

Informe final publicable de proyecto

Relaciones funcionales entre *Microcystis* spp. y la comunidad bacteriana heterótrofa asociada a su mucílago.

Código de proyecto ANII: FCE_1_2019_1_156308

Fecha de cierre de proyecto: 01/02/2024

PICCINI FERRÍN, Claudia (Responsable Técnico - Científico)
VICO CASTILLO, Paula (Investigador)
MARTÍNEZ DE LA ESCALERA SIRI, Gabriela (Investigador)
KRUK GENCARELLI, Carla Cecilia (Investigador)
SEGURA CASTILLO, Angel Manuel (Investigador)

MINISTERIO DE EDUCACIÓN Y CULTURA. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS "CLEMENTE ESTABLE"
(Institución Proponente) \\ UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. CENTRO UNIVERSITARIO REGIONAL ESTE \\
FUNDACIÓN DE APOYO AL INSTITUTO CLEMENTE ESTABLE

Resumen del proyecto

Las especies del género *Microcystis* son las cianobacterias tóxicas formadoras de floraciones más comunes en todo el mundo. Pertenecen a un clado de cianobacterias unicelulares cuya capacidad para alcanzar grandes biomásas durante la floración está ligada a la formación de colonias. Dichas colonias están compuestas por cientos a miles de células de *Microcystis* rodeadas por gruesos mucílago (matriz depolisacáridos y proteínas) donde se establece una comunidad bacteriana (microbioma). El estilo de vida colonial ofrece varias ventajas en condiciones estresantes de intensidad de luz, luz ultravioleta, sustancias tóxicas y depredación, lo que permite que *Microcystis* persista y forme densas floraciones en una amplia gama de condiciones ambientales. La progresión de un organismo unicelular a la multicelularidad en *Microcystis* generalmente se ha interpretado como respuestas fenotípicas individuales de las cianobacterias al medio ambiente. Específicamente, en este proyecto evaluamos cómo influye la estructura y función del microbioma de *Microcystis* en la formación y crecimiento de las colonias. Para ello, nos centramos en i) las características compartidas por los biofilms microbianos y las colonias de *Microcystis*; ii) el conocimiento actual sobre el proceso de formación de colonias; iii) la evidencia sobre la existencia de quorum sensing en *Microcystis*; y iv) la información sobre el microbioma asociado a la colonia. En base al conocimiento existente y a la información generada por este proyecto proponemos que los cambios morfológicos, funcionales y de composición del microbioma que ocurren desde células individuales hasta colonias son consecuencia de interacciones biológicas y ecológicas entre la cianobacteria y su microbioma. Una vez que las condiciones ambientales seleccionan a un ecotipo determinado de *Microcystis*, comienza un proceso de reclutamiento de bacterias y establecimiento de un microbioma propio que es ecotipo-específico y determina en última instancia el fenotipo del organismo generado (holobionte cianobacteria-microbioma).

Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Ecología / Ecología microbiana

Palabras clave: *Microcystis* / mucílago / diversidad funcional /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

Las cianobacterias del género *Microcystis* (orden Chroococcales) son parte del fitoplancton en ecosistemas de agua dulce y salobre, donde pueden formar densas floraciones (Armitano et al., 2014; Bi et al., 2013). Son bacterias Gram-negativas que pueden encontrarse como células individuales o en colonias flotando cerca de la superficie, alcanzando tamaños de colonia que pueden detectarse a simple vista (cientos de micras) (Bordenstein and Theis, 2015). Las floraciones de *Microcystis* están compuestas por una mezcla de poblaciones capaces de producir metabolitos secundarios llamados microcistinas (toxinas) que son tóxicas para los animales y los humanos y por poblaciones no tóxicas. Se ha demostrado que la temperatura elevada del agua (entre 25 y 30 °C) promueve el crecimiento de *Microcystis* tóxico, mientras que las poblaciones no tóxicas parecen tener menos tolerancia a las condiciones ambientales variables (Carrascal et al., 2021; Cook et al., 2020). Por lo tanto, es muy probable que bajo el actual escenario de calentamiento climático y eutrofización mundial, predominen las floraciones de cianobacterias que contienen un mayor porcentaje de *Microcystis* tóxico (Davis et al., 2009; Kruk et al., 2023), lo que hace que la comprensión de la biología y ecología de estos organismos sea relevante.

Hasta ahora, los estudios sobre la ecología de *Microcystis* se han centrado en los determinantes de su crecimiento, toxicidad y diversidad (Dick et al., 2021). Más recientemente, se ha comenzado a incluir la estructura y función de su microbioma y su papel en la supervivencia y aptitud de la cianobacteria (Gan et al., 2012; Herrera and Echeverri, 2021; Jackrel et al., 2019; Jankowiak and Gobler, 2020). Sin embargo, no existe consenso sobre los mecanismos que determinan la producción de microcistinas, la densidad y persistencia de las floraciones o la estructura de la comunidad del microbioma. En este sentido, la evidencia de los diferentes estudios es frecuentemente contradictoria, ya que algunos trabajos se basan en cultivos axénicos de formas unicelulares (difíciles de encontrar en la naturaleza), otros en muestras ambientales y otros analizan y comparan secuencias obtenidas ya sea de aislados, de ADN ambiental o de enriquecimientos provenientes de las flores, lo que dificulta las generalizaciones. Otra posible explicación para las contradicciones es que los factores que impulsan la formación de floraciones pueden estar desvinculados de los que impulsan la toxicidad, tal vez debido a complejas vías de regulación asociadas no solo a las cianobacterias, sino también a sus socios heterótrofos. En este proyecto se generó información para llenar este vacío de conocimiento.

Microcystis spp. pertenece a un grupo filogenético de cianobacterias unicelulares y su capacidad para formar colonias suele considerarse como una estrategia de agregación ecológica para evitar la depredación o protegerse de la radiación

ultravioleta, entre otras. En este contexto, la formación de colonias por parte de estos organismos se ha explicado ya sea por división celular (el proceso bacteriano habitual para multiplicarse) o por adhesión celular (Le et al., 2022; Xiao et al., 2017). Sin embargo, la evidencia genómica reciente sugiere que las colonias en *Microcystis* son el resultado de una expansión clonal más que de una agregación celular (Carrascal et al., 2021). La visión actual de la evolución del organismo incorpora cada vez más el concepto de holobionte, que reconoce la aparición generalizada de microbiomas asociados al huésped y hace énfasis en la naturaleza multiespecífica del conjunto huésped-microbioma (Bordenstein and Theis, 2015). En el caso de *Microcystis*, el organismo colonial está compuesto de hecho por una miríada de especies bacterianas diferentes que interactúan e intercambian bienes comunes (nutrientes, gases, carbono, genes) dentro de la envoltura mucilaginosa de la cianobacteria, lo que le confiere una capacidad extremadamente alta para sobrevivir en diferentes condiciones ambientales. Por tanto, parece sensato concluir que el organismo que llamamos *Microcystis* es en realidad un holobionte.

Si bien las interacciones entre *Microcystis* y su microbioma podrían implicar tanto cooperación como competencia, la evidencia sugiere que en general las relaciones son mutuamente beneficiosas. Entre las funciones del microbioma que se ha visto que benefician a *Microcystis* se encuentra la fijación de nitrógeno, que proporciona una ventaja en entornos limitados en nitrógeno. Asimismo, se ha descrito que el microbioma puede desempeñar un papel en la regulación de la producción de microcistina o en la descomposición de estas toxinas.

Aquí, nos centramos en i) las características compartidas por las biopelículas bacterianas y las colonias de *Microcystis*; ii) el conocimiento actual sobre el proceso de formación de colonias; iii) la evidencia sobre la existencia de quorum sensing (QS) en *Microcystis* y; iv) la información sobre la composición de la comunidad y la función de la microbiota asociada a la colonia; para proponer que los cambios morfológicos, funcionales y de composición del microbioma que ocurren desde células individuales hasta colonias son consecuencia de interacciones biológicas y ecológicas entre la cianobacteria y las bacterias heterótrofas. Estas interacciones específicas y cuidadosamente reguladas son bidireccionales e inducen el desarrollo de una envoltura mucilaginosa que albergará a la comunidad heterótrofa a través de un mecanismo similar a una biopelícula. Teniendo esto en cuenta, en este proyecto nos aproximamos al proceso de ensamblaje del microbioma, evaluando cuáles son las funciones microbianas que caracterizan cada etapa de crecimiento colonial, para generar un modelo conceptual de emergencia y decadencia del holobionte *Microcystis*.

Metodología/Diseño del estudio

Estrategia:

La estrategia del proyecto se centró en cuatro grandes pilares:

- 1) Análisis de muestras de agua previamente obtenidas en el marco de proyectos y tesis doctorales, las cuales cuentan con información exhaustiva de alta calidad y que ya ha sido publicada (Alcántara et al., 2018; Kruk et al., 2021; Lepillanica et al., 2018; Martínez de la Escalera et al., 2017; Kruk et al., 2015).
- 2) Obtención de nuevas muestras de ecosistemas ya conocidos en cuanto a la presencia de floraciones de *Microcystis*.
- 3) Partición de las muestras en distintas clases de tamaño, empleando mallas con distinto tamaño de poro, para poder discriminar entre las distintas colonias, basándonos en la información previamente generada que indica que existen tamaños coloniales con mayor toxicidad. Los tamaños fueron: menores a 20 micrómetros (fracción U), entre 20 y 60 micrómetros (fracción S), entre 60 y 150 micrómetros (fracción M) y mayor a 150 micrómetros (L).
- 4) Metagenómica basada en secuenciación shotgun que evita los sesgos relacionados a la secuenciación de amplicones.

En este proyecto se empleó una aproximación basada en muestras de campo tomadas de sitios con floraciones casi permanentes de *Microcystis*, tales como el embalse de Salto Grande y las playas de Montevideo y San José, las que fueron fraccionadas por tamaño (Deus Álvarez et al., 2020). Además, se emplearon muestras provenientes de nuestro banco de muestras almacenadas a -80 °C.

Metodología:

Obtención de ADN y ARN- Se extrajo el ADN y el ARN total de cada fracción de acuerdo con los métodos aplicados en nuestro laboratorio para una amplia diversidad de ecosistemas (Batani et al., 2016; Deus Álvarez et al., 2020; Martínez de la Escalera et al., 2017; Piccini et al., 2006; Plata and Escalera, 2015; Soumastre et al., 2022). El ADN se empleó para estudios de qPCR y metagenómicos mediante secuenciación shotgun. El ARN se retrotranscribió a ADN copia (cDNA) empleando el kit PureLink™ / RNA MiniKit. El cDNA se empleó para secuenciación de amplicones del gen 16S.

Análisis de la estructura comunitaria del microbioma - Por un lado, se obtuvieron secuencias de amplicones del gen para el ARNr 16S de cada tamaño colonial (servicio Univ. de Minnesota). Las secuencias fueron analizadas mediante el paquete bioinformático Dada2 (Callahan et al., 2016), determinándose las variantes de secuencia única (ASVs) para conocer la riqueza, diversidad y estructura comunitaria de cada fracción. Los datos obtenidos de la secuenciación del cDNA se emplearon como proxies de los taxones más activos. Por tanto, las secuencias obtenidas del ADN genómico para los estudios de estructura comunitaria, mientras que las de cDNA se emplearon para determinar los grupos activos en cada tamaño colonial y para estudiar las funciones bacterianas predichas que se estimulan en el pasaje de un tamaño al siguiente (Picrust2 y Faprotax), (Douglas et al., 2020; Louca et al., 2016). Esto nos permitió aproximarnos un poco más a conocer qué grupos bacterianos están más activos en cada fracción y cuáles son las funciones más relevantes en cada uno.

Por otro lado, se realizó una secuenciación metagenómica (shotgun) para obtener información genómica independiente de la amplificación: se empleó primeramente el equipo de secuenciación masiva Ion GeneStudio S5 de la plataforma del IIBCE. Sin embargo, dado que no se obtuvo información con la profundidad suficiente las muestras fueron enviadas a un servicio de secuenciación externo (BGI). Los datos obtenidos de la secuenciación se procesaron de acuerdo a lo descrito en (Vico et al., 2020). Una vez seleccionados los reads de acuerdo a su calidad se anotaron empleando herramientas de libre acceso (Li et al., 2016; van der Veen et al., 2014).

Dado que se propone que el mucílago es crucial en determinar la composición de la comunidad bacteriana embebida en él, se evaluó la diversidad beta entre las distintas colonias (Baselga, 2010; Baselga and Orme, 2012). Esto nos permitió determinar cuál es el rol del mucílago como estructurador/modelador de la comunidad.

Se estimó el biovolumen celular y del mucílago para cada fracción de tamaño colonial usando para ello las mismas muestras a las que se le extrajo el ADN, previamente fijadas con Lugol, y teñidas con tinta china para visualizar el mucílago.

Toxicidad de las colonias del CMA - con el fin de conocer si las colonias de las distintas clases de tamaño son tóxicas se extrajo ARN de cada fracción según la metodología descrita en Deus (2018) y se aplicó PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) para cuantificar la abundancia de transcriptos de genes involucrados en la síntesis de microcistinas. Nuestro grupo de trabajo tiene experiencia en la conservación de muestras de estos organismos para su posterior extracción de ARN y qPCR.

Análisis de datos - la información obtenida de la secuenciación metagenómica (genes predichos en las distintas categorías funcionales, tales como metabolismo del carbono, degradación de compuestos aromáticos, etc. y composición de la comunidad bacteriana) se analizó a la luz de la información adicional obtenida de cada muestra (abundancia de especies del CMA, variables abióticas tales como temperatura, salinidad, concentración de nutrientes, variables categóricas tales como rangos de tamaño, presencia o ausencia de floración, etc.).

Resultados, análisis y discusión

Toxicidad y tamaño: Como se describe en Deus et al. (2020), la mayor abundancia de células tóxicas y concentración de microcistina por célula se encontró en la fracción M, aunque las diferencias con el resto de las fracciones no fueron significativas (Figura 1 del anexo).

Composición de la comunidad bacteriana específica del tamaño: después del procesamiento de las secuencias crudas (959.576 lecturas) se obtuvieron 652.748 lecturas, lo que correspondió a 2790 ASV que después del filtrado de calidad se redujeron a 1732. Todas las muestras alcanzaron la meseta en la curva de rarefacción (Figura 2 del anexo). Los resultados de diversidad alfa mostraron que la mayor riqueza se encontró en las fracciones más pequeñas (U y S), probablemente debido a que en esos tamaños coloniales se están reclutando bacterias a partir de la comunidad acuática (fracción U) para establecer un microbioma inicial (fracción S) cuya estructura se consolidará en estadios posteriores. No obstante, para los índices de diversidad calculados (Shannon, 1-Simpson y equitación) no hubo diferencias entre fracciones (Figura 3 anexo).

Microcystis fue el género más abundante en todas las muestras. Al excluirlo de los análisis, los filos más abundantes fueron Proteobacteria y Bacteroidetes, seguidos de Cyanobacteria, Planctomycetes y Actinobacteria (Figura 4 del anexo). Se observó que la abundancia de Proteobacteria (27% a 62%) era mayor en los tamaños coloniales más grandes, mientras que la tendencia fue opuesta para los Bacteroidetes (23% a 10%), Cyanobacterias (12% a 4%), Planctomycetes (10% a 4%) y Actinobacterias (12% a 7%). Dentro del filo Proteobacteria, la clase Alfa fue la dominante (14% a 33%), seguida por la clase Beta (10% a 26%) y finalmente Gamma (2% a 14%). Con respecto a lo observado para el filo, se encontró el mismo patrón

(incremento en la abundancia relativa con el tamaño de la colonia) para Alphaproteobacteria (por ejemplo, género *Roseomonas* -orden Acetobacterales- y *Phenylobacterium* -orden Caulobacterales-) y Gammaproteobacteria (género *Silanimonas* -orden Xanthomonadales-). No fue así para la clase Betaproteobacteria, que muestra su mayor abundancia en la fracción S (con algunos organismos sólo presentes en esta fracción, como *Rhodoferrax*, *Sulfuricella* y *Sideroxydans*), aunque hay representantes de las familias Comamonadaceae, Nitrosomonadaceae y Sutterellaceae -todos miembros del orden Burkholderiales- en todas las fracciones.

Bacterias activas en cada tamaño colonial: el filo que mostró la mayor actividad fue el de las cianobacterias (47 % a 88 %) debido al género *Microcystis* (35 % a 86 %), cuya actividad aumentó con el tamaño de la colonia. Cuando se excluyó del análisis a *Microcystis*, la actividad de las cianobacterias disminuyó considerablemente (14% a 33%) y en cambio fueron las proteobacterias las que mostraron la mayor actividad (28% a 52%, con su máximo en la fracción M). Los filos con mayor actividad fueron los mismos que presentan mayor abundancia (excepto Actinobacteria): Proteobacteria (28% a 52%), Cianobacterias (14% a 33%), Bacteroidetes (20% a 9%) y Planctomycetes (14% a 5%). %).

Dentro de Proteobacteria, las Alfa (19% a 21%) y Beta (8% a 27%) fueron las clases más activas, siendo su actividad similar en todas las fracciones. La clase Alfa mostró diferencias en los órdenes que estaban más activos en cada tamaño: en la fracción U se destacó el orden Rhizobiales, en la fracción S Acetobacterales (género *Roseomonas*), mientras que en las fracciones M y L se observó una mezcla de taxones no asignados a nivel de orden y Acetobacterales, Caulobacterales y Rhizobiales. La clase Beta (orden Burkholderiales), fue más activa en la fracción S principalmente debido a la familia Sutterellaceae (18%), seguida de la fracción M (24%) y la fracción L (19%) - donde la actividad se dividió entre Nitrosomonadaceae (género DSSD61), Comamonadaceae (género *Curvibacter*) y familias Sutterellaceae-, y por último la fracción U (8%). La clase Gamma presentó una baja actividad, presentando un máximo de actividad en la fracción M debido a los órdenes Xanthomonadales (género *Silanimonas*, 4%) y Pseudomonadales (género *Pseudomonas*, 2%).

Dentro de Bacteroidetes, para el ADNc se observó lo mismo que para el ADNg, con una actividad máxima en la fracción U (20%) y mínima en la fracción G (9%).

En el caso del filo Cyanobacteria, quien mostró mayor actividad al excluir a *Microcystis* fue el género *Pseudanabaena*, con su mayor actividad en la fracción G (31%, con 10% en las demás fracciones). También se detectaron los géneros *Cyanobium* y *Dolichospermum*, mostrando el primero su mayor actividad en la fracción U (5%) y el segundo en la fracción S (6%).

Finalmente, el filo Planctomycetes debe su presencia principalmente a la familia Phycisphaeraceae, excepto en la fracción U, donde estuvo representado por una combinación de las familias Phycisphaeraceae y Pirellulaceae.

Para resumir todos los resultados obtenidos se generó la Figura 5 del anexo, que muestra el principal taxón presente y activo en cada fracción en relación con algunas características como el espesor del mucílago, el número de células por colonia y copia de gen, expresión y concentración de microcistina. Lo más llamativo es que la mayoría de los taxones que están activos (según el cDNA) son diferentes a los que están presentes en la estructura comunitaria observada a partir del ADN genómico. Si bien algunos géneros como *Silanimonas* y *Roseomonas* estuvieron presentes con un alto porcentaje en el microbioma (asociados a las fracciones M y L), estos no fueron tan activos, en cambio *Pseudanabaena*, *Curvibacter* y DSSD61 mostraron una actividad importante.

Cambios funcionales con el tamaño: los datos obtenidos de la predicción metagenómica realizada por Faprotax y Picrust2 (basados en cDNA) fueron contrastados con los datos proveniente de los metagenomas (basados en ADN genómico). Se compararon las abundancias de genes involucrados en distintas rutas metabólicas entre los distintos tamaños y se observó que, por ejemplo, en las fracciones S y M las funciones relacionadas con la fotosíntesis fueron las más abundantes, mientras que en la fracción L la actividad de las cianobacterias disminuye notablemente.

Interesantemente, la actividad ureolítica (debida a la enzima ureasa) aumentó más de 200 veces entre la fracción M (donde era cercana a cero) y la L. En ecosistemas acuáticos, la urea se origina tanto por el uso de fertilizantes nitrogenados como por la degradación de la materia orgánica, especialmente de purinas, pirimidinas y arginina. La urea se ha relacionado con la proliferación de cianobacterias por ser una fuente de nitrógeno de fácil asimilación para aquellas que poseen la enzima ureasa. Más aún, se ha descrito que *Microcystis* es capaz de emplear a la urea presente en el agua como fuente de nitrógeno y de carbono, incorporando el carbono por ej. en la síntesis de aminoácidos, incluyendo a la producción de microcistinas (Krausfeldt et al., 2019). Las altas tasas de fotosíntesis que tienen lugar durante una floración reducen notablemente las concentraciones de CO₂ disuelto y aumentan el pH, lo que sugiere que las floraciones experimentan períodos de limitación de

CO₂ (Paerl and Huisman, 2009). Se ha reportado que la incorporación de carbono proveniente de la urea es más alta a pH mayores a la neutralidad, como el que se registra durante las floraciones (Krausfeldt et al., 2019). Por consiguiente, el aumento de la actividad ureolítica en las colonias más grandes sugiere que cuando la floración está avanzada se acumulan fuentes orgánicas de nitrógeno, probablemente debido al crecimiento del microbioma a expensas del carbono orgánico que compone el mucílago (azúcares, ADN, proteínas), concomitante a la limitación de CO₂. La transición de la fracción M (donde se acumula la urea) a la L implica activación de metabolismos en el holobionte (microbioma + cianobacteria) que contribuyen tanto a la degradación de la urea como a la captación de N y C provenientes de ésta. Esto sería consistente con la baja abundancia de genes involucrados en la fotosíntesis que se observó en dicha fracción (proxy de baja actividad fotosintética).

Por otro lado, los genes involucrados en la fijación de CO₂ (reductive tricarboxylic acid) disminuyen en su proporción hacia los tamaños mayores, coincidiendo con la disminución de las funciones fotosintéticas. Las vías para la fermentación y la fotoheterotrofia, están aumentadas en la fracción M, mientras que en la S se encontraron genes involucrados en la oxidación del metano y en la metilotrofia (metabolismo de compuestos con un solo átomo de carbono). Estas funciones se vuelven indetectables en las fracciones M y L, probablemente debido a la ausencia de compuestos de un solo carbono y al aumento de la disponibilidad de otras fuentes de carbono.

La evidencia parece indicar que a medida que las colonias progresan en su crecimiento (debido al crecimiento del biofilm) hacia la fracción L, las funciones más relevantes para el crecimiento del holobionte disminuyen, mientras que aumentan las relacionadas con el metabolismo de compuestos acumulados en las fases anteriores y con la obtención de aquellos que se vuelven limitantes.

Conclusiones y recomendaciones

Los resultados de este proyecto nos llevan a hipotetizar que la progresión que lleva a la formación de floraciones de *Microcystis* involucra el desarrollo de biofilms flotantes a partir de una o pocas células individuales con poco mucílago que reclutan a su microbioma a partir de las bacterias presentes en el ambiente. Los mecanismos por los que ocurre dicho reclutamiento no están aún dilucidados, pero es altamente probable que impliquen señales químicas en ambas direcciones. El microbioma recientemente establecido induce la formación de mucílago en *Microcystis*, aumentando el tamaño de las colonias-biofilms y estableciéndose así un microbioma que determina que el biofilm madure (tamaño entre 60 y 150 µm). En esta etapa es cuando se generan más microcistinas. Posteriormente y como consecuencia de los cambios ocurridos en el microambiente que constituye el biofilm, las colonias se vuelven más grandes y se observan más desestructuradas, con menor diversidad en su microbioma, baja concentración de microcistinas y con acumulación de compuestos que dificultan la supervivencia del holobionte. De esta fase se desprenden células que iniciarán nuevamente el ciclo de crecimiento del biofilm (Figura 6 del Anexo). Si bien en una floración se pueden encontrar todas las distintas etapas de formación y crecimiento del biofilm, algunas pueden dominar sobre otras, lo que determinará en última instancia la toxicidad y duración de la floración. Esto es relevante a la hora de realizar muestreos en una floración, ya que si esto ocurre cuando predominan las etapas de colonias de tamaño M se detectarán más microcistinas, mientras que si predomina la etapa L éstas pueden ser no detectables.

El microbioma de *Microcystis* puede influir por tanto en la calidad general del agua de los ecosistemas acuáticos. Comprender estas interacciones microbianas es esencial para gestionar y mitigar los impactos de las floraciones de *Microcystis* en la calidad del agua.

Referencias bibliográficas

- Armitano, J., Méjean, V., Jourlin-Castelli, C., 2014. Gram-negative bacteria can also form pellicles. *Environ. Microbiol. Rep.* 6, 534–544. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12171>
- Baselga, A., 2010. Partitioning the turnover and nestedness components of beta diversity. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 19, 134–143. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2009.00490.x>
- Baselga, A., Orme, C.D.L., 2012. Betapart: An R package for the study of beta diversity. *Methods Ecol. Evol.* 3, 808–812. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2012.00224.x>
- Batani, G., Pérez, G., Martínez de la Escalera, G., Piccini, C., Fazi, S., 2016. Competition and protist predation are important regulators of riverine bacterial community composition and size distribution. *J. Freshw. Ecol.* 31, 609–623. <https://doi.org/10.1080/02705060.2016.1209443>
- Bi, X., Zhang, S., Dai, W., Xing, K., Yang, F., 2013. Effects of lead (II) on the extracellular polysaccharide (EPS) production and colony formation of cultured *Microcystis aeruginosa*. *Water Sci. Technol.* 67, 803–809.
- Bordenstein, S.R., Theis, K.R., 2015. Host biology in light of the microbiome: ten principles of holobionts and hologenomes. *PLoS Biol.* 13, e1002226.
- 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. *Nat. Methods* 13, 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Carrascal, O.M.P., Tomas, N., Terrat, Y., Moreno, E., Giani, A., Marques, L.C.B., Fortin, N., Shapiro, B.J., 2021. Phyllosymbiosis in the *Microcystis* microbiome.
- Cook, K. V., Li, C., Cai, H., Krumholz, L.R., Hambright, K.D., Paerl, H.W., Steffen, M.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., 2020. The global *Microcystis* interactome. *Limnol. Oceanogr.* 65, S194–S207. <https://doi.org/10.1002/lno.11361>
- Davis, T.W., Berry, D.L., Boyer, G.L., Gobler, C.J., 2009. The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacteria blooms. *Harmful Algae* 8, 715–725. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2009.02.004>
- Deus Álvarez, S., 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.
- Dick, G.J., Duhaime, M.B., Evans, J.T., Errera, R.M., Godwin, C.M., Kharbush, J.J., Nitschky, H.S., Powers, M.A., Vanderploeg, H.A., Schmidt, K.C., Smith, D.J., Yancey, C.E., Zwiers, C.C., Deneff, V.J., 2021. The genetic and ecophysiological diversity of *Microcystis*. *Environ. Microbiol.* 00. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15615>
- Douglas, G.M., Maffei, V.J., Zaneveld, J.R., Yurgel, S.N., Brown, J.R., Taylor, C.M., Huttenhower, C., Langille, M.G.I., 2020. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nat. Biotechnol.* 38, 685–688.
- Gan, N., Xiao, Y., Zhu, L., Wu, Z., Liu, J., Hu, C., Song, L., 2012. The role of microcystins in maintaining colonies of bloom-forming *Microcystis* spp. *Environ. Microbiol.* 14, 730–742. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02624.x>
- Herrera, N., Echeverri, F., 2021. Evidence of Quorum Sensing in Cyanobacteria by Homoserine Lactones: The Origin of Blooms. *Water* . <https://doi.org/10.3390/w13131831>
- Jackrel, S.L., White, J.D., Evans, J.T., Buffin, K., Hayden, K., Sarnelle, O., Deneff, V.J., 2019. Genome evolution and host-microbiome shifts correspond with intraspecific niche divergence within harmful algal bloom-forming *Microcystis aeruginosa*. *Mol. Ecol.* 28, 3994–4011. <https://doi.org/10.1111/mec.15198>
- 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. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01016>
- Krausfeldt, L.E., Farmer, A.T., Castro Gonzalez, H.F., Zepernick, B.N., Campagna, S.R., Wilhelm, S.W., 2019. Urea Is Both a Carbon and Nitrogen Source for *Microcystis aeruginosa*: Tracking ¹³C Incorporation at Bloom pH Conditions . *Front. Microbiol.* .
- Kruk, C., Segura, A., Nogueira, L., Carballo, C., Martínez de la Escalera, G., Calliari, D., Ferrari, G., Simoens, M., Cea, J., Alcántara, I., Vico, P., Míguez, D., Piccini, C., 2015. Herramientas para el monitoreo y sistema de alerta de floraciones de cianobacterias nocivas?: Río Uruguay y Río de la Plata. *Innotec*.
- Kruk, C., Segura, A., Piñeiro, G., Baldassini, P., Pérez?Becoña, L., García?Rodríguez, F., Perera, G., Piccini, C., 2023. Rise of toxic cyanobacterial blooms is promoted by agricultural intensification in the basin of a large subtropical river of South America. *Glob. Chang. Biol.*
- Le, V. Van, Srivastava, A., Ko, S.-R., Ahn, C.-Y., Oh, H.-M., 2022. *Microcystis* colony formation: Extracellular polymeric

- substance, associated microorganisms, and its application. *Bioresour. Technol.* 360, 127610. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127610>
- Li, D., Luo, R., Liu, C.-M., Leung, C.-M., Ting, H.-F., Sadakane, K., Yamashita, H., Lam, T.-W., 2016. MEGAHIT v1.0: a fast and scalable metagenome assembler driven by advanced methodologies and community practices. *Methods* 102, 3–11.
- Louca, S., Parfrey, L.W., Doebeli, M., 2016. Decoupling function and taxonomy in the global ocean microbiome. *Science* (80-.). 353, 1272–1277.
- Martínez de la Escalera, G., 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*. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.11.012>
- Paerl, H.W., Huisman, J., 2009. Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environ. Microbiol. Rep.* 1, 27–37. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2008.00004.x>
- Piccini, C., Conde, D., Alonso, C., Sommaruga, R., Pernthaler, J., 2006. Blooms of single bacterial species in a coastal lagoon of the southwestern Atlantic Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 6560–6568. <https://doi.org/10.1128/AEM.01089-06>
- Plata, R. De, Escalera, M. De, 2015. Herramientas para el monitoreo y sistema de alerta de floraciones de cianobacterias nocivas?: Río Uruguay y Río de la Plata Monitoring tools and early warning system for harmful 10, 23–39.
- Soumastre, M., Piccini, J., Rodríguez-Gallego, L., González, L., Rodríguez-Graña, L., Calliari, D., Piccini, C., 2022. Spatial and temporal dynamics and potential pathogenicity of fecal coliforms in coastal shallow groundwater wells. *Environ. Monit. Assess.* 194, 1–17.
- van der Veen, B.E., Harris, H.M., Claesson, M.J., 2014. Metaphor: Finding Bi-directional Best Hit homology relationships in (meta) genomic datasets. *Genomics* 104, 459–463.
- Vico, P., Bonilla, S., Cremella, B., Aubriot, L., Iriarte, A., Piccini, C., 2020. Biogeography of the cyanobacterium *Raphidiopsis* (*Cylindrospermopsis*) *raciborskii*: Integrating genomics, phylogenetic and toxicity data. *Mol. Phylogenet. Evol.* 148, 106824. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2020.106824>
- Xiao, M., Willis, A., Burford, M.A., Li, M., 2017. Review: a meta-analysis comparing cell-division and cell-adhesion in *Microcystis* colony formation. *Harmful Algae* 67, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.06.007>

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)