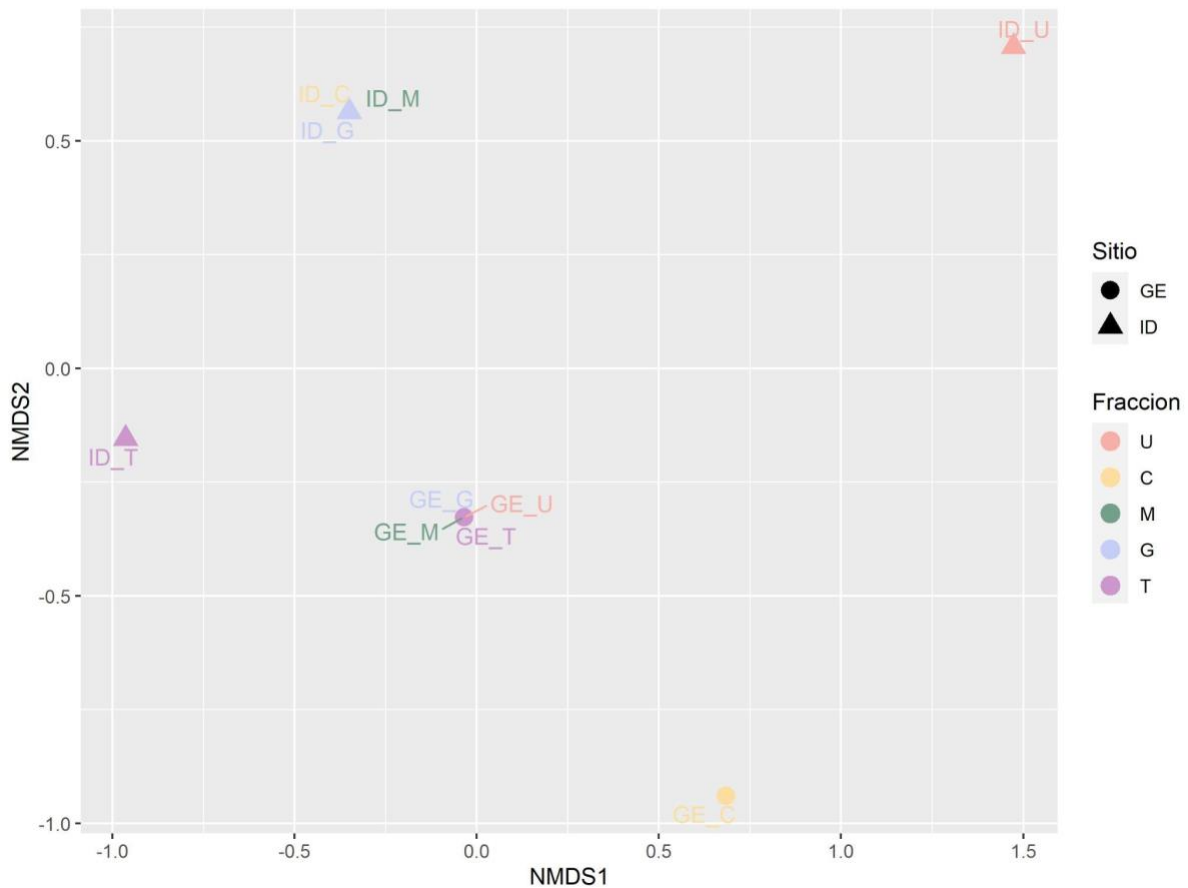


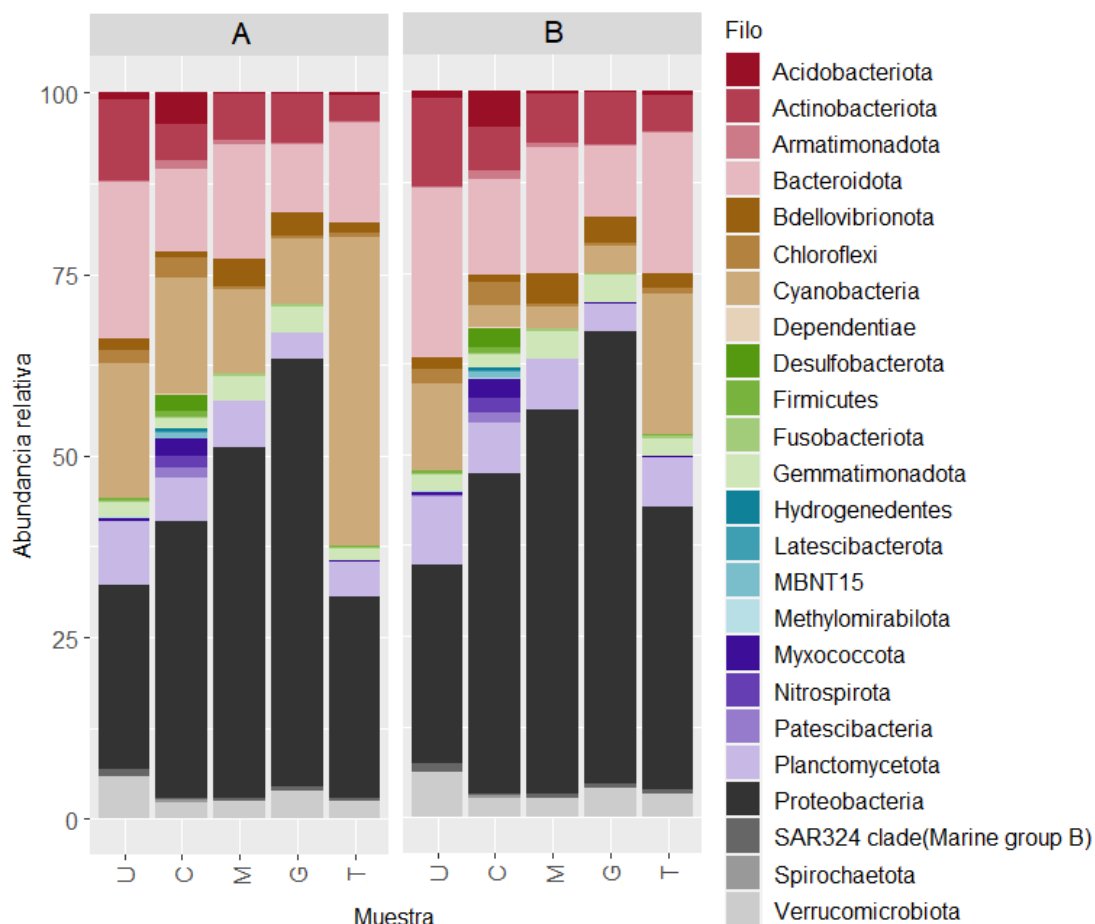
Figura 4. NMDS con distancia Bray-Curtis para estimar disimilitud entre muestras. ID: Itapebí Diciembre, GE: Gualeguaycito Enero, U: Unicelular, C: Chica, M: Mediana, G: Grande y T: Total.

Estructura de la comunidad de Gualeguaycito (ADN)

Excluyendo al CMA, los filos más abundantes fueron Proteobacteria y Bacteroidetes, seguidos por Cyanobacteria, Planctomycetes y Actinobacteria (**Fig. 5**). Se observó que a mayores tamaños coloniales aumentaron las Proteobacteria (27% a 62%) y disminuyeron Bacteroidetes (23% a 10%), Cyanobacteria (12% a 4%), Planctomycetes (10% a 4%) y Actinobacteria (12% a 7%).

Dentro de Proteobacteria (**Fig. 6A**) se observó la presencia de las clases Alfa, Beta y Gamma, dominando las Alfa (14% a 33%), luego las Beta (10% a 26%) y por último las Gamma (2% a 14%). Con respecto a lo observado para el filo, se ve el mismo patrón en las distintas fracciones en las Alfa (por ej.: los géneros *Roseomonas* -orden Acetobacterales- y *Phenylobacterium* -orden Caulobacterales-) y Gamma (dominando el género *Silanimonas* -orden Xanthomonadales-), pero no así en las Beta en donde hay mayor abundancia en la fracción C, al extremo de que algunos

organismos sólo están presentes en esta fracción (por ej.: los géneros *Rhodoferrax* y *Sulfuricella* del único orden de Beta presente, Burkholderiales).



Figura

5. Abundancia relativa a nivel de filios en Gualeguaycito. (A) Incluyendo al CMA. (B) Excluyendo al CMA. U: Unicelular, C: Chica, M: Mediana, G: Grande y T: Total.

Dentro de los Bacteroidetes (**Fig. 6B**), al aumentar el tamaño colonial se observa una disminución de la abundancia de los órdenes Chitinofagales, Flavobacteriales, Kapabacteriales y Sphingobacteriales, los que presentaron su máximo en la fracción U; excepto el orden Cytophagales que es más abundante en las fracciones C, M y G.

En el caso de las Cianobacteria los órdenes presentes son Synechococcales (género *Cyanobium*), Cyanobacteriales (que incluye a los órdenes Nostocales para el género *Dolichospermum* y Chroococcales para el género *Microcystis*), Limnotrichales (género *Limnothrix*) y Pseudanabaenales (género *Pseudanabaena*). Si se incluye al CMA en el análisis, el orden más abundante en todas las fracciones es Cyanobacteriales debido a la presencia dominante de *Microcystis*. Sin embargo, si

excluimos a este grupo los órdenes más abundantes fueron Synechococcales y Pseudanabaenales (**Fig. 6C**).

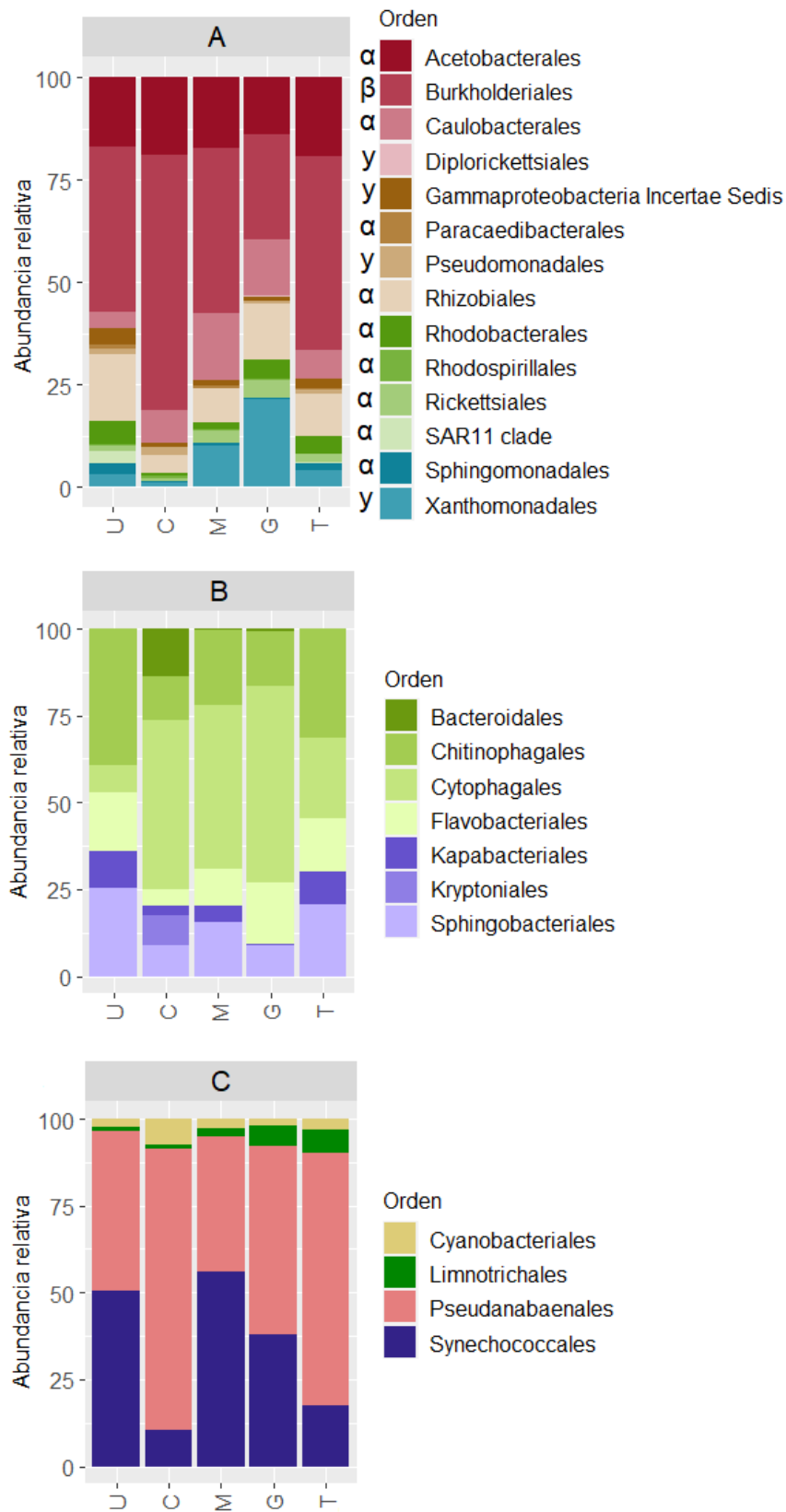


Figura 6. Abundancia relativa a nivel de orden para cada tamaño colonial en Gualeguaycito. (A) Proteobacteria (clases α , β y γ). (B) Bacteroidetes. (C) Cianobacteria (excluyendo CMA). U: Unicelular, C: Chica, M: Mediana, G: Grande y T: Total..

Fracción activa Gualeguaycito (ADNc)

La mayoría de los grupos bacterianos analizados mostraron claras diferencias de actividad entre las distintas fracciones de tamaño (**Fig. 7A**). Definimos como fracción más activa aquella que tiene más ARNr. El grupo que mostró mayor actividad fue Cianobacteria debido a la presencia del CMA (35% a 81%), quien mostró un aumento de actividad a medida que se incrementa el tamaño de la colonia (47% a 88%). Cuando se excluyó al CMA (**Fig. 7B**), la actividad de Cianobacteria bajó considerablemente y fueron las Proteobacteria quienes mostraron mayor actividad, siendo máxima en la fracción M (52% del total). Los Bacteroidetes por otra parte mantienen el patrón visto para la estructura de la comunidad total, disminuyendo su actividad con el aumento de tamaño de la fracción (20% a 9%).

En las Proteobacteria el orden más activo fue Burkholderiales seguido por Rhizobiales, Acetobacterales y Caulobacterales, aunque las actividades varían entre fracciones (**Fig. 8A**). La clase Alfa presentó su mayor actividad en la fracción más pequeña (19%), esto se ve respaldado principalmente por el orden Rhizobiales (8%). Por otro lado, las Gamma presentaron su mayor actividad en la fracción M (7%), principalmente debido al orden Xanthomonadales (género *Silanimonas*). Las Beta (orden Burkholderiales) fueron más activas en la fracción (27%) debido principalmente a la Familia Sutterellaceae (18%), seguido por la fracción M (24%) y G (19%) donde la actividad se encuentra repartida entre las familias Nitrosomonadaceae, Comamonadaceae y Sutterellaceae, y por último en la fracción U es donde se observó una menor actividad (8%) en general y presentaron una actividad más baja y uniforme.

Dentro de los Bacteroidetes, al igual que lo que sucedió para su abundancia, la actividad fue máxima en la fracción U (20%) y mínima en la G (9%). Los órdenes Chitinophagales, Flavobacteriales, Kapabacteriales y Sphingobacteriales presentaron su mayor actividad en la fracción U; mientras que el orden Cytophagales fue más activo en C, M y G (**Fig. 8B**).

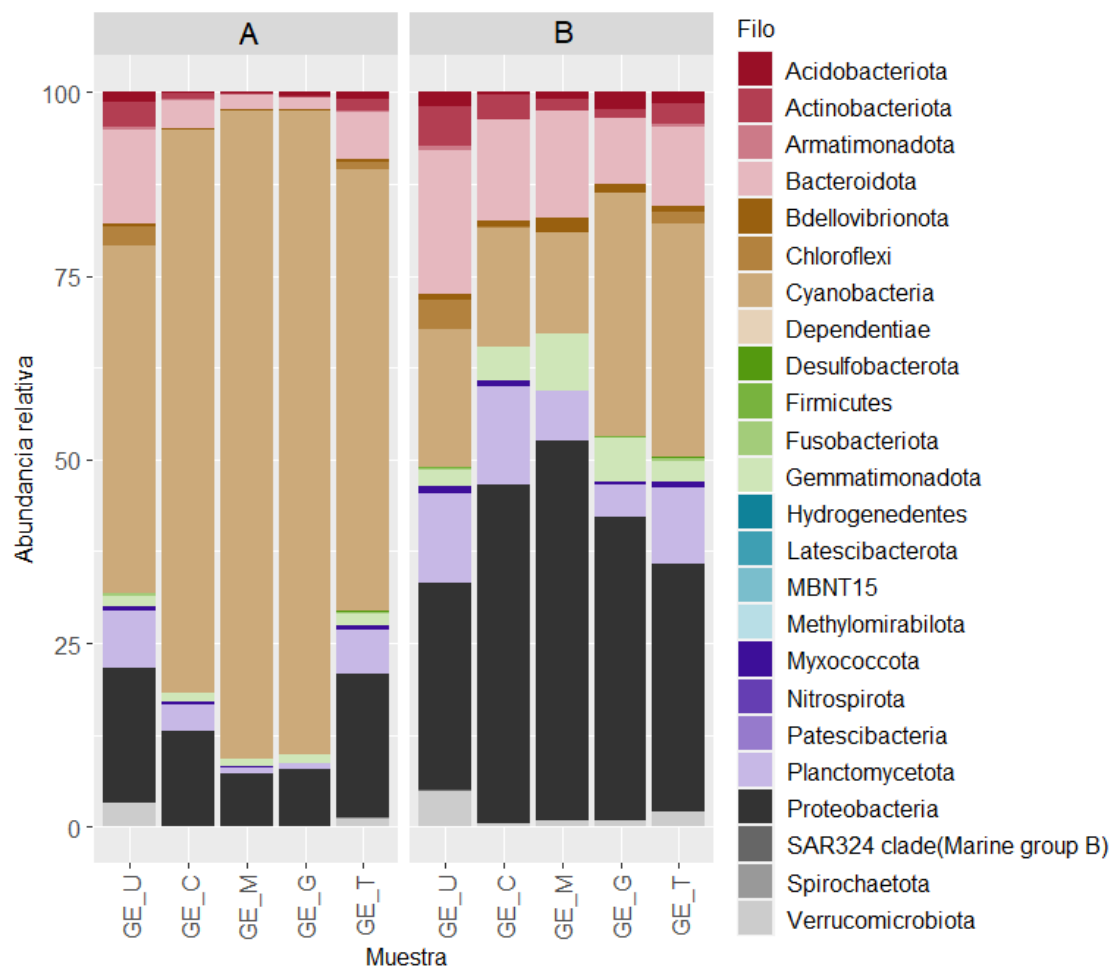


Figura 7. Abundancia relativa del ADNc a nivel de filo en Guleguaycito. **(A)** Incluyendo al CMA. **(B)** Excluyendo al CMA. U: Unicelular, C: Chica, M: Mediana, G: Grande y T: Total.

En cuanto a las Cianobacteria son las Pseudanabaenales quiénes se encuentran en mayor actividad (**Fig. 8C**). Mientras el género *Microcystis* presenta su mayor actividad en las fracciones M y G. El orden Synechococcales (género *Cyanobium*) presenta su mayor actividad en la fracción U, el orden Cyanobacteriales (género *Dolichospermum*) en la fracción C y el orden Pseudanabaenales (género *Pseudanabaena*) en la fracción G.

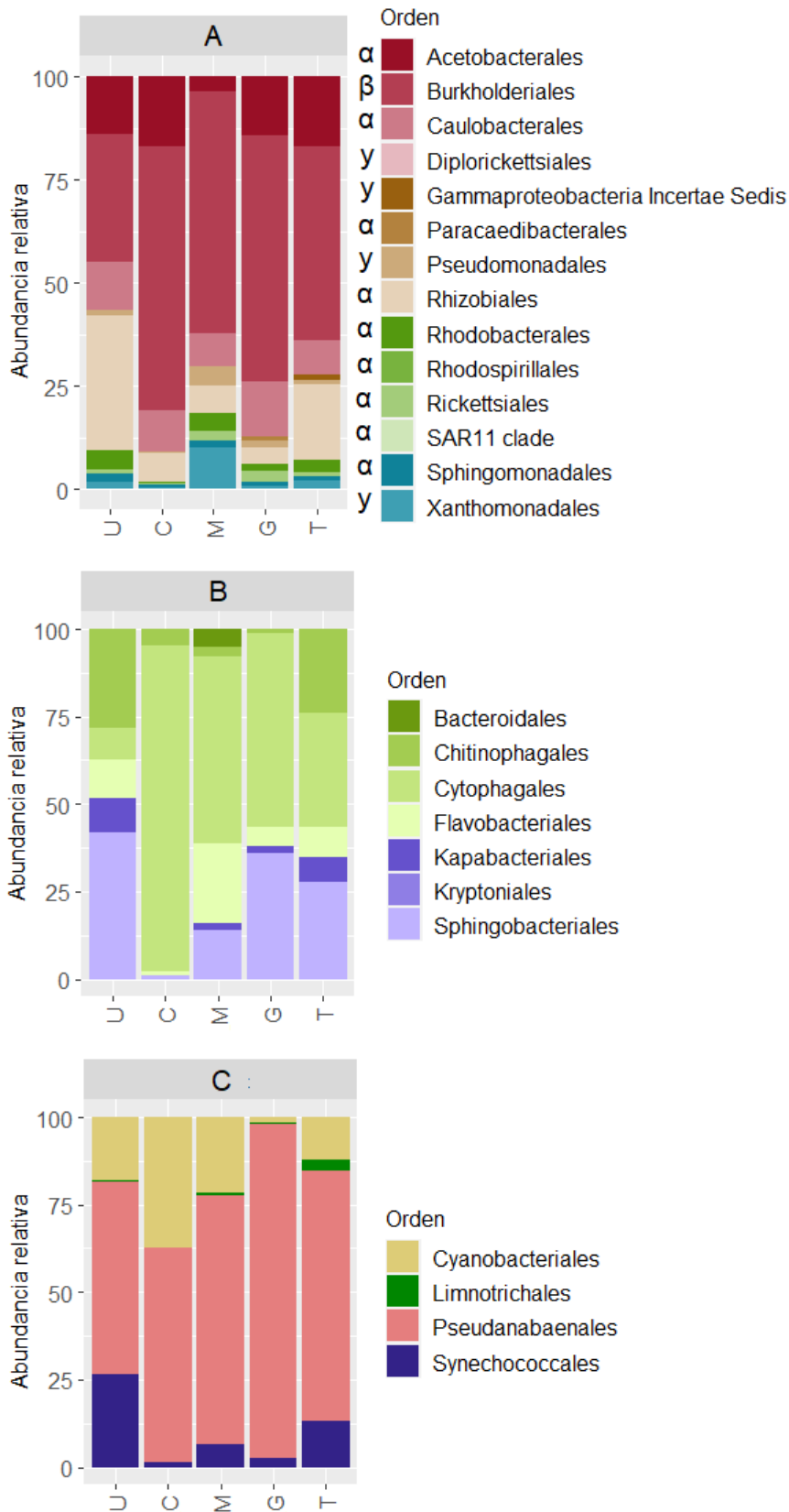


Figura 8. Abundancia relativa del ADNc a nivel de orden en Gualeguaycito. **(A)** Proteobacteria (clases α , β y γ). **(B)** Bacteroidetes. **(C)** Cianobacteria (excluyendo CMA). U: Unicelular, C: Chica, M: Mediana, G: Grande y T: Total.

Estructura y actividad de Gualeguaycito a nivel de ASVs

Con el fin de determinar si existen especies o géneros bacterianos específicos de cada fracción de tamaño se estudiaron las 10 ASV más abundantes (top 10) presentes en cada una, comparando para ello su abundancia (ADN) (**Tabla 2**) y actividad (ADNc) en cada fracción (**Tabla 3**).

En primer lugar y en coincidencia con lo ya mencionado, al aumentar el tamaño de la fracción se observó que el porcentaje del total que aporta el top 10 aumentó (en ADN de 5 a 25% y en ADNc de 25 a 52%), diferenciándose la fracción U del resto de las fracciones. Eso refleja que a medida que aumenta el tamaño colonial disminuye la riqueza, dado que se necesitan menos ASVs para alcanzar el 100%. También en términos de actividad ese porcentaje se alcanzó con menor cantidad de ASVs, por lo que de todos los ASVs presentes en cada fracción hay sólo algunos que estaban activos.

En segundo lugar, al comparar el top 10 de ASVs entre fracciones se vió que algunas de las ASV (ADN) eran compartidas entre todas las fracciones C, M y G (7, 9, 23 y 27), mientras que a nivel de actividad (ADNc) se puede ver que las fracciones que compartieron ASVs fueron U, C y M (ASVs 4, 6, 7, 9, 18 y 21). Si se compara las ASVs top 10 de ADN y ADNc dentro de cada fracción se observa que algunas se corresponden con aquellas que estaban más activas (ej.: las ASVs 4, 6, 12, 18 y 21 que estaban en la fracción U tanto de ADN como ADNc), pero otras no (ej.: las ASVs 114 y 133 que corresponden al filo Chloroflexi solo estuvieron presentes en la fracción U del ADNc).

Tabla 2. Top 10 ASVs más abundantes (GE_ADN) y más activas (GE_ADNc) en Gualeguaycito. U: Unicelular, C: Chica, M: Mediana y G: Grande. Los colores están asociados a los filos a los que pertenece cada ASV. El nivel mayor alcanzado hace referencia al mayor nivel de asignación taxonómica al cuál logró asignarse cada ASV; C: Clase, F: Familia, G: Género. Y el porcentaje (%) hace referencia al porcentaje de lecturas con respecto al total dentro de cada muestra al que corresponde cada ASV.

GE_ADN					GE_ADN				
	ASV	Filo	Nivel mayor alcanzado	%		ASV	Filo	Nivel mayor alcanzado	%
U	4	Cyanobacteria	Pseudanabaena (G)	0.95	M	7	Bacteroidota	Microscillaceae (F)	3.31
	6	Cyanobacteria	Pseudanabaena (G)	0.83		9	Bacteroidota	Microscillaceae (F)	3.08
	37	Planctomycetota	Pirellulaceae (F)	0.54		23	Proteobacteria	Silanimonas (G)	2.13
	46	Planctomycetota	Pirellulaceae (F)	0.50		53	Proteobacteria	Nitrosomonadaceae (F)	1.95
	11	Cyanobacteria	Cyanobium (G)	0.47		24	Proteobacteria	Silanimonas (G)	1.89
	12	Cyanobacteria	Cyanobium (G)	0.42		57	Proteobacteria	Sutterellaceae (F)	1.87
	18	Planctomycetota	Phycisphaeraceae (G)	0.42		40	Proteobacteria	Caulobacteraceae (F)	1.84
	21	Planctomycetota	Phycisphaeraceae (G)	0.41		48	Proteobacteria	Caulobacteraceae (F)	1.81
	55	Actinobacteriota	Sporichthyaceae (F)	0.39		56	Proteobacteria	Nitrosomonadaceae (F)	1.75
	54	Actinobacteriota	Sporichthyaceae (F)	0.37		59	Proteobacteria	Sutterellaceae (F)	1.73
C	44	Proteobacteria	Rhodoferrax (G)	4.50	G	23	Proteobacteria	Silanimonas (G)	5.47
	52	Proteobacteria	Rhodoferrax (G)	4.08		24	Proteobacteria	Silanimonas (G)	4.75
	7	Bacteroidota	Microscillaceae (F)	2.69		7	Bacteroidota	Microscillaceae (F)	2.84
	9	Bacteroidota	Microscillaceae (F)	2.59		9	Bacteroidota	Microscillaceae (F)	2.52
	146	Proteobacteria	Sulfuricella (G)	1.80		30	Proteobacteria	Phenylobacterium (G)	1.80
	162	Proteobacteria	Sulfuricella (G)	1.60		26	Proteobacteria	Alphaproteobacteria (C)	1.74
	212	Actinobacteriota	Sporichthyaceae (F)	1.30		41	Proteobacteria	Phenylobacterium (G)	1.64
	31	Proteobacteria	Roseomonas (G)	1.26		32	Proteobacteria	Alphaproteobacteria (C)	1.60
	27	Proteobacteria	Roseomonas (G)	1.24		27	Proteobacteria	Roseomonas (G)	1.44
	33	Proteobacteria	Roseomonas (G)	1.23		82	Proteobacteria	Roseomonas (G)	1.37

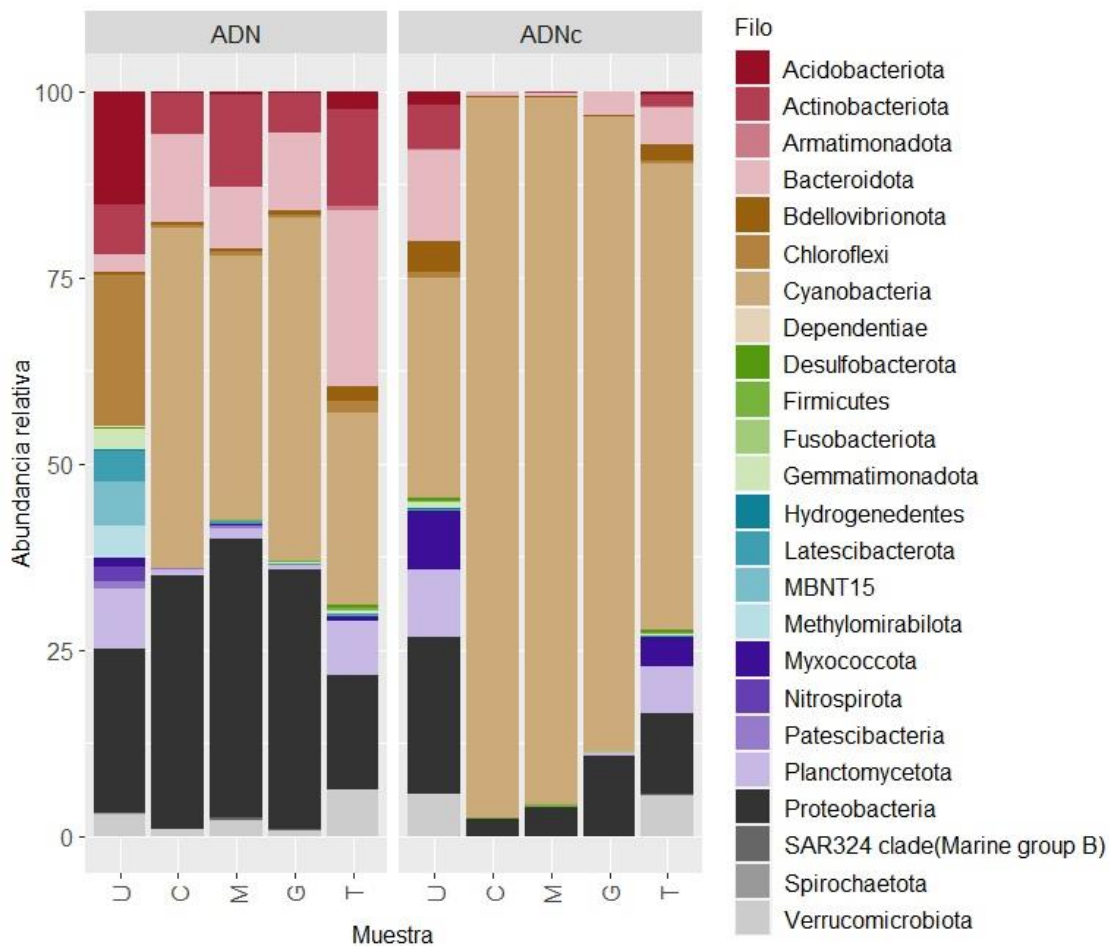
GE_ADNc					GE_ADNc				
	ASV	Filo	Nivel mayor alcanzado	%		ASV	Filo	Nivel mayor alcanzado	%
U	6	Cyanobacteria	Pseudanabaena (G)	5.12	M	4	Cyanobacteria	Pseudanabaena (G)	5.24
	4	Cyanobacteria	Pseudanabaena (G)	5.06		60	Proteobacteria	Nitrosomonadaceae (F)	4.69
	18	Planctomycetota	Phycisphaeraceae (G)	2.35		6	Cyanobacteria	Pseudanabaena (G)	4.45
	21	Planctomycetota	Phycisphaeraceae (G)	2.20		26	Proteobacteria	Alphaproteobacteria (C)	4.26
	114	Chloroflexi	Chloroflexi	2.05		67	Proteobacteria	Nitrosomonadaceae (F)	3.90
	133	Chloroflexi	Chloroflexi	1.78		7	Bacteroidota	Microscillaceae (F)	3.69
	40	Proteobacteria	Caulobacteraceae (F)	1.67		9	Bacteroidota	Microscillaceae (F)	3.53
	12	Cyanobacteria	Cyanobium (G)	1.64		25	Proteobacteria	Curvibacter (G)	3.24
	285	Proteobacteria	Rhizobiales (O)	1.57		32	Proteobacteria	Alphaproteobacteria (C)	3.00
	387	Proteobacteria	Rhizobiales (O)	1.56		68	Gemmatimonadota	Gemmatimonadaceae (F)	2.92
C	7	Bacteroidota	Microscillaceae (F)	5.92	G	702	Cyanobacteria	Pseudanabaena (G)	12.99
	9	Bacteroidota	Microscillaceae (F)	5.81		687	Cyanobacteria	Pseudanabaena (G)	12.71
	18	Planctomycetota	Phycisphaeraceae (G)	5.66		233	Proteobacteria	Alphaproteobacteria (C)	4.31
	39	Proteobacteria	Sutterellaceae (F)	5.57		209	Proteobacteria	Nitrosomonadaceae (F)	3.87
	49	Proteobacteria	Sutterellaceae (F)	5.29		195	Proteobacteria	Nitrosomonadaceae (F)	3.61
	21	Planctomycetota	Phycisphaeraceae (G)	5.21		192	Proteobacteria	Alphaproteobacteria (C)	3.55
	4	Cyanobacteria	Pseudanabaena (G)	4.82		171	Cyanobacteria	Pseudanabaena (G)	3.16
	6	Cyanobacteria	Pseudanabaena (G)	4.22		141	Proteobacteria	Curvibacter (G)	2.61
	57	Proteobacteria	Sutterellaceae (F)	2.95		136	Gemmatimonadota	Gemmatimonadaceae (F)	2.52
	59	Proteobacteria	Sutterellaceae (F)	2.30		135	Bacteroidota	Microscillaceae (F)	2.50

Estructura y actividad en el sitio Itapebí

A diferencia de lo observado para Gualeguaycito, en este sitio *Microcystis* no fue la cianobacteria dominante ni la más activa (excepto en la fracción G), por lo que el análisis de la microbiota de las cianobacterias no estuvo asociado a la hipótesis principal de este trabajo. Sin embargo, dado que se encontró otro grupo dominante de cianobacterias potencialmente tóxicas, *Dolichospermum*, se evaluó tanto la estructura como la actividad de estas comunidades en relación a lo encontrado en el sitio Gualeguaycito.

Al igual que lo observado en Gualeguaycito, las Proteobacteria aumentaron su abundancia de la fracción U a la G (22 a 50%) (**Fig. 9**). En relación a la actividad, este filo también presentó un patrón similar al visto en Gualeguaycito cuando se incluyó al CMA en el análisis. A nivel de clase (**Fig. 10A**), Alfa y Beta presentaron su mayor abundancia en la fracción G, mientras que Gamma tuvo su mayor expresión en la M. En comparación con Gualeguaycito, las Gamma aumentaron su abundancia en todas las fracciones, las Beta disminuyeron su abundancia en las fracciones C y M, las Alfa también disminuyeron su abundancia en las fracciones U, M y G. Por otra parte, a nivel de orden aumentó la presencia de Enterobacterales, Pseudomonadales y Rhizobiales, en detrimento de órdenes como Acetobacterales y Reyranelales. A su vez, también el orden Rhizobiales fue más activo, en detrimento de Reyranelales.

Los Bacteroidetes presentan sus valores mayores de abundancia en las fracciones C y G (13 y 15%) (**Fig. 9**). Pero en términos de actividad, donde presenta mayor actividad es en las fracciones U y G. Comparando con Gualeguaycito, en la fracción U aumentan los órdenes Bacteroidales, Flavobacteriales y Kryptoniales, en detrimento de Chitinophagales y Cytophagales; en las fracciones C y M aumentan el orden Chitinophagales, y en la G aumenta el orden Cytophagales. En cuanto a la actividad, se ve el mismo cambio visto para la abundancia en las fracciones C, M y G (**Fig. 10B**).



Figura

9. Abundancia relativa a nivel de filios en Itapebí, de la comunidad total (ADN) y la fracción activa (ADNc). U: Unicelular, C: Chica, M: Mediana, G: Grande y T: Total.

La abundancia de las Cyanobacteria (**Fig. 9**) es en general mayor que en Gualeguaycito, llegando a valores máximos en las fracciones C y G (46%), al que le sigue la fracción M (35%), mientras que en la fracción U están ausentes. A su vez, al igual que en Gualeguaycito las Cyanobacteria son quienes están más activas (**Fig. 9**). El orden de Cyanobacteria que domina en las fracciones C, M y G es el orden Cyanobacteriales, en las fracciones C y M se da debido al género *Dolichospermum* (39 y 23% respectivamente), mientras que en la fracción G se da debido al género *Microcystis* (30%) (**Fig. 10C**). Este patrón fue igual al visto para la actividad, con la diferencia de que sí se observan Cyanobacteria activas en la fracción U que corresponden en su mayoría al orden Synechococcales (género *Cyanobium*).

Por otro lado, al igual que en Gualeguaycito, en la fracción U es donde hay mayor actividad de la mayoría de las bacterias heterótrofas (Bacteroidetes,

Acidobacterias, Actinobacteria, Chloroflexi, Gemmatimonadota, Myxococcota, Planctomycetes y Verrucomicrobia) (**Fig. 9**).

Los hallazgos en relación a las cianobacterias y a su microbiota en Itapebí fueron inesperados y dan cuenta de las diferencias ambientales entre ambos sitios, que se reflejan en la dominancia de distintas cianobacterias y un diferente funcionamiento de las comunidades bacterianas asociadas.

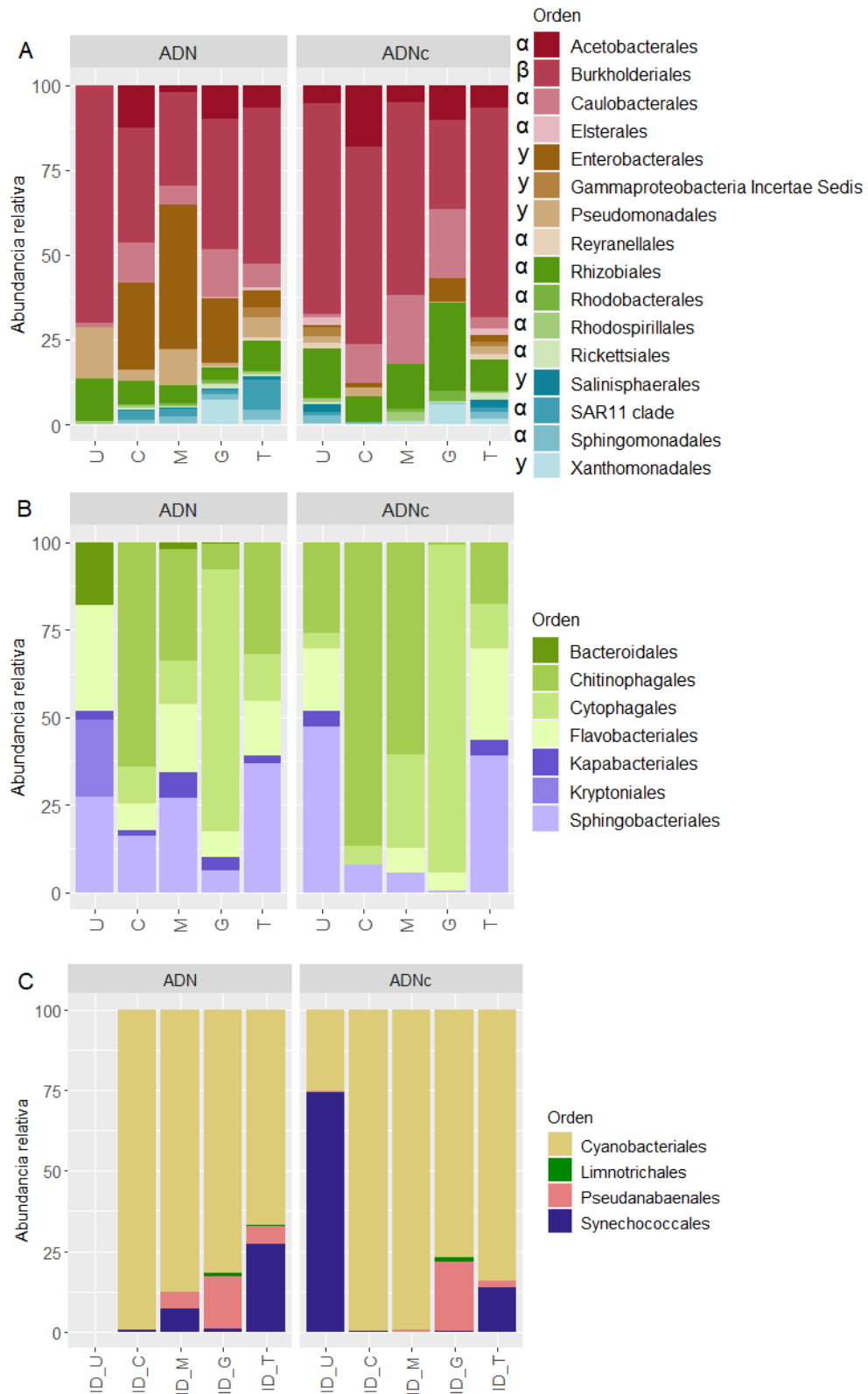


Figura 10. Abundancia relativa a nivel de órdenes en Itapebí, de la comunidad total (ADN) y la fracción activa (ADNc). **(A)** Proteobacteria. **(B)** Bacteroidetes. **(C)** Cianobacteria. U: Unicelular, C: Chica, M: Mediana, G: Grande y T: Total.

Discusión

En este trabajo fue posible estudiar tanto la estructura como la actividad de la microbiota asociada al CMA en diferentes fracciones de tamaño colonial. Al momento existen pocos estudios metagenómicos en relación a la composición de la comunidad asociada al CMA (Wang et al., 2015; Guedes et al., 2018; Cook et al., 2019; Wu et al., 2019; Pérez-Carrascal et al., 2021) y ninguno de ellos se centra en la relación del tamaño colonial con la estructura y actividad de la microbiota.

Se observó en primer lugar que la estructura comunitaria de la microbiota asociada al CMA varía de acuerdo al tamaño de las colonias. Esto pone de manifiesto que para entender la dinámica de las floraciones no es suficiente trabajar con muestras totales (fracción T), como lo hacen la mayoría de los estudios reportados.

De acuerdo con lo descrito por Guedes et al., 2018, los resultados mostraron que el filo más abundante en Gualaguaycito en las 4 fracciones fue Proteobacteria seguido de Bacteroidetes y Cianobacteria. Al aumentar el tamaño de colonia las Proteobacteria también lo hacen, principalmente debido a la contribución de la clase Alfa, mientras que disminuyen los Bacteroidetes (excepto fracción M) y las Cianobacteria, resultado que coincide con Wu et al. (2019). En consonancia con lo observado *in situ* pero sin embargo no reportado hasta el momento, el filo más activo fue Cianobacteria con la principal contribución del género *Microcystis*, el que aumentó su actividad con el aumento del tamaño de la colonia. El aumento de actividad que acompañó al aumento en el número de células que tiene una colonia refleja probablemente que la cianobacteria se encontraba en una fase exponencial de crecimiento. Este sitio fue además el que presentó mayor concentración de microcistinas, siendo las fracciones M y G las más tóxicas (Deus, 2018), sugiriendo que el crecimiento de *Microcystis* se acompaña de la producción de toxinas (Martínez de la Escalera, 2020).

En el caso del sitio de Itapebí no fue el CMA el grupo dominante de cianobacterias, ni tampoco las más activas (excepto en la fracción G). Aquí fueron las cianobacterias del género *Dolichospermum* las que dominaron. Estos resultados, si bien no esperados, resultan especialmente interesantes ya que sugieren que el embalse es también un reservorio de otras cianobacterias potencialmente tóxicas (Li et al., 2016) que, en un contexto de eutrofización como el actual, pueden volverse un problema ambiental y de salud en el mediano-largo plazo.

En general, en la fracción menor (U) es donde se observó una mayor diferencia en la estructura comunitaria bacteriana y donde se encontraba más activa la mayoría de la microbiota. Una posible explicación a este fenómeno es que esta fracción podría tener miembros del bacterioplancton (vida libre) no asociados a las colonias de *Microcystis*, algunos de los cuales serían “reclutados” para formar parte de la microbiota de las colonias en formación.

Uno de los hallazgos más interesantes de este trabajo fue la disminución de diversidad y actividad bacteriana a medida que aumentaba el tamaño de colonia, ya que sugiere que los cambios que sufre la microbiota a medida que el CMA aumenta su biomasa son debidos a la proliferación de ciertos organismos que serían “seleccionados” por ciertas características bióticas y/o abióticas presentes en la ficósfera. Resultados similares fueron reportados por Jankowiak et al. (2020), quienes vieron que la diversidad se relacionaba de forma inversa con la abundancia de cianobacterias en la floración. Este vínculo estrecho entre la microbiota y la formación de las colonias se asemeja a un mecanismo de formación de *biofilms* multiespecífico, en el que las colonias grandes constituyen la etapa final de maduración del *biofilm*, previa a la dispersión para comenzar un nuevo ciclo de formación.

Según algunos estudios (Pérez-Carrascal et al., 2021; Cook et al., 2019) la microbiota presenta funciones complementarias a *Microcystis*, las que pueden estar codificadas por una variedad de especies, por lo que no es posible establecer un *core* de microorganismos a nivel de género o especie. En este sentido, determinar si existen diferencias en la composición de la microbiota entre las distintas fracciones de tamaño permitiría relacionarlas con la evolución morfológica y funcional que sufre *Microcystis* durante el crecimiento en la floración. Entre las propiedades que se pueden medir y evaluar se encuentra por ejemplo el aumento del grosor del mucílago y el cambio en la composición de los polisacáridos, así como también la variación de los pigmentos fotosintéticos que se traducen en distintas actividades fotosintéticas o protección UV (Wu et al., 2019) para evaluar cómo estos cambios afectan a su microbiota asociada. En este sentido por ejemplo el aumento de exopolisacáridos conforme aumenta el tamaño colonial y el grosor del mucílago favorece la abundancia de bacterias capaces de degradarlos, es decir que tengan actividad enzimática extracelular (Wu et al., 2019). Se ha reportado que la mayoría de las bacterias heterótrofas, ej.: Verrucomicrobia (Guedes et al., 2018), Alfaproteobacteria (Wu et al., 2019), Bacteroidetes (Wu et al., 2019; Cai et al., 2014) son capaces de degradar de

forma extracelular a los compuestos que expulsa el CMA y que forman parte de su mucílago, mientras que algunas cepas del filo Planctomycetes son capaces de internalizar complejos polisacáridos y degradarlos de forma intracelular (Kallscheuer et al., 2021). Incluso, algunos Bacteroidetes son capaces de degradar a las propias Cianobacteria (Dai et al., 2022), así como organismos del filo Bdelovibrionota son predadores obligados (Cai et al., 2014) y algunas Alfabroteobacteria o Gammaproteobacteria son capaces de degradar microcistina (pero que en este trabajo no se encontraron) (Massey et al., 2020). Otras bacterias como Roseomonas (Alfabroteobacteria) podrían enriquecer el repertorio metabólico de *Microcystis* al codificar por ejemplo para la biosíntesis de carotenoides complementarios a aquellos encontrados en *Microcystis*, de esta forma podrían proveer a la cianobacteria con fotoprotección adicional bajo determinadas condiciones (como antioxidantes) o ampliar el espectro de absorción de luz (Pérez-Carrascal et al., 2021). De estos grupos ya estudiados, en este trabajo se detectó a su mayoría, exceptuando a aquellos que se han descrito como degradadores de microcistina (ej.: Sphingomonas, Stenotrophomonas).

Microcystis comparte varias características con bacterias formadoras de *biofilms*, entre ellas se encuentra: i) el cambio de vida unicelular a multicelular rodeadas de una matriz de exopolisacáridos (EPS) de composición similar a aquella encontrada en los biofilms; ii) la presencia dentro de esa matriz de una diversidad de bacterias heterótrofas que se han relacionado con la formación de las colonias y que viven de forma cooperativa con *Microcystis*; iii) la transición a la forma multicelular se sugiere que ocurre por moléculas autoinducidas (AHLs) que pueden ser sintetizadas tanto por la cianobacteria como por las bacterias heterótrofas. De esta forma, la formación de colonias podría ser análoga a la de un biofilm flotante (dado que no se adhiere a una superficie) compuesto por varias especies procariontas que permite que el organismo resultante prospere bajo una gran diversidad de condiciones ambientales (Piccini et al., 2022).

Este trabajo es el primero en evaluar la estructura comunitaria de la microbiota del CMA y su actividad bajo el supuesto de que se trata de un biofilm multiespecífico. No obstante, deben realizarse más estudios (morfológicos, metabólicos, interactómicos) para confirmar esta hipótesis, ya que el abordaje empleado tiene algunas debilidades derivadas de los supuestos empleados, como por ejemplo que la abundancia de ARN ribosomal es efectivamente un proxy de la actividad celular

(Blazewicz et al., 2013). Es por ello que proponemos continuar con este estudio a través de una tesis doctoral en la que se intentará confirmar la naturaleza de biofilm de las colonias mediante distintos abordajes.

Perspectivas

Puesto que el 99% de los microorganismos en un ambiente no son cultivables (si bien depende de qué ambiente, y qué tan bien este ha sido estudiado), las técnicas de secuenciación del ADN ribosomal 16S supusieron un gran avance metodológico y del conocimiento acerca de la diversidad real que hay en comunidades de microorganismos en muestras ambientales (Valenzuela-Gonzalez et al., 2015). Pero, como toda técnica tiene sus limitaciones, dado que en general se hace uso de una secuencia parcial del gen y esto conlleva tanto a subestimaciones como sobreestimaciones de la diversidad de una muestra (Valenzuela-Gonzalez et al., 2015). En el primer caso debido a que algunas secuencias no logran alinearse con secuencias de referencia (además de que no en todos los casos llega a una resolución a nivel de especie) y en el segundo caso debido a que muchas de las secuencias obtenidas de la comunidad sean de bacterias latentes o muertas y que sean menos las que realmente están en crecimiento activo. También el proceso de PCR presenta limitaciones, ya que siempre se amplifica más lo más abundante, y se desprecian las poblaciones minoritarias, además que si bien se usan cebadores universales puede ocurrir que haya organismos en los que no puede hibridarse. Incluso, depende de la base de datos contra la cual se realice la comparación de secuencia y asignación taxonómica (Valenzuela-Gonzalez et al., 2015). En cuanto a la diferencia que hay en el número de copias de este gen entre organismos, hay estudios en los que han concluido que no es necesario normalizar, puesto que esta no cambia los resultados (Starke et al., 2021).

Por otro lado, la poca información que hay respecto a la importancia de la microbiota en el crecimiento y la supervivencia de las cianobacterias hace que el siguiente objetivo sea entender mejor las interacciones entre ellos. Dado que el estudio de las diferencias de la composición microbiana asociada a cianobacterias con el foco en la taxonomía puede resultar poco informativo, el siguiente paso sería realizar un estudio a nivel funcional. Esto podría realizarse infiriendo según quién está presente (información brindada a partir de la secuenciación del ADNr 16S), pero

debido a lo anteriormente comentado y para que sea más certero se podría en su lugar utilizar la técnica de metagenómica shotgun o transcriptómica. La metagenómica permite conocer la información genómica de organismos cultivables y no cultivables así como tener una idea del potencial funcional que tiene la comunidad en su conjunto, pudiendo incluso ensamblar genomas de los metagenomas. La transcriptómica nos permite, además de identificar el origen taxonómico de los transcritos, acercarnos más a quiénes se encuentran activos y qué función se encuentran realizando.

Dado que nuestra hipótesis de trabajo es que las colonias de *Microcystis* son un *biofilm* multiespecífico y que cada integrante del mismo aporta a que el organismo en su totalidad (cianobacteria y bacterias heterótrofas) sea exitoso, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Determinar mediante transcriptómica las funciones de la microbiota asociada al mucílago en relación al tamaño de las colonias de organismos del CMA y a la presencia de microcistinas, a su vez que estudiar posibles interacciones CMA-microbiota.
2. Evaluar cómo ocurre la formación del biofilm a nivel morfológico para dilucidar la importancia de la microbiota (aproximación mediante microscopía).

En cuanto al primer objetivo, se pretende hacer un estudio integral de las distintas fracciones de tamaño. A partir de una muestra ambiental de un ecosistema dulceacuícola (ej. Salto Grande o Río Negro) donde haya una floración del CMA y que por tanto se observen colonias a simple vista (pero sin llegar a formar espuma para evitar colonias que se estén disgregando en etapa final de *biofilm*), se separarán colonias que correspondan a las 4 fracciones de tamaño aquí trabajadas mediante una metodología utilizando microscopio óptico y pipeta Pasteur (Pérez-Carrascal et al., 2021; Moreira et al., 2022; Lv et al., 2022). De esta forma contaremos con 4 eppendorf que contengan: la fracción U (células individuales y en división), C (colonias de unas pocas células y poco mucílago), M (colonias medianas, con más células y más mucílago) y G (colonias grandes, con muchas células y un gran mucílago).

A partir de dichas fracciones se llevarán a cabo las siguientes actividades:

- Extracción de ADN y ARN comunitario de cada tamaño colonial (este trabajo).

- Conteo de la cantidad de colonias que hay por muestra mediante microscopía de luz, así como la cantidad de células por colonia y el tamaño del mucílago (tinción con tinta china; Komárková et al., 2005).
- Realizar qPCR del *mcyJ* para cuantificar el N° de células tóxicas de *Microcystis* (copias/ml) (Martínez de la Escalera et al., 2017).
- Análisis de la estructura comunitaria mediante secuenciación masiva del gen que codifica para el ARNr 16S (este trabajo).
- Secuenciación de ARNm de cada tamaño colonial.
- Ensayo de la técnica loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ya puesta a punto en nuestro grupo para la detección del CMA tóxico, con el objetivo de determinar si existe inhibición debida al aumento del mucílago conforme aumenta el tamaño de la colonia de *Microcystis*. Esta actividad se conecta con el proyecto FMV_1_2021_1_166354 que tiene como objetivo emplear todo el conocimiento generado acerca de la ecología y biología del CMA para desarrollar una herramienta de monitoreo rápida, sensible y sencilla de implementar.

A través de la transcriptómica se buscaría conocer la abundancia de transcritos relacionados a vías metabólicas que involucran carbono (actividad enzimática, ej.: glucosidasas, peptidasas, fosfatasas), degradación de microcistina (para ver si esta es la forma de sobrevivir a altas concentraciones de las bacterias), estrés oxidativo (degradación de ROS). En definitiva, funciones que den cuenta de la importancia de la comunidad heterótrofa para el crecimiento, supervivencia y éxito de *Microcystis*. A su vez, se podría determinar si pese a la diversidad filogenética observada (con el análisis de 16S), hay una conservación de la funcionalidad entre distintos eventos de floraciones o dentro de la misma pero evaluando las distintas fracciones de tamaño, como se ha descrito en Jankowiak et al., 2020 y Steffen et al., 2012 (vieron diferencias taxonómicas entre lagos, pero conservación de las funciones), Cook et al., 2019 (la composición y más aún la función potencial de la microbiota de *Microcystis* se conserva sin importar su ubicación geográfica).

En cuanto al segundo objetivo, con el fin de evaluar el efecto de la microbiota en la formación de las colonias (biofilm) y ver su progresión, realizaremos ensayos controlados con cultivo en el laboratorio (Shen et al., 2011). Para esto, utilizaremos una muestra de un cultivo axénico de la cepa tóxica de *Microcystis aeruginosa* NIES-

843 (se encuentra ya en nuestro cepario), la que será incubada dentro de un dispositivo apto para su observación al microscopio desarrollado por el Laboratorio de Biofilms del Departamento de Microbiología del IIBCE (Scavone et al., 2016). Este dispositivo alberga unos pocos ml, contiene un orificio de entrada y otro de salida con lo que se puede realizar un cultivo continuo de pequeña escala. Una de las grandes ventajas de esta herramienta es el tamaño ideal para poder observar conforme pasa el tiempo la formación de colonias en un microscopio confocal, al usar la propia fluorescencia de la clorofila de las cianobacterias y añadir un colorante que tiñe las bacterias o el mucílago. Con este sistema nos planteamos distintas condiciones (**Fig. 11**): 1) cultivo axénico con BG11 (control); 2) mezcla del cultivo axénico con agua de río filtrada (malla de 20 μm) de forma que únicamente contenga bacterias heterótrofas; 3) mezcla del cultivo axénico con bacterias obtenidas del mucílago de una colonia mediana; 4) mezcla del cultivo axénico con colonias pequeñas obtenidas en el objetivo 1 (4-20 μm).

Para la incubación con bacterias aisladas del mucílago, una fracción de las colonias medianas utilizadas para llevar a cabo el objetivo 1, serán lavadas con agua desionizada estéril para disolver el mucílago seguido de centrifugación, protocolo según Shen et al. (2011).

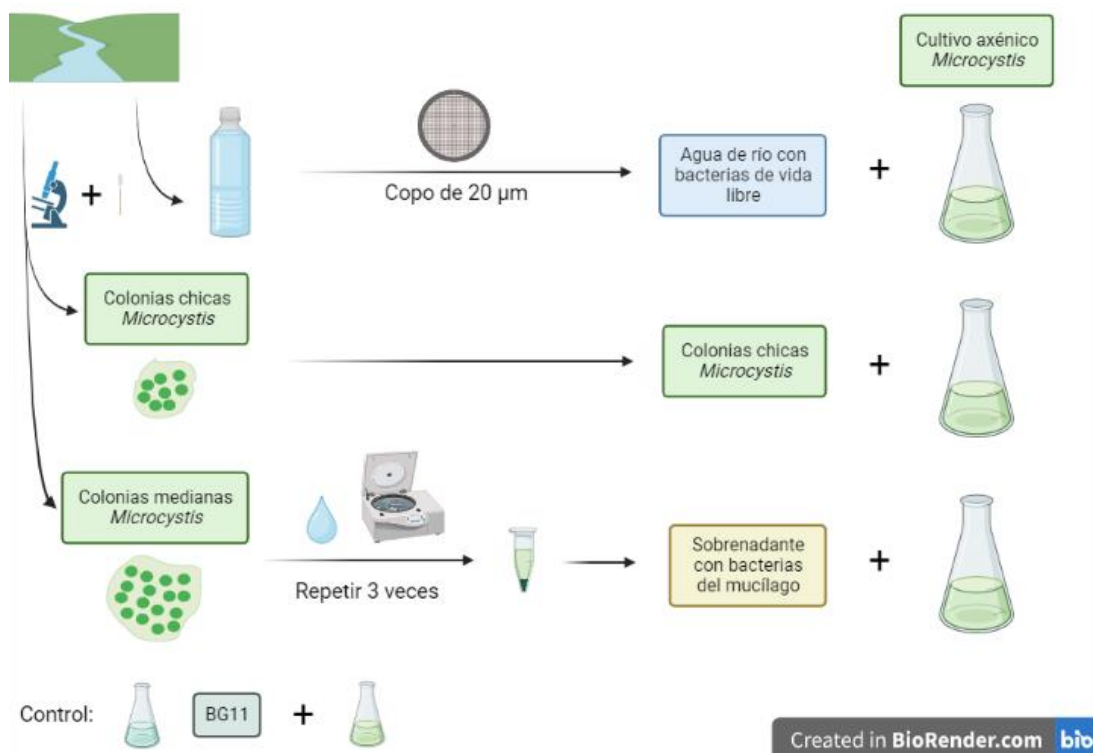


Figura 11. Esquema de lo que se realizará para estudiar el objetivo 2.

Bibliografía

- Alvarenga, D. O., Fiore, M. F. & Varani, A. M. (2017). A Metagenomic Approach to Cyanobacterial Genomics. *Frontiers in Microbiology*, 8. doi:10.3389/fmicb.2017.00809.
- Armitano, J., Méjean, V. & Jourlin-Castelli, C. (2014). Gram-negative bacteria can also form pellicles. *Environmental Microbiology Reports*, 6(6), 534–544. doi:10.1111/1758-2229.12171
- Barken, K. B., Pamp, S. J., Yang, L., Gjermansen, M., Bertrand, J. J., Klausen, M., Givskov, M., Whitchurch, C.B., Engel, J.N. & Tolker-Nielsen, T. (2008). Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental Microbiology*, 10(9), 2331–2343. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01658.x
- Bell, W. & Mitchell, R. (1972). Chemotactic and growth responses of marine bacteria to algal extracellular products. *The Biological Bulletin*, 143(2), 265-277. doi:10.2307/1540052
- Bi, X. D., Zhang, S. L., Dai, W., Xing, K. Z. & Yang, F. (2013). Effects of lead (II) on the extracellular polysaccharide (EPS) production and colony formation of cultured *Microcystis aeruginosa*. *Water Science and Technology*, 67(4), 803-809. doi: 10.2166/wst.2012.632
- Blazewicz, S. J., Barnard, R. L., Daly, R. A. & Firestone, M. K. (2013). Evaluating rRNA as an indicator of microbial activity in environmental communities: limitations and uses. *The ISME journal*, 7(11), 2061-2068. doi: 10.1038/ismej.2013.102
- Bonilla, S. (ed.). (2009). Cianobacterias Planctónicas del Uruguay. Manual para la identificación y medidas de gestión. P. in.: *PHI-VII Documento Técnico N 16*, UNESCO, Montevideo, 94 pp.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H. & Stahl, D. A. (2015). *Brock Biology of Microorganisms*. (14^a edición). Pearson.
- Cai, H., Jiang, H., Krumholz, L. R. & Yang, Z. (2014) Bacterial Community Composition of Size-Fractionated Aggregates within the Phycosphere of Cyanobacterial Blooms in a Eutrophic Freshwater Lake. *PLoS ONE* 9(8): e102879. doi:10.1371/journal.pone.0102879

Callahan, B. J., Sankaran, K., Fukuyama, J. A., McMurdie, P. J. & Holmes, S. P. (2017). Workflow for Microbiome Data Analysis: from raw reads to community analyses.

<https://bioconductor.org/help/course-materials/2017/BioC2017/Day1/Workshops/Microbiome/MicrobiomeWorkflowII.html>

CARP- SHIN- SOHMA. (1990). Estudio para la evaluación de la contaminación en el Río de la Plata. Informe de avance 1989. 422 p. 2 vols, texto: 422 p.

Castro-Nallar, E., Gutzwiller, F. & Mendez, K. N. (2019). Introducción a phyloseq y a análisis de diversidad. <http://www.castrolab.org/isme/biodiversity/biodiversity.html>

Connon, S. A. & Giovannoni, S. J. (2002). High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Applied and environmental microbiology*, 68(8), 3878-3885. doi: 10.1128/AEM.68.8.3878–3885.2002

Cook, K. V., Li, C., Cai, H., Krumholz, L. R., Hambright, K. D., Paerl, H. W., Steffen, M., Wilson, A. E., Burford, M. A., Grossart, H. P., Hamilton, D. P., Jiang, H., Sukenik, A., Latour, D., Meyer, E. I., Padisák, J., Qin, B., Zamor, R. M. & Zhu, G. (2019). The global *Microcystis* interactome. *Limnology and Oceanography*. doi:10.1002/lno.11361.

Deus, S. A. (2018). Caracterización morfológica, genética y óptica de floraciones tóxicas y no tóxicas del complejo *Microcystis aeruginosa*. Tesis de Doctorado, área Biología, PEDECIBA.

Deus, S. A., Kruk, C., de la Escalera, G. M., Montes, M. A., Segura, A. M. & Piccini, C. (2020). Morphology captures toxicity in *Microcystis aeruginosa* complex: Evidence from a wide environmental gradient☆. *Harmful algae*, 97, 101854. doi:10.1016/j.hal.2020.101854

Dill-McFarland, K. (19 de diciembre de 2017). Microbiota Analysis in R. Rpubs. http://rpubs.com/dillmcfarlan/R_microbiotaSOP

Feola, G., Brena, B., Risso, J., Sienra, D. & Echezarreta, M. E. (2008). Programa de monitoreo de agua de playas y costa de Montevideo. Informe temporada: 2007-2008.

Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A. & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563-575. doi:10.1038/nrmicro.2016.94

Guedes I. A., Rachid C. T. C. C., Rangel L. M., Silva L. H. S., Bisch P. M., Azevedo S. M. F. O. & Pacheco A. B. F. (2018). Close Link Between Harmful Cyanobacterial Dominance and Associated Bacterioplankton in a Tropical Eutrophic Reservoir. *Front. Microbiol.* 9:424. doi: 10.3389/fmicb.2018.00424

Herrera, N. & Echeverri, F. (2021). Evidence of Quorum Sensing in Cyanobacteria by Homoserine Lactones: The Origin of Blooms. *Water*, 13(13), 1831. doi:10.3390/w13131831

Hoffman, L. R., D'Argenio, D. A., MacCoss, M. J., Zhang, Z., Jones, R. A. & Miller, S. I. (2005). Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature*, 436(7054), 1171–1175. doi:10.1038/nature03912

Huisman, J. & Hulot, F. D. (2005). Population Dynamics of Harmful Cyanobacteria. *Aquatic Ecology Series*, 143–176. doi:10.1007/1-4020-3022-3_7

Huisman, J. & Hulot, F.D. (2005). Population Dynamics of Harmful Cyanobacteria. In: Huisman, J., Matthijs, H.C., Visser, P.M. (2005) *Harmful Cyanobacteria*. *Aquatic Ecology Series*, vol 3. Springer, Dordrecht. doi:10.1007/1-4020-3022-3_7

Huisman, J., Codd, G. A., Paerl, H. W., Ibelings, B. W., Verspagen, J. M. H. & Visser, P. M. (2018). Cyanobacterial blooms. *Nature Reviews Microbiology*, 16(8), 471–483. doi:10.1038/s41579-018-0040-1

Jankowiak, J. G. & Gobler, C. J. (2020) The Composition and Function of Microbiomes Within *Microcystis* Colonies Are Significantly Different Than Native Bacterial Assemblages in Two North American Lakes. *Front. Microbiol.* 11:1016. doi: 10.3389/fmicb.2020.01016

Kallscheuer, N. & Jogler, C. (2021). The bacterial phylum Planctomycetes as novel source for bioactive small molecules. *Biotechnol. Adv.* 53, 107818 doi: 10.1016/j.biotechadv.2021.107818.

Kambura, A. K., Mwirichia, R. K., Kasili, R. W., Karanja, E. N., Makonde, H. M. & Boga, H. I. (2016). Bacteria and Archaea diversity within the hot springs of Lake Magadi and Little Magadi in Kenya. *BMC Microbiology*, 16(1). doi:10.1186/s12866-016-0748-x

Kehr, J.-C. & Dittmann, E. (2015). Biosynthesis and Function of Extracellular Glycans in Cyanobacteria. *Life*, 5(1), 164–180. doi:10.3390/life5010164.

- Klausen, M., Aaes-Jørgensen, A., Molin, S. & Tolker-Nielsen, T. (2003). Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Molecular Microbiology*, 50(1), 61–68. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03677.x
- Komárková, J., Mugnai, M. A., Sili, C., Komárek, O. & Turicchia, S. (2005). Stable morphospecies within the 16S rRNA monophyletic genus *Microcystis* (Kützing) Kützing. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes*, 279-295.
- Kruk, C., Huszar, V. L., Peeters, E. T., Bonilla, S., Costa, L., Lürling, M., Reynolds, C. S. & Scheffer, M. (2010). A morphological classification capturing functional variation in phytoplankton. *Freshwater biology*, 55(3), 614-627.
- Kruk, C., Segura, A. M., Nogueira, L., Alcántara, I., Calliari, D., Martínez de la Escalera, G., Carballo, C., Cabrera, C., Sarthou, F., Scavone, P. & Piccini, C. (2017). A multilevel trait-based approach to the ecological performance of *Microcystis aeruginosa* complex from headwaters to the ocean. *Harmful Algae*, 70, 23–36. doi:10.1016/j.hal.2017.10.004
- Lei, L.M., Song, L.R., Ou, D.Y. & Han, B.P. (2007). Effects of nutrient conditions on exopolysaccharide production in water-bloom forming Cyanobacteria, *Microcystis aeruginosa*. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 46, 84–87.
- Li, P., Cai, Y., Shi, L., Geng, L., Xing, P., Yu, Y., Kong, F. & Wang, Y. (2009). Microbial Degradation and Preliminary Chemical Characterization of *Microcystis* Exopolysaccharides from a Cyanobacterial Water Bloom of Lake Taihu. *International Review of Hydrobiology*, 94(6), 645–655. doi:10.1002/iroh.200911149
- Li, M., Zhu, W., Gao, L., Huang, J. & Li, N. (2013). Seasonal variations of morphospecies composition and colony size of *Microcystis* in a shallow hypertrophic lake (Lake Taihu, China). *Fresenius Environmental Bulletin*, 22, 3474–3483.
- Li, X., Dreher, T. W., & Li, R. (2016). An overview of diversity, occurrence, genetics and toxin production of bloom-forming *Dolichospermum* (*Anabaena*) species. *Harmful Algae*, 54, 54–68. doi:10.1016/j.hal.2015.10.015
- Lv, X., Cheng, Y., Zhang, S., Hu, Z., Xiao, P., Zhang, H., Geng, R. & Li, R. (2022). Polyphasic Characterization and Taxonomic Evaluation of a Bloom-Forming Strain Morphologically Resembling *Radiocystis fernandoi* (Chroococcales, Cyanobacteria) from Lake Erhai, China. *Diversity*. 14(10):816. doi:10.3390/d14100816

- Maldarelli, G. A., Piepenbrink, K. H., Scott, A. J., Freiberg, J. A., Song, Y., Achermann, Y., Ernst, R.K., Shirliff, M. E., Sundberg, E. J., Sonnenberg, M.S. & von Rosenvinge, E. C. (2016). Type IV pili promote early biofilm formation by *Clostridium difficile*. *Pathogens and Disease*, 74(6). doi:10.1093/femspd/ftw061
- Martínez de La Escalera, G., Antoniades, D., Bonilla, S. & Piccini, C. (2014). Application of ancient DNA to the reconstruction of past microbial assemblages and for the detection of toxic cyanobacteria in subtropical freshwater ecosystems. *Molecular Ecology*, 23(23), 5791-5802. doi:10.1111/mec.12979
- Martínez de la Escalera, G. M., Kruk, C., Segura, A. M., Nogueira, L., Alcántara, I. & Piccini, C. (2017). Dynamics of toxic genotypes of *Microcystis aeruginosa* complex (MAC) through a wide freshwater to marine environmental gradient. *Harmful Algae*, 62, 73-83.
- Martínez de la Escalera, G. (2019). Dinámica y condicionantes ambientales de genotipos tóxicos del complejo *Microcystis aeruginosa* en el Río Uruguay y Río de la Plata. Tesis de Doctorado, área Biología, PEDECIBA.
- Massey, I. Y. & Yang, F. (2020). A Mini Review on Microcystins and Bacterial Degradation. *Toxins*, 12(4), 268. doi:10.3390/toxins12040268
- Mattick, J. S. (2002). Type IV Pili and Twitching Motility. *Annual Review of Microbiology*, 56(1), 289–314. doi:10.1146/annurev.micro.56.012302.160938
- Moreira, C., Matos, A., Barreiro, A., Gomes, C., Vasconcelos, V. & Antunes, A. (2022). Statistical Inferences Applying Non-Parametric Data on Cyanobacterial Investigations: Contributions to Water Quality and New Trends under Global Changes on Portuguese Freshwater Ecosystems. *Toxins*. 14(9):638. doi:10.3390/toxins14090638
- Morris, J. J., Lenski, R. E. & Zinser, E. R. (2012). The Black Queen Hypothesis: evolution of dependencies through adaptive gene loss. *MBio*, 3(2), e00036-12 doi:10.1128/mbio.00036-12
- Nakasugi, K. & Neilan, B. A. (2005). Identification of Pilus-Like Structures and Genes in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 7621–7625. doi:10.1128/aem.71.11.7621-7625.2005
- Otsuka, S., Suda, S., Li, R., Watanabe, M., Oyaizu, H., Matsumoto, S. & Watanabe, A. M. M. (1999). Characterization of morphospecies and strains of the genus *Microcystis*

(Cyanobacteria) for a reconsideration of species classification. *Phycological Research*, 47(3), 189-197. doi:10.1046/j.1440-1835.1999.00162.x

Otsuka, S., Suda, S., Shibata, S., Oyaizu, H., Matsumoto, S. & Watanabe, M. M. (2001). A proposal for the unification of five species of the cyanobacterial genus *Microcystis* Kützinger ex Lemmermann 1907 under the Rules of the Bacteriological Code. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(3), 873–879. doi:10.1099/00207713-51-3-873

Paerl, H. W. & Huisman, J. (2008). CLIMATE: Blooms Like It Hot. *Science*, 320(5872), 57–58. doi:10.1126/science.1155398

Paerl, H. (2014). Mitigating Harmful Cyanobacterial Blooms in a Human- and Climatically-Impacted World. *Life*, 4(4), 988–1012. doi:10.3390/life4040988

Pérez-Carrascal, O. M., Tromas, N., Terrat, Y., Moreno, E., Giani, A., Marques, L. C. B., Fortin, N. & Shapiro, B. J. (2021). Single-colony sequencing reveals microbe-by-microbiome phyllosymbiosis between the cyanobacterium *Microcystis* and its associated bacteria. *Microbiome* 9, 194. doi:10.1186/s40168-021-01140-8.

Piccini, C., Segura, A. M., de la Escalera, G. M., Croci, C. & Kruk, C. (2022). *Microcystis* colonies as multispecific biofilms living at the water-air interface. En revisión en revista mBio.

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J. & Glöckner, F.O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucl. Acids Res.* 41 (D1): D590-D596.

R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Sato, M., Amano, Y., Machida, M. & Imazeki, F. (2017). Colony formation of highly dispersed *Microcystis aeruginosa* by controlling extracellular polysaccharides and calcium ion concentrations in aquatic solution. *Limnology*, 18(1), 111-119. doi:10.1007/s10201-016-0494-7

Scavone, P., Iribarnegaray, V., Caetano, A. L., Schlapp, G., Härtel, S. & Zunino, P. (2016). Fimbriae have distinguishable roles in *Proteus mirabilis* biofilm formation. *Pathogens and disease*, 74(5). doi: 10.1093/femspd/ftw033

- Seymour, J. R., Amin, S. A., Raina, J. B. & Stocker, R. (2017). Zooming in on the phycosphere: the ecological interface for phytoplankton–bacteria relationships. *Nat. Microbiol.* 2, 17065. doi: 10.1038/nmicrobiol.2017.65
- Shi, L., Cai, Y., Gao, S., Fang, D., Lu, Y., Li, P. & Wu, Q. L. (2022) Gene expression in the microbial consortia of colonial *Microcystis aeruginosa*-a potential buoyant particulate biofilm. *Environmental Microbiology*, 24(10), 4931– 4945. doi:10.1111/1462-2920.16133
- Šmarda, J. & Maršálek, B., 2008. *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria): Ultrastructure in a pelagic and in a benthic ecosystem. *Arch. Hydrobiol. Suppl. Algal. Stud.* 126, 73–86.
- Staley, J. T. & Konopka, A. (1985). Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annual review of microbiology*, 39(1), 321-346.
- Starke, R., Pylro, V. S. & Morais, D. K. (2021). 16S rRNA Gene Copy Number Normalization Does Not Provide More Reliable Conclusions in Metataxonomic Surveys. *Microbial Ecology*, 81(2), 535–539. doi:10.1007/s00248-020-01586-7
- Steffen, M. M., Li, Z., Effler, T. C., Hauser, L. J., Boyer, G. L. & Wilhelm, S. W. (2012). Comparative Metagenomics of Toxic Freshwater Cyanobacteria Bloom Communities on Two Continents. *PLoS ONE* 7(8): e44002. doi:10.1371/journal.pone.0044002
- Stal, L.J., 2012. Cyanobacterial mats and stromatolites, in: *Ecology of Cyanobacteria II*. Springer, pp. 65–125. doi: 10.1007/978-94-007-3855-3_4
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G. & Costerton, J. W. (2002). Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annual Review of Microbiology*, 56(1), 187–209. doi:10.1146/annurev.micro.56.012302.160705
- Valenzuela-Gonzalez, F., Casillas-Hernández, R., Villalpando, E. & Vargas-Albores, F. (2015). The 16S rRNA gene in the study of marine microbial communities. *Ciencias Marinas*, 41(4), 297–313.
- Van de Peer, Y., Chappelle, S. & De Wachter, R. (1996). A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucleic Acids Research*, 24(17), 3381–3391. doi:10.1093/nar/24.17.3381

- Vico, P., Iriarte, A., Bonilla, S. & Piccini, C. (2021) Metagenomic analysis of *Raphidiopsis raciborskii* microbiome: beyond the individual. Biodiversity Data Journal 9: e72514. doi:10.3897/BDJ.9.e72514.
- Wang, Y. W., Zhao, J., Li, J. H., Li, S. S., Zhang, L. H. & Wu, M. (2011). Effects of calcium levels on colonial aggregation and buoyancy of *Microcystis aeruginosa*. Current Microbiology, 62(2), 679-683.
- Wang, W., Shen, H., Shi, P., Chen, J., Ni, L. & Xie, P. (2015). Experimental evidence for the role of heterotrophic bacteria in the formation of *Microcystis* colonies. Journal of Applied Phycology, 28(2), 1111-1123. doi:10.1007/s10811-015-0659-5
- Wang, K., Mou, X., Cao, H., Struewing, I., Allen, J. & Lu, J. (2021). Co-occurring microorganisms regulate the succession of cyanobacterial harmful algal blooms. Environmental Pollution, 288, 117682. doi:10.1016/j.envpol.2021.117682.
- Whitton, B. A. (2012). Ecology of cyanobacteria II: their diversity in space and time. Springer Science & Business Media.
- Wu, Q., Zhang, Y., Li, Y., Li, J., Zhang, X. & Li, P. (2019). Comparison of community composition between *Microcystis* colony-attached and free-living bacteria, and among bacteria attached with *Microcystis* colonies of various sizes in culture. Aquatic Ecology. doi:10.1007/s10452-019-09702-7.
- Xiao, M., Li, M. & Reynolds, C.S. (2018). Colony formation in the cyanobacterium *Microcystis*. Biol Rev, 93: 1399-1420. doi: 10.1111/brv.12401.
- Xu, F., Zhu, W., Xiao, M. & Li, M. (2015). Interspecific variation in extracellular polysaccharide content and colony formation of *Microcystis* spp. cultured under different light intensities and temperatures. Journal of Applied Phycology, 28(3), 1533–1541. doi:10.1007/s10811-015-0707-1
- Yang, Z., Geng, L., Wang, W. & Zhang, J. (2012). Combined effects of temperature, light intensity, and nitrogen concentration on the growth and polysaccharide content of *Microcystis aeruginosa* in batch culture. Biochemical Systematics and Ecology, 41, 130–135. doi:10.1016/j.bse.2011.12.015
- Yilmaz, P., Parfrey, L.W., Yarza, P., Gerken, J., Pruesse, E., Quast, C., Schweer, T., Peplies, J., Ludwig, W. & Glöckner, F.O. (2014). The SILVA and "All-species Living Tree Project (LTP)" taxonomic frameworks. Nucl. Acids Res. 42:D643-D648

Zhai, C., Zhang, P., Shen, F., Zhou, C. & Liu, C. (2012). Does *Microcystis aeruginosa* have quorum sensing? *FEMS Microbiology Letters*, 336(1), 38–44. doi:10.1111/j.1574-6968.2012.02650.x

Zhang, P., Chen, M., Zhang, Y., Li, Y., Lu, S. & Li, P. (2018). Autoaggregation and adhesion abilities in bacteria associated with colonies of *Microcystis*. *Hydrobiologia*. doi:10.1007/s10750-018-3706-9

Znachor, P., Jurczak, T., Komárková, J., Jezberová, J., Mankiewicz, J., Kaštovská, K. & Zapomělová, E. (2006). Summer changes in cyanobacterial bloom composition and microcystin concentration in eutrophic Czech reservoirs. *Environmental Toxicology*, 21(3), 236–243. doi:10.1002/tox.20176

Paquetes R:

Callahan B. J., McMurdie P. J., Rosen M. J., Han A. W., Johnson A. J. A. & Holmes S. P. (2016). “DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data.” *Nature Methods*, **13**, 581-583. doi:10.1038/nmeth.3869

Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. (2014). “Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2.” *Genome Biology*, 15, 550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8.

Eddelbuettel, D. & Francois, R. (2011). Rcpp: Seamless R and C++ Integration. *Journal of Statistical Software*, **40**(8), 1-18, doi:10.18637/jss.v040.i08.

H. Wickham (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York.

Oksanen, J., Simpson, G., Blanchet, F., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P., O'Hara, R., Solymos, P., Stevens, M., Szoecs, E., Wagner, H., Barbour, M., Bedward, M., Bolker, B., Borcard, D., Carvalho, G., Chirico, M., De Caceres, M., Durand, S., Evangelista, H., FitzJohn, R., Friendly, M., Furneaux, B., Hannigan, G., Hill, M., Lahti, L., McGlinn, D., Ouellette, M., Ribeiro Cunha, E., Smith, T., Stier, A., Ter Braak, C. & Weedon, J. (2022). *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.6-2. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>.

Paul J. McMurdie & Susan Holmes (2013). *phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data*. *PLoS ONE*, 8(4):e61217.

Wright K (2021). pals: Color Palettes, Colormaps, and Tools to Evaluate Them. R package version 1.7. <https://CRAN.R-project.org/package=pals>.