
**Comunicación y división de tareas:
estudio del rol de la saxitoxina
(PSP) en la biología de la
cianobacteria
*Raphidiopsis raciborskii***

Programa de posgrado PEDECIBA,
Área Biología, sub-área
Microbiología Universidad de la
República

Lic. Paula Vico Castillo

Junio 2024

Comunicación y división de tareas: estudio del rol de la saxitoxina (PSP) en la biología de la cianobacteria *Raphidiopsis raciborskii*

Tesis de Doctorado presentada al Programa de Posgrado PEDECIBA,
Área Biología, sub-área Microbiología, Universidad de la República,
como parte de los requisitos necesarios para la obtención del título de
Doctor en Ciencias Biológicas.

Tesis realizada en el Departamento de Microbiología del Instituto de
Investigaciones Biológicas Clemente Estable y en el Departamento
Biotecnológico del Instituto de Higiene.

Orientadores de Tesis

Dr. Andrés Iriarte

Departamento de desarrollo Biotecnológico, Instituto de Higiene. Facultad de Medicina.
Universidad de la República

Dra. Claudia Piccini

Departamento de Microbiología. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable,
Ministerio de Educación y Cultura.

Dra. Sylvia Bonilla

Sección Limnología. Facultad de Ciencias. Universidad de la República.

Tabla de contenido

RESUMEN	5
ABSTRACT	7
LISTA DE SIGLAS	8
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	9
1.1 EUTROFIZACIÓN DE LOS ECOSISTEMAS ACUÁTICOS Y FLORACIONES DE CIANOBACTERIAS	9
1.2 CIANOTOXINAS	9
1.3 <i>RAPHIDIOPSIS RACIBORSKII</i>	11
1.4 CARACTERÍSTICAS DE LAS TOXINAS PRODUCIDAS POR <i>R. RACIBORSKII</i>	12
1.5 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LAS TOXINAS EN <i>R. RACIBORSKII</i>	15
1.6 ORGANIZACIÓN DEL CLUSTER DE GENES SXT	15
1.7 SAXITOXINA: ALGUNOS COMPONENTES DE SU RUTA METABÓLICA	17
1.8 PAPEL BIOLÓGICO Y ECOLÓGICO DE LAS PSP EN <i>R. RACIBORSKII</i>	18
1.9 INTERACCIÓN CIANOBACTERIA-MICROBIOMA	20
OBJETIVO GENERAL	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
ESTRUCTURA DE LA TESIS	23
CAPÍTULO 1	25
BIOGEOGRAFÍA DE <i>R. RACIBORSKII</i> : INTEGRACIÓN DE DATOS GENÓMICOS, FILOGENÉTICOS Y DE TOXICIDAD	25
1.1 RESUMEN	25
1.2 INTRODUCCIÓN	25
1.3 OBJETIVO	27
DEVELAR EL ORIGEN Y RUTAS DE DISPERSIÓN DE <i>R. RACIBORSKII</i> A PARTIR DE ESTUDIOS GENÓMICOS Y FILOGENÉTICOS.	27
1.4 MATERIALES Y MÉTODOS	27
1.4.1. Condiciones de cultivo y extracción de ADN	28
1.4.1. Secuenciación y ensamblaje de los genomas	28
1.4.2. Propiedades del genoma	29
1.4.3. Análisis de la secuencia del cluster sxt	29
1.4.4. Análisis filogenéticos:	29
1.4.5. Average nucleotide identity score (ANI)	30
1.5 RESULTADOS	31
1.5.1 Descripción del cluster STX en <i>R. raciborskii</i> MVCC19	31
1.5.2. Filogenia de <i>R. raciborskii</i>	32
1.6. DISCUSIÓN	35
1.6.1. Conservación del cluster sxt: contexto genómico y sintenia	35
1.6.2. Origen y dispersión de PSP en <i>R. raciborskii</i>	36
1.5.3. Reconstrucción de la ruta de dispersión de <i>R. raciborskii</i>	37
2.6 CONCLUSIONES	43
CAPÍTULO 2	44
INTERPRETACIÓN DEL POSIBLE PAPEL QUE TIENEN LAS PSPs EN <i>RAPHIDIOPSIS RACIBORSKII</i> : OSMOREGULACIÓN Y DENSO DEPENDENCIA	44
2.1 RESUMEN	44
2.2 INTRODUCCIÓN	45
2.3 OBJETIVO	48
2.4 MATERIALES Y MÉTODOS	48
2.4.1 Evaluación de la respuesta celular al sodio (experimento 1, parte 1):	48
2.4.2. Evaluación Denso-dependencia (experimento 2, objetivo 2):	49
2.4.3 Extracción de ARN del experimento 2	50
2.4.4 PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR), experimento 2	51
2.4.5. Curva de calibración y cuantificación de copias de cada gen (sxtU), experimento 2	51
2.4.6. Cuantificación de PSP por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	52
2.5 RESULTADOS	53

2.5.1. Evaluación del crecimiento de <i>R. raciborskii</i> en relación al sodio (experimento 1):	53
2.5.2 Evaluación de la densidad-dependencia: crecimiento de <i>R. raciborskii</i> en dos densidades celulares diferentes	54
2.5.3 Evaluación de la expresión del gen <i>sxtU</i>	55
2.5.4. Variación en la concentración y proporción de PSPs/células detectadas en cada tratamiento	¡Error! Marcador no definido.
2.6. DISCUSIÓN	60
2.6.1. Efecto de la osmolaridad en la síntesis de saxitoxina	60
3.6.2. Efecto de la densidad poblacional en la síntesis de saxitoxina	60
3.6.3 Implicancias ecológicas de las PSP en <i>R. raciborskii</i>	63
2.7 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	63
CAPÍTULO 3	65
DESCRIPCIÓN DE LOS COMPONENTES Y APROXIMACIÓN FUNCIONAL AL HOLOBIONTE	65
3.1 RESUMEN	65
3.2 INTRODUCCIÓN	65
3.3 OBJETIVOS	69
3.4 METODOLOGÍA	69
3.4.1 Cepas de cianobacterias, condiciones de cultivo y muestras	69
3.4.2. Procesamiento de muestras	70
3.4.3 Extracción de ADN y secuenciación del gen codificante para el ARN 16S	70
3.4.4 Microbioma: análisis de secuencias codificantes para el ARNr 16S	71
3.4.5 Extracción de ARN y metatranscriptómica	72
3.4.6 Estudió de la diversidad funcional mediante análisis de metatranscriptoma	72
3.5. RESULTADOS	74
3.5.1. Composición taxonómica del microbioma mediante secuenciación de amplicones del gen ARN ribosomal 16S	74
3.5.2 Composición taxonómica del microbioma definida mediante la aproximación metatranscriptoma. Secuenciación metatranscriptómica global:	79
3.5.3 Composición taxonómica en relación con otros ecotipos descritos en la literatura	82
4.3 Análisis funcional del microbioma de MVCC19	82
3.6- DISCUSIÓN	87
3.6.1 - Composición taxonómica y funcional del microbioma de <i>R. raciborskii</i>	87
3.6.2 Metabolismo del carbono entre <i>R. raciborskii</i> MVCC19 y su microbiota	89
3.6.3. Metabolismo del nitrógeno entre <i>R. raciborskii</i> MVCC19 y su microbioma	91
3.7 CONCLUSIONES	93
4. CONSIDERACIONES FINALES	94
5. PERSPECTIVAS	95
BIBLIOGRAFÍA	96
APÉNDICE	113
APÉNDICE 1:	113
APÉNDICE 2:	125
REFERENCIAS APÉNDICE 1:	127
TABLA 1.1	127

RESUMEN

El creciente aumento en la distribución global de floraciones de la cianobacteria *Raphidiopsis* (ex *Cylindrospermopsis*) *raciborskii* genera gran preocupación debido a su capacidad de producir compuestos tóxicos para humanos y animales. Se ha propuesto que su éxito y actual presencia en distintas latitudes se debe al desarrollo de ecotipos con diferente nicho y con distintas respuestas a los cambios ambientales. Dependiendo de su origen geográfico, sus poblaciones son capaces de producir alternativamente dos tipos de toxinas: saxitoxina y análogos (PSP, codificada por el *cluster* genético *sxt*) o cilindrospermopsina (CYL, codificada por el *cluster* genético *cyr*) o no ser tóxicas, lo que ha permitido determinar patrones geográficos de la especie. En nuestro país esta especie ha demostrado poseer el *cluster* de genes para la biosíntesis de saxitoxina, produciéndose en altas concentraciones. Un aspecto importante que recientemente ha surgido como una variable relevante para explicar el éxito de las cianobacterias es la presencia de una microbiota asociada al mucílago compuesto de exopolisacáridos que rodea a los filamentos de la cianobacteria. Al igual que para otros organismos y su microbiota, en el mucílago existe un intercambio de nutrientes, fuentes de carbono, gases y componentes celulares, entre otros.

Hasta el momento se desconoce qué variables favorecen la producción de PSP en *R. raciborskii* cuál es su función biológica y ecológica, así como su relación con la microbiota. El objetivo general de esta tesis fue dilucidar el papel que juega la presencia de PSP en la biología y ecología de *R. raciborskii*. Para ello, se siguió una aproximación funcional y se combinaron estudios genómicos, metagenómicos y metatranscriptómicos a partir de experimentos de laboratorio con cepas de la especie.

Los análisis filogenéticos, genómicos, filogenómicos en contexto con la literatura nos llevaron a proponer el origen de la especie en África central desde donde se propagó hacia las distintas regiones donde actualmente se distribuye. Además, mediante una aproximación experimental se observó que a baja densidad poblacional la síntesis de distintas PSP aumentó significativamente y cambió su perfil de variantes, lo que nos ha llevado a sugerir que estos compuestos formarían parte de un mecanismo de comunicación entre los integrantes de la población. Por último, se analizó la microbiota asociada a dos aislamientos de *R. raciborskii* pertenecientes a distintos ecotipos (uno productor de PSP y otro no tóxico). Se encontró que el ensamblaje de la comunidad asociada es ecotipo-dependiente y el análisis de transcriptómica reveló que las principales funciones que realiza la cianobacteria tienen que ver con la fotosíntesis y la fijación del carbono, mientras que el microbioma está involucrado mayoritariamente en la fijación de nitrógeno, molécula importante para la producción de PSPs.

De acuerdo con estudios previos realizados por otros autores, los genes del *cluster sxt* fueron adquiridos por *R. raciborskii* a través de la transferencia horizontal de genes provenientes principalmente de bacterias. En este marco, es plausible hipotetizar que la presencia del *cluster sxt* en las poblaciones de América del Sur se debe a la adquisición de

dichos genes a partir de su microbioma y que las PSP constituyen un mecanismo de comunicación entre los miembros del holobionte, quizás involucrado en el reclutamiento y el mantenimiento de las especies que integran el microbioma.

ABSTRACT

The increasing global distribution of blooms produced by the cyanobacterium *Raphidiopsis* (ex *Cylindrospermopsis*) *raciborskii* is of great concern due to its ability to produce toxic compounds for humans and animals. It has been proposed that its success and current presence in different latitudes is due to the development of ecotypes with different niches and different responses to environmental changes. Depending on their geographical origin, their populations are capable of producing alternatively two types of toxins: saxitoxin and analogues (PSP, encoded by the *sxt* genetic cluster) or cylindrospermopsin (CYL, encoded by the *cyr* genetic cluster) or being nontoxic, which has allowed determining geographical patterns of the species. In our country, this species has shown to possess the gene cluster for saxitoxin biosynthesis, being produced in high concentrations. An important aspect that has recently emerged as a relevant variable to explain the success of cyanobacteria is the presence of a microbiota associated to the mucilage, which is mainly an exopolysaccharides-rich matrix surrounding the cyanobacterial filaments. As for other organisms and their microbiota, there is an exchange of nutrients, carbon sources, gases and cellular components, among others, in the mucilage.

So far, it is unknown which variables favor PSP production in *R. raciborskii*, what is its biological and ecological function, as well as its relationship with the microbiota. The main objective of this thesis was to elucidate the role of PSP in the biology and ecology of *R. raciborskii*. For this purpose, a functional approach was followed and genomic, metagenomic and metatranscriptomic studies were combined from laboratory experiments with strains of the species.

Phylogenetic, genomic, phylogenomic analyses in context with the literature led us to propose the origin of the species in central Africa, from where it spread to the different regions where it is currently distributed. In addition, through an experimental approach, it was observed that at low population density the synthesis of different PSP increased significantly and changed its variant profile, which has led us to suggest that these compounds would be part of a communication mechanism among the members of the population. Finally, the microbiome associated with two isolates of *R. raciborskii* belonging to different ecotypes (a PSP-producer and a nontoxic one). We found that the microbiome community assembly is ecotype-dependent, and transcriptomic analyses showed that the main functions performed by the cyanobacteria are related to photosynthesis and carbon fixation, while the microbiome is mostly involved in nitrogen fixation, an important molecule for the production of PSPs.

According to previous studies by other authors, the genes of the *sxt* cluster were acquired by *R. raciborskii* through horizontal gene transfer mainly from bacteria. In this framework, it is plausible to hypothesize that the presence of the *sxt* cluster in South American populations is due to the acquisition of these genes from their microbiome and that PSPs constitute a

communication mechanism between members of the holobiont, perhaps involved in the recruitment and maintenance of the species that make up the microbiome.

Lista de siglas

ADN: Ácido desoxirribonucleico
ANI: Average Nucleotide Identity
ARN: Ácido ribonucleico
ASV: Variante de secuencia del amplicón
BacNaV: Canales de sodio voltaje dependiente en bacterias
BSA: Albúmina de suero bovino
CB: Calvin Benson
CTAB: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
CYL: Cyindrospermopsina
Dc-STX: Decarbamil saxitoxina
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
EMP o glucólisis: Embden-Meyerhof-Parnas
EPS: Exopolisacarido
GTX(1-5): Gonyautoxina
HPLC: Cromatografía líquida de alta afinidad
IIBCE: Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable
NaCl: Cloruro de sodio
NaV: Canales de sodio voltaje dependiente
NeoSTX: Neosaxitoxina
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PSP: Saxitoxina y análogos
qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa, cuantitativo
RT: Retrotranscripción
STX: Saxitoxina
TAE: Bufer Tris, acetate y EDTA
TCA: Ciclo del ácido tricarboxílico
TTX: Tetrodotoxina

1. Introducción general

1.1 Eutrofización de los ecosistemas acuáticos y floraciones de cianobacterias

Las cianobacterias son organismos procariotas fotosintéticos que habitan la Tierra desde hace aproximadamente 2700 millones de años (Schopf, 1994). Tienen gran importancia desde el punto de vista evolutivo ya que son consideradas organismos clave para entender la historia y evolución de la vida en la Tierra (Tomitani et al., 2006; Whitton and Potts, 2000). Son un grupo diverso que incluye formas unicelulares, filamentosas y coloniales (Saker et al., 2009). Están ampliamente distribuidas en ambientes acuáticos y terrestres (Bonilla et al., 2016; Kurmayer and Christiansen, 2009). Su gran plasticidad fisiológica les confiere la capacidad de tolerar un amplio rango de condiciones de temperatura, disponibilidad de luz, nutrientes y por lo tanto colonizan una gran diversidad de ambientes acuáticos (Whitton and Potts, 2000).

Como consecuencia de las actividades antropogénicas, los ecosistemas acuáticos sufren un incremento de la concentración de nutrientes lo que provoca el aumento de la producción primaria y la dominancia progresiva de cianobacterias modificando el funcionamiento del ecosistema (Lampert and Sommer, 2007). Este fenómeno se conoce como eutrofización (Lampert and Sommer, 2007). Este proceso comienza cuando el agua recibe un aporte de nutrientes por encima de los niveles naturales del ambiente tanto de forma natural como artificial principalmente de nitrógeno y fósforo, lo que favorece el desarrollo de floraciones de cianobacterias (Paerl and Huisman, 2009).

Las floraciones de cianobacterias son eventos de crecimiento abrupto de la biomasa en los sistemas acuáticos de una o pocas especies en períodos de horas a días (Aguilera et al., 2023). La biomasa de cianobacterias disminuye significativamente la transparencia del agua y generan anoxia al morir, sedimentar y ser descompuestas por la comunidad microbiana (Paerl et al., 2016, 2001). Como consecuencia de este fenómeno se alteran los ciclos de los nutrientes y la trama trófica acuática. Las floraciones provocan que el olor y sabor del agua sea desagradable debido a los compuestos volátiles que sintetizan y por la liberación de gas sulfhídrico debida a los procesos anóxicos. Esto deteriora la calidad del agua de los ecosistemas acuáticos comprometiéndose el uso tanto para la potabilización y la recreación (Bonilla, 2009; Chorus, 2012; Huisman et al., 2005).

1.2 Cianotoxinas

Las cianobacterias son consideradas un importante riesgo para la salud humana y animal ya que muchas de ellas producen metabolitos secundarios que son tóxicos para los animales. Estos metabolitos se denominan cianotoxinas (Havens, 2008) y causan diferentes afecciones a los organismos acuáticos (Banerjee et al., 2021). Las toxinas que producen las cianobacterias se pueden clasificar de acuerdo con sus propiedades toxicológicas en: neurotoxinas (anatoxina-a, anatoxina-a(S), saxitoxina y análogos), dermatotoxinas o toxinas irritantes (lyngbyatoxinas,

apysiatoxinas y lipopolisacáridos) y hepatotoxinas (microcistinas, nodularinas y cilindrospermopsina)(Carmichael et al., 2001). En la tabla 1 se muestran las distintas cianotoxinas en ambientes de agua dulce y estuarios. Existen registros de intoxicación por cianotoxinas en personas y han sido documentados en Canadá, el Reino Unido y Australia (Chorus and Welker, 2021). En América del sur se registraron casos de intoxicación por microcistina por la utilización de agua contaminada en Caruaru (Brasil en 1996) donde 50 personas murieron en un centro de diálisis (Pouria et al., 1998).

Tabla 1. Características de las principales cianotoxinas producidas por cianobacterias en ambientes continentales. Tabla adaptada del Informe “La floración de algas y su impacto económico”, JRC Technical Informe, 20161) y Chorus, I., & Welker, M. (Eds.). (2021).

Toxinas	Compuesto	Modo de acción	Género
Hepatotoxinas			
Microcistinas	Heptapéptidos cíclicos	Daños hepáticos	<i>Microcystis</i> <i>Planktothrix</i> <i>Oscillatoria</i> <i>Anabaena</i> <i>Anabaena</i> <i>Nostoc</i> <i>Dolichospermum</i>
Nodularina	Pentapéptido cíclico	Similar a las microcistinas	<i>Nodularia</i>
Cylindrospermopsina	Alcaloide guanidínico	Inhibe la síntesis proteica. Produce severas lesiones necróticas en hígado, riñón, pulmón, bazo e intestino de mamíferos	<i>Anabaena</i> <i>Aphanizomenon</i> <i>Raphidiopsis</i> <i>Lyngbya</i>
Neurotoxinas			
Saxitoxinas	Alcaloides no sulfatados (saxitoxinas), monosulfatados (goniautoxinas) o disulfatados (Ctoxinas)	Inhibe la transmisión nerviosa a través del bloqueo de los canales de sodio en las células induciendo parálisis muscular	<i>Anabaena</i> <i>Aphanizomenon</i> <i>Lyngbya</i> <i>Raphidiopsis</i>
Anatoxin-a	Alcaloides	Espasmos musculares, ardor, entumecimiento, somnolencia, salivación, parálisis respiratoria que provoca la muerte.	<i>Anabaena</i> <i>Aphanizomenon</i> <i>Oscillatoria</i> <i>Planktothrix</i>
B-methylamino-L-alanine (BMAA)	Derivado del aminoácido alanina con un grupo metilamino en la cadena latera	Exposición crónica asociada con enfermedades neurodegenerativas informadas por algunos estudios; la discusión científica está en curso	Aparentemente en todas
Dermatoxinas y compuestos irritantes de la piel			

Aplysiatoxin	Terpenoides bis lactona	Irritación de la piel, irritación de las vías respiratorias superiores.	<i>Lyngbya</i>
Lyngbyatoxin	Terpenoides alcaloides	Irritación de piel y ojos, problemas respiratorios.	<i>Lyngbya</i>
Lipopolysaccharide	Gicolipido	Irritación de la piel y los ojos, dolor de cabeza, alergia, irritación de las vías respiratorias superiores, fiebre.	

En Uruguay, la eutrofización ha aumentado en los últimos tiempos como consecuencia de la creciente actividad agrícola-ganadera, industrial y la urbanización (Aubriot and Bonilla, 2018; Goyenola et al., 2021). Como consecuencia de este proceso se favorece la formación de floraciones de cianobacterias tóxicas en sistemas de agua dulce. En 1982 se tuvo el primer registro de floraciones de cianobacterias (principalmente en los meses de verano) y desde entonces se ha comenzado a registrar floraciones en distintos tipos de ambientes acuáticos (Bonilla et al., 2015; CARP, 1989; Conde et al., 2009; De Leon and Yunes, 2001; Haakonsson et al., 2017; Kruk et al., 2023, 2019; Scasso et al., 2001). Este fenómeno es preocupante ya que se ha vuelto frecuente en diversos sistemas acuáticos de Uruguay como ríos (Río Uruguay), estuarios (Río de la Plata), lagos y lagunas (Conde et al., 2009; De Leon and Yunes, 2001; Kruk et al., 2019; Vidal and Kruk, 2008)

1.3 *Raphidiopsis raciborskii*

Raphidiopsis raciborskii (género *Nostocales*), antes conocida como *Cylindrospermopsis raciborskii*, es una de las cianobacterias filamentosas productoras de cianotoxinas más estudiadas (Briand et al., 2004; Burford et al., 2018, 2016; Moreira et al., 2015) (Figura 1). Fue reportada por primera vez en 1912 en Java, Indonesia (Woloszynka, 1912). Es una especie filamentosa, posee heterocistos y se encuentra tanto en regiones tropicales, subtropicales (Briand et al., 2004; Padisák, 1997; Saker et al., 2003) así como también en climas templados donde la temperatura está por debajo de la óptima para estos microorganismos (Fabre et al., 2010).

Algunos autores proponen que el éxito de esta especie se debe probablemente a su gran plasticidad ya que es capaz de crecer en un amplio rango de luz y temperatura (Bonilla et al., 2012b; Dokulil, 2016), bajo diferentes escenarios de disponibilidad de nutrientes (Amaral et al., 2014; Rigamonti et al., 2018) o directamente por la presencia de ecotipos con distintas preferencias ambientales (Briand et al., 2004; Gugger et al., 2005; Claudia Piccini et al., 2011). Asimismo, otros autores también proponen que el éxito que ha tenido en la expansión puede estar favorecido por el calentamiento global (Briand et al., 2004).

R. raciborskii es un organismo diazotrofo facultativo por lo que puede alternativamente usar nitrógeno a través de la fijación del nitrógeno de la atmósfera o a partir de la asimilación de compuestos nitrogenados inorgánicos. Esta característica permite que la especie prospere en

sistemas con bajas concentraciones de nitrógeno disuelto (Dokulil and Teubner, 2000). En nuestro país se han detectado floraciones de *R. raciborskii* en lagos someros de Maldonado y Canelones destinados a la potabilización y la recreación (Vidal and Kruk, 2008).

Se ha descrito que esta especie es capaz de sintetizar dos tipos diferentes de cianotoxinas que son tóxicos para los animales y humanos: cilindrospermopsina (CYL) y saxitoxinas (STX) (Griffiths and Saker, 2003; Néstor Lagos et al., 1999)(Tabla 1, Figura 2).



Figura 1. Microfotografía de *R. raciborskii* (400 aumentos) (Foto: Paula Vico).

1.4 Características de las toxinas producidas por *R. raciborskii*

La CYL es un alcaloide de guanidina cíclica (Figura 2a), es genotóxica, mutagénica y posee efectos cancerígenos (Falconer and Humpage, 2001). Además, inhibe el glutatión, la síntesis de proteínas y el citocromo P450 (van Apeldoorn et al., 2007) causando síntomas patológicos en el hígado, los riñones, el bazo, el timo y el corazón (Hawkins et al., 1997). Su síntesis está codificada por el clúster génico *cyr* que abarca 43 kb y 15 marcos de lectura abiertos que contienen los genes necesarios para la biosíntesis, regulación y exportación de la toxina (Mihali et al., 2008). El *cluster* de genes *cyr* del género Nostocales comprende un reordenamiento de 2 policistrones, *cyrA-cyrB-cyrE* y *cyrDcyrK*, más una sección de un solo gen que incluye *cyrC* (Jiang et al., 2011). Estos tres operones podrían estar sujetas a diferentes mecanismos regulatorios y esto podría explicar por qué hay diferentes factores que regulan la producción de CYL reportados por diferentes trabajos (Rigamonti et al., 2018). Entre las variantes de CYL se incluyen 7-epi-CYL y 7-desoxi-CYL (Ohtani et al., 1992; Banker et al., 2001; Li et al., 2001) y su producción se ha asociado a varias especies Nostocales, como *R. raciborskii*, *Umezakia natans*, *Aphanizomenon* sp., *Raphidiopsis curvata* y *Anabaena bergii*, así como en Oscillatoriales, *Lyngbya wollei* (Dittmann et al., 2013).

La STX es una perhidropurina tricíclica (alcaloide) (Figura 2.b) que puede ser sustituida en varias posiciones compartiendo este núcleo tricíclico para la cual se han reportado más de 57 análogos (Raposo et al., 2020; Wiese et al., 2010) (Tabla 2). La STX más los análogos son

también conocidos como “toxinas paralizantes de moluscos” o PSP por su sigla en inglés (Paralytic Shellfish Poisoning) (Griffiths and Saker, 2003; Lagos et al., 1999). Son potentes neurotoxinas que actúan inhibiendo los canales dependiente del voltaje en vertebrados, como sodio, potasio y calcio (Cestèle and Catterall, 2000). Una sola molécula de toxina puede interactuar con un único canal de Na (NaV) y puede bloquear con igual éxito canales en reposo, activos o inactivos desde el lado extracelular de la membrana plasmática impidiendo la entrada de Na (Cestèle and Catterall, 2000; Pomati et al., 2004b). Son moléculas pequeñas de bajo peso molecular (típicamente entre 200 y 600 Da) y hasta el momento no han sido reportadas formando parte de complejos macromoleculares. Tienen dos grupos de guanidinio que le confieren una o dos cargas positivas a pH fisiológico, dicha característica química tiene importantes implicaciones en relacion su toxicidad (Durán-Riveroll and Cembella, 2017). Las PSP han sido reportadas en dinoflagelados marinos (Shimizu, 2003) en cianobacterias filamentosas (Lagos et al., 1999) y en ciertas bacterias heterótrofas (Gallacher and Smith, 1999). En ambientes de agua dulce, las toxinas PSP están casi exclusivamente asociadas a cianobacterias (Pomati et al., 2000). Es interesante destacar que, aunque la biosíntesis de las PSP es compleja y aparentemente única, todos los organismos que la producen emplean aparentemente la misma ruta biosintética (Shimizu, 2003).

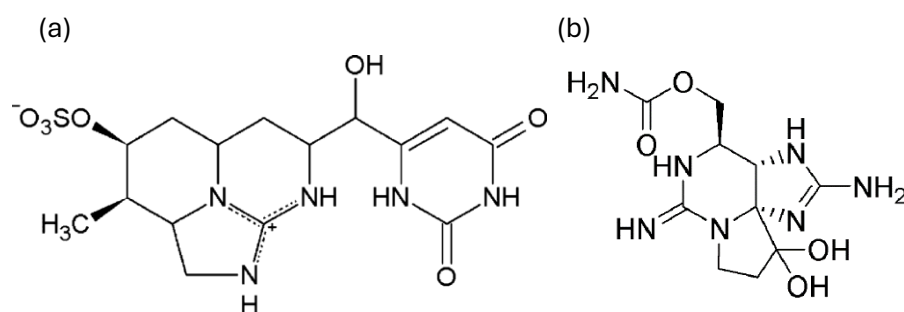
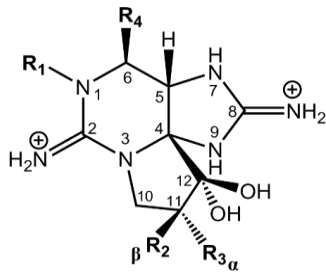


Figura 2. Estructura química de las moléculas (a) Cylindrospermopsina (CYL) y (b) Saxitoxina (STX)

Tabla 2. Estructura de las PSP. STX: saxitoxina, GTX: gonyautoxina. Tomado y adaptado (M. Raposo et al., 2020)



ESTRUCTURA BASICA

Group	Toxin	R1	R2	R3	R4
Carbamoil	STX	H	H	H	
	NeoSTX	OH	H	H	
	GTX1	OH	H	OSO ⁻³	
	GTX2	H	H	OSO ⁻³	
	GTX3	H	OSO ⁻³	H	
	M2 M4	H H	OH OH	H OH	
Decarbamil (dc)	dcSTX	H	H	H	
	dcNeoSTX	OH	H	H	
	dcGTX1	OH	H	OSO ⁻³	
	dcGTX2	H	H	OSO ⁻³	
	dcGTX3	H	OSO ⁻³	H	
	dcGTX4	OH	OSO ⁻³	H	
	■ LWTX4	H	H	H	
N-sulfocarbalmil	GTX5 (B1)	H	H	H	
	GTX6 (B2)	OH	H	H	
	C1	H	H	OSO ⁻³	
	C2	H	OSO ⁻³	H	
	C3	OH	H	OSO ⁻³	
	C4	OH	OSO ⁻³	H	
	M1 M3	H H		OH OH	H OH
Mono-hydroxibenzoato	GC1	H		H	OSO ⁻³
	GC2	H		OSO ⁻³	H
	GC3	H		H	H
	*GC4	OH		H	OSO ⁻³
	*GC5	OH		OSO ⁻³	H
Di-hidroxibenzoato	#GC1a	H	H	OSO ⁻³	
	#GC2a	H	OSO ⁻³	H	
	#GC3a	H	H	H	Di-hydroxy-benzoato
	#GC4a	OH	H	OSO ⁻³	Análogo
	#GC5a	OH	OSO ⁻³	H	
	#GC6a	OH	H	H	
Benzoato - sulfatado	#GC1b	H	H	OSO ⁻³	
	#GC2b	H	OSO ⁻³	H	
	#GC3b	H	H		
	#GC4b	OH	H	OSO ⁻³	
	#GC5b	OH	OSO ⁻³	H	
	#GC6b	OH	H	H	
Desoxidecarbamil	doSTX	H	H	H	
(do)	doGTX2	H	H	OSO ⁻³	
	doGTX3	H	OSO ⁻³	H	CH ₃
Acetato	■ LWTX1	H	H	OSO ⁻³	
	LWTX2	H	H	OSO ⁻³	
	LWTX3	H	OSO ⁻³	H	
	LWTX5	H	H	H	

1.5 Distribución geográfica de las toxinas en *R. raciborskii*

R. raciborskii puede alternativamente producir CYL o PSPs (STX y análogos) (Figura 2). Hasta el momento no se han reportado cepas capaces de producir ambas toxinas a la vez. La toxicidad, concentración y variedad de toxinas de *R. raciborskii* difiere entre cepas de diferentes continentes donde se observa una asociación entre la distribución geográfica de las especies y el tipo de toxina producida. En ese sentido, las poblaciones productoras de CYL han sido reportadas en cepas provenientes de Australia, Nueva Zelanda y Asia (Chonudomkul et al., 2004; Griffiths and Saker, 2003; Neilan et al., 1997), mientras que las cepas provenientes de África y de la zona norte de América del Norte no producen toxinas (Fastner et al., 2003; Mowe et al., 2014; Yilmaz et al., 2008). Las únicas cepas reportadas como productoras de STX han sido aisladas de América del sur (Uruguay y Brasil)(Piccini et al., 2011). En Europa, aunque la presencia de CYL en ecosistemas acuáticos se ha relacionado con el dominio de *R. raciborskii*, hasta el momento ninguna cepa ha sido identificada positivamente como productora de CYL (Bernard et al., 2003; Fastner et al., 2003; Griffiths and Saker, 2003, Gkelis y Zaoutsos, 2014; Đorđević et al., 2015). Se ha propuesto entonces que los patrones geográficos exhibidos por las toxinas de *R. raciborskii* podrían explicarse por su alto nivel de plasticidad ecofisiológica (Bonilla et al., 2012) y por la presencia de ecotipos con diferentes requisitos ambientales (Briand et al., 2004; Gugger et al., 2005; Piccini et al., 2011).

1.6 Organización del *cluster* de genes *sxt*

El *cluster* genético involucrado en la síntesis de saxitoxina (*sxt*) en *R. raciborskii* es muy antiguo y se ha propuesto que data de aproximadamente 2100 Ma (Mihali et al., 2009). Tiene una estructura de mosaico y los distintos genes se habrían ido incorporando a lo largo de la evolución en segmentos de tamaño variable (Mihali et al., 2009). Se trata de una estructura de 35 kb que codifica 26 proteínas (Kellmann et al., 2008) que se ha encontrado en los géneros *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Raphidiopsis*, *Raphidiopsis*, *Tolypothrix* y *Scytonema* del orden Nostocales y *Lyngbya wollei* del orden Oscillatoriales (Belykh et al., 2016; Cullen et al., 2018; Néstor Lagos et al., 1999; Mihali et al., 2011; Wiese et al., 2010). El *cluster* contiene los genes *sxtABDGHJKOSTUVWZ* (Kellmann et al., 2008; Mihali et al., 2009; Pearson et al., 2010; Soto-Liebe et al., 2010). Los genes *sxtCLNX* codifican para una supuesta hidroxilasa, descarbamolasa, sulfotransferasa y actividades hidroxilasa, las que en teoría intervienen en la producción de análogos. La función de cada gen fue predicha mediante estudios bioquímicos e in

sílico en la cepa de *R. raciborskii* T3 aislada en Brasil (Kellmann et al., 2008; Stucken et al., 2010). Los análogos de STX producido por los diferentes genes, dan como resultado diferentes perfiles de toxinas entre especies o cepas (Stucken et al., 2010).

Los estudios evolutivos sobre PSP han propuesto que la toxicidad sería un rasgo ancestral perdido secundariamente en algunos linajes (Moustafa et al., 2009; Orr et al., 2013). La diversidad de los análogos de PSP sintetizados por todas las especies productoras indicaría que este *cluster* ha tenido cambios evolutivos significativos (Murray et al., 2011). En la Figura 3 se muestra el *cluster* de genes de saxitoxina descrito por Kellmann et al., 2008 para la cepa T3 de *R. raciborskii*. Si bien hay varios estudios en relación con el *cluster* génico y la biogeografía de PSP, la presencia de cepas no tóxicas es algo que no ha sido muy estudiado. La estructura, organización y similitud de secuencia del del *cluster sxt* parece reflejar la filogenia de los organismos productores de PSP, lo que sugiere eventos de transferencia vertical determinados por la selección purificadora (Murray et al., 2011). Sin embargo, la distribución filogenética irregular también puede explicarse en múltiples e independientes eventos de transferencia horizontal de genes (Moustafa et al., 2009). En ambos casos, se observan diferencias relativamente menores en la composición de los *cluster* de genes *sxt* y esto puede deberse a deleciones, reordenamiento, duplicación y/o recombinación de genes (Murray et al., 2011) donde la movilidad de los genes de las toxinas puede ser responsable de los perfiles de toxinas observados en diferentes especies o cepas de cianobacterias (Wang et al., 2016).

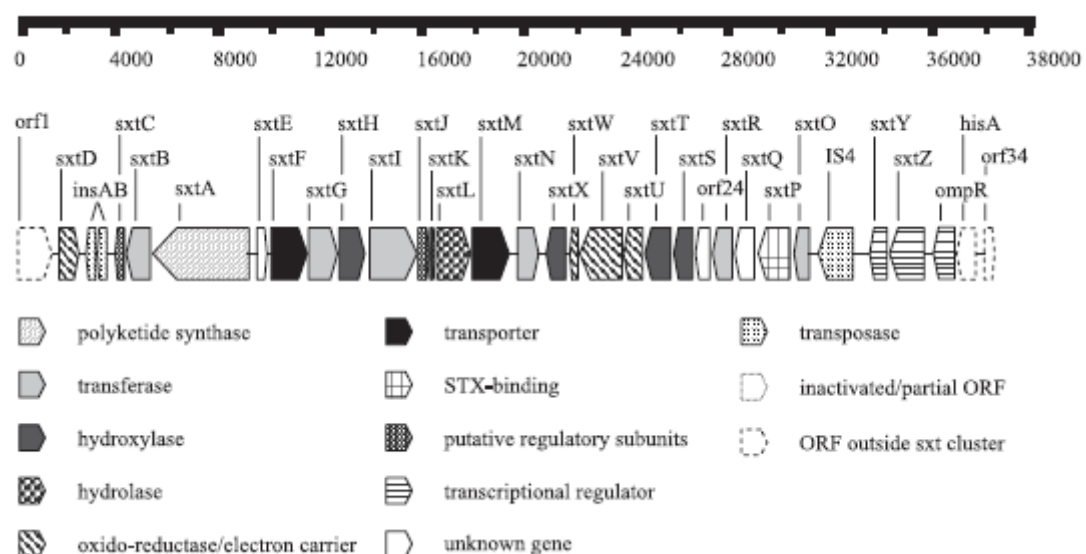


Figura 3. Estructura organizacional del *cluster* de genes de *sxt* para *R. raciborskii* cepa T3 (Kellmann et al. 2008).

1.7 Saxitoxina: algunos componentes de su ruta metabólica

La síntesis de saxitoxina es una compleja ruta multienzimática y es la primera vía de alcaloides no terpenos descrita para bacterias. El inicio de la síntesis de saxitoxina involucra a una nueva clase de poliquétido sintetasa (PKS) que realiza la metilación de un acetato y la reacción de condensación de *Claisen* entre propionato y arginina, aminoácido que da inicio a la síntesis de STX. Desde el descubrimiento de la agrupación de genes de saxitoxina en *R. raciborskii* T3, Kellmann et al. (2008) indicaron que tiene un dominio típico de PKS sintetasa-incrustado en una proteína de fusión y que a su vez contiene un dominio de aminotransferasa (*sxtA*). El gen que inicia la biosíntesis es justamente *sxtA* y se postula que tiene un origen quimérico. Los productos del gen *sxtA* catalizan la incorporación del acetato al complejo de la enzima, su metilación posterior y la condensación de *Claisen* con arginina. Los pasos que siguen involucran enzimas que catalizan la formación de tres heterociclos y varias reacciones que resultan en numerosas isoformas de STX (Kellmann et al., 2008; Soto-Libe et al., 2010). Los tres heterociclos de STX se forman por reacciones desconocidas y el intermediario resultante es metilado para formar una *cadena lateral* (Figura 4: paso 4), el cual es hidroxilado a través de un epóxido (Figura 4: paso 5 y 6), y transformado en un aldehído terminal. El grupo aldehído terminal que es reducido (Figura 4: paso 7 y 8), y luego O-carbamilado. Finalmente, uno de los carbonos del anillo (C-12) recibe dos grupos hidroxilos dando lugar a la toxina) (Figura 4).

La biosíntesis de STX es catalizada por enzimas poco comunes en el metabolismo microbiano. Uno de los genes presentes en la biosíntesis de STX es *sxtU*, el cual tiene una secuencia similar a la de la enzima alcohol deshidrogenasa de cadena corta. La enzima de función conocida con mayor similitud a esta secuencia es la clavaldehído deshidrogenasa. Se predijo que el producto del gen *sxtU* reduciría al grupo aldehído terminal de un precursor de STX (Kellmann et al., 2008) (Figura 4: compuesto E). La acción de *sxtD*, *sxtS* y *sxtU* sería responsable de la hidroxilación y biocatalización del compuesto B hasta el E (Figura 4). La detección del compuesto F indica que la reacción final que dirige la producción completa de la molécula de saxitoxina es la O-carbamilación, sin embargo, la secuencia actual de la reacción final que indican Kellmann et al., (2008) a través de *sxtI*, es aún desconocida.

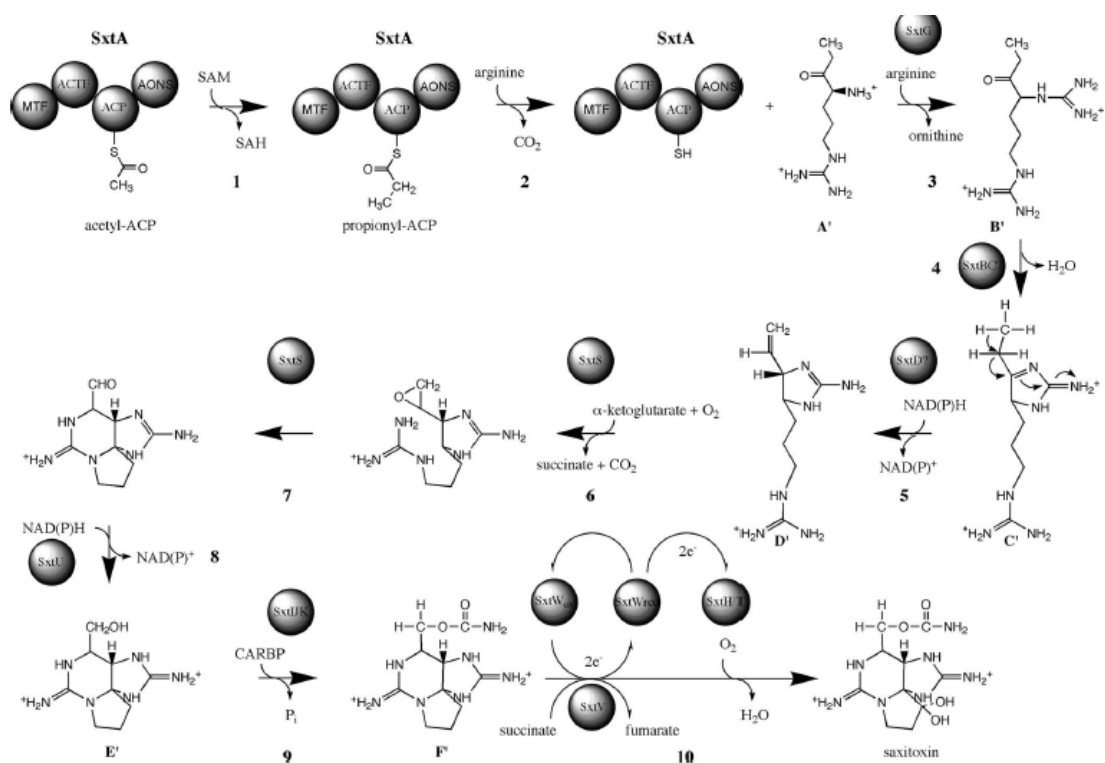


Figura 4. Vía de biosíntesis de STX y las funciones de los genes putativos de STX. Ver texto por descripción (Kellmann et al., 2008).

1.8 Papel biológico y ecológico de las PSP en *R. raciborskii*

En los últimos años los metabolitos que producen las cianobacterias están recibiendo una mayor atención desde el punto de vista químico y toxicológico ya que tienen potencial biomédico (Buratti et al., 2017; Cartmell et al., 2017; Holland and Kinnear, 2013; Rzymiski et al., 2017). Sin embargo, es desconocida su función en la naturaleza pese a que su biosíntesis es muy antigua. Para el caso de *R. raciborskii*, estudios relacionados al posible papel de las PSP han aumentado rápidamente en las últimas dos décadas, especialmente en el hemisferio sur, donde las cepas tóxicas son frecuentes. Mientras que las CYL serían producidas constitutivamente el papel ecológico o fisiológico de las PSP no está tan claro. En *R. raciborskii* se sabe que en un mismo ambiente varias cepas con diferente perfil de toxicidad pueden coexistir lo que muestra que, si bien la toxicidad puede ser un rasgo importante para la supervivencia, no es esencial (Burford et al., 2014; Sinha et al., 2014; Willis et al., 2016). Además, se desconoce su papel en la dinámica poblacional de estos organismos en el ambiente o en la propia fisiología de la cianobacteria. Por lo tanto, a lo largo de estos años, se han propuesto diferentes teorías y se han ensayado diferentes variables ambientales que podrían estar involucradas en la producción de STX. En un principio se propuso que la producción de toxinas era un mecanismo de defensa química contra la depredación

(Holland and Kinnear, 2013; Vining, 1992). Sin embargo, esta hipótesis ha sido descartada ya que se sabe que las cianobacterias y sus toxinas son anteriores al linaje de los metazoos que divergieron aproximadamente hace 1.500 millones de años (Murray et al., 2011). Dentro de las variables ambientales involucradas en la síntesis, se ha estudiado a la temperatura (Briand et al., 2004; Castro, 2004; Chonudomkul et al., 2004; Recknagel et al., 2014; Soares et al., 2013), la intensidad de la luz (Briand et al., 2004; Carneiro et al., 2013; Griffiths and Saker, 2003), la concentración de iones en el agua y los valores de pH (Carneiro et al., 2011; Pomati et al., 2004a) y la relación entre el nitrógeno y fósforo (Ammar et al., 2014; Burford et al., 2006; Chislock et al., 2014; Stucken et al., 2014a) entre otras. En relación con los nutrientes, nuestro grupo de trabajo observó que la abundancia relativa de transcriptos de genes del *cluster sxt* aumenta significativamente independientemente de la disponibilidad de nitratos en el medio de cultivo (Vico et al., 2016). En ese sentido, hemos propuesto que la síntesis de STX estaría relacionada el crecimiento y no con las diferentes fuentes de N (Stucken et al., 2014) expresándose de forma constitutiva (Vico et al., 2016).

Por otro lado, en relación con la concentración de iones en el agua se ha visto que en cianobacterias el mantenimiento de niveles de sodio intracelular no tóxico ($[Na^+] < 10mM$) y el pH neutro, se logra mediante la acumulación neta de protones (H^+) acoplados al sistema de flujo del Na^+ (transportadores *antiporter* Na^+/H^+) (Lengeler et al., 1999). La captación de sodio se da por una fuerza protón motriz (Waditee et al., 2001) donde ingresa el Na^+ en condiciones alcalinas por un sistema sodio/soluto (transportadores *symporters*), canales de cationes o canales de Na^+ regulados por pH (Krulwich et al., 2001) (Figura 5). Entonces si los flujos de Na^+ responden a determinados bloqueadores (como las PSP) en células eucariotas, es esperable que puedan responder de forma similar en células procariotas (Pomati et al., 2004b). Si esto es así, aquellas cepas capaces de producir esta toxina podrían utilizarla como un mecanismo de osmo-protección y tendrán una mejor adecuación al ambiente frente a variaciones de la salinidad en el medio, en comparación a las cepas que no producen toxina. Bajo esta premisa, se ha propuesto que la concentración de Na^+ podría estar relacionado a la síntesis de STX.

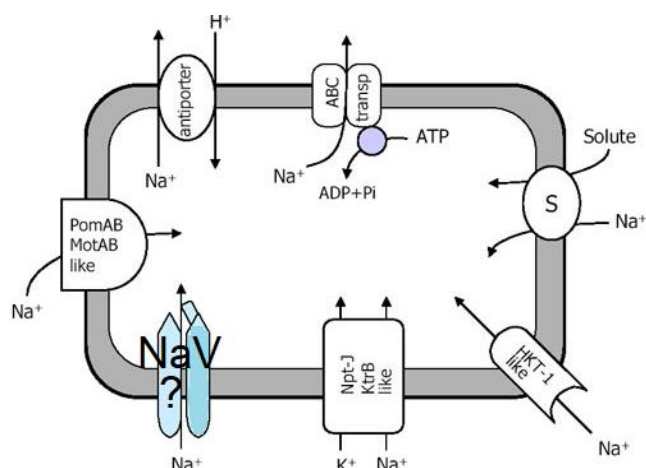


Figura 5. Representación de los elementos con papel definido en el ciclo de Na^+ en células procariotas. Los iones pueden eliminarse del citosol ya sea por intercambiadores de H^+ o por ATP dependientes o por transportadores de sodio tipo ABC. La captación de Na^+ puede lograrse mediante importadores de sodio/soluto y canales catiónicos, como NtpJ-, KtrB-, y proteínas similares a MotAB/PomAB y HKT-1 (Krulwich et al 2001, Kanesaki et al 2002). Homólogos de estas moléculas están presentes en las cianobacterias (Waditee R, et al 2002). La existencia de un canal de NaV plantea la hipótesis de que la STX puede estar relacionada con un mecanismo osmoprotector frente a variaciones de Na^+ en el medio. Adaptado de (Pomati et al., 2004a).

1.9 Interacción Cianobacteria-microbioma

Otro aspecto interesante poco estudiado que involucra a las cianobacterias son las bacterias heterótrofas (microbioma) que tienen asociadas que les proporcionan nutrientes y contribuyen a la re-mineralización de la materia orgánica. Las cianobacterias tienen una microzona rica en polisacáridos fuera de la pared celular que rodea las células filamentosas o colonias, que están colonizadas con bacterias heterótrofas. En esta microzona denominada la ficósfera (Bell and Mitchell, 1972), los metabolitos se intercambian fácilmente antes de su difusión al agua y representan lugar central de encuentro entre bacterias (Seymour et al., 2017) (Figura 6). Las interacciones que ocurren entre organismos individuales dentro de la ficósfera tienen a nivel del ecosistema un efecto en varios procesos como por ejemplo en ciclo de carbono, en los nutrientes y en la biosíntesis de toxinas entre otras. Un aspecto importante para explicar el éxito de las cianobacterias es la presencia de un microbioma que se propone es fuente relevante de funciones metabólicas, generando que ambas partes sean mutuamente dependientes para sobrevivir. En ese sentido, la estrecha asociación entre cianobacterias y bacterias que se produce en la ficósfera puede ser una estrategia para lograr un mayor número de genes y funciones para hacer frente y prosperar a través de

una variedad de condiciones ambientales. Una de las hipótesis que explica la fortaleza de esta asociación holobionte refiere a que las cianobacterias tienen genomas pequeños que no codifican para todas sus necesidades, siendo estas suplidas por las bacterias presentes en la ficosfera (Humbert et al., 2013). Si bien, el hecho de tener menos genes se podría traducir en un menor número de funciones metabólicas, esto podría ser una ventaja selectiva si se logra que el producto de esas funciones sea provisto por otros organismos (Giovannoni et al., 2014). De esta manera, se comparten los “bienes” y se maximiza el número de funciones necesarias para la supervivencia y éxito del holobionte. El concepto de bien común propone que la selección natural actúa para encontrar esa función disponible en la comunidad (Morris et al., 2011; Pande and Kost, 2017). Como los metabolitos están disponibles en el medio, las bacterias pueden adaptarse a perder la función biosintética para producir el metabolito correspondiente (Pande and Kost, 2017). Así, las especies de bacterias capaces de co-evolucionar en sinergia e interacción constituyen el microbioma de una comunidad análogo al concepto de microbioma descrito para humanos (Cook et al., 2020).

Esto ha sido abordado en la cianobacteria *Microcystis* sp., donde se ha visto que microbiomas de floraciones de lagos en diferentes latitudes comparten una gran cantidad de genes funcionales a pesar de diferencias taxonómicas en la comunidad (Jankowiak and Gobler, 2020). Como consecuencia, los cambios a nivel taxonómico serían funcionalmente equivalentes y garantizarían la permanencia de los procesos metabólicos esenciales. Otros autores encontraron también para *Microcystis* sp que hay diferencias en la composición de comunidad y en las funciones bacterianas entre la forma colonial y unicelular (Shi et al., 2022).

Por lo tanto, se puede considerar el sistema hospedero-microbioma (cianobacteria-microbioma) como un holobionte compuesto por el hospedero y sus microorganismos simbióticos (Rosenberg and Zilber-Rosenberg, 2013). El mucílago producido por las cianobacterias es rico en polisacáridos de distinta composición, es la fuente de carbono principal para el microbioma heterótrofo que vive inmersa en él y su síntesis depende de las características funcionales de la cianobacteria. Es plausible por tanto esperar que la estructura del microbioma asociado al mucílago de *R. raciborskii* esté condicionada principalmente por las características funcionales de la especie de cianobacteria, que en última instancia dependen de las condiciones ambientales en las que ésta se encuentra.

Si bien se ha propuesto que el éxito de *R. raciborskii* en tolerar, colonizar y adaptarse a diferentes condiciones ambientales (temperatura, luz y nutrientes) se debe a una

estrategia que combina plasticidad fenotípica (Bonilla et al., 2016, 2012b; Soares et al., 2013; Willis et al., 2018) y existencia de ecotipos con distintas preferencias ambientales (Piccini et al., 2011), se desconoce cómo afectan los cambios ambientales a la estructura del microbioma y cuál es la relación entre ambos.

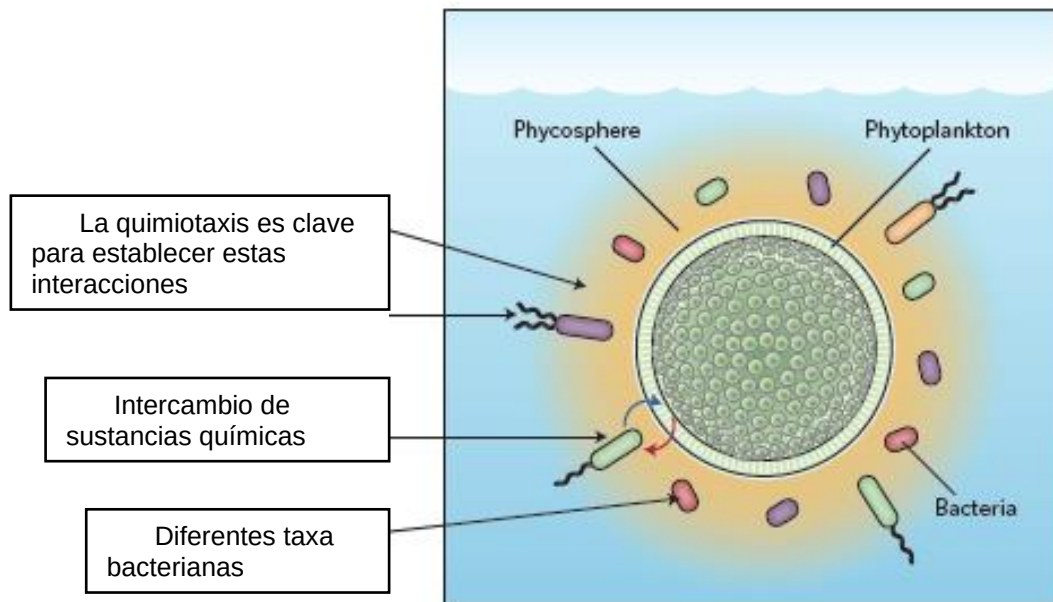


Figura 6. La ficósfera definida como la región que rodea una célula de fitoplancton y que está enriquecida con sustratos orgánicos exudados por la célula, es un microambiente importante para las bacterias acuáticas planctónicas. Adaptado de Seymour et al., 2017

Objetivo general

Dilucidar el papel que juega la presencia de PSP en la biología y ecología de *R. raciborskii*

Objetivos específicos

1- Develar el origen y rutas de dispersión de *R. raciborskii* a partir de estudios genómicos y filogenéticos (Capítulo 1).

2- Determinar qué variables abióticas (por ej. estrés osmótico) y bióticas (densidad poblacional) afectan la producción de PSPs en *R. raciborskii* (Capítulo 2).

3- Analizar el microbioma de *R. raciborskii*, identificando cuáles son las funciones relevantes que aporta cada integrante del holobionte (Capítulo 3).

Estructura de la tesis

En esta tesis se trabajó combinando herramientas filogenómicas, metagenómicas y de metatranscriptómica se buscó inferir el rol biológico de las PSP y la relación funcional que puede existir entre la comunidad de bacterias asociadas y la cianobacteria mediante abordajes experimentales. Para ello se realizaron experimentos de laboratorio con cepas de cultivos de *R. raciborskii* provenientes de dos regiones distantes (América del Sur y América del Norte), siendo una cepa productora de PSP y otra no tóxica. Los resultados se presentan en tres capítulos (Figura 7):

Capítulo 1: Se presenta un modelo conceptual basado en datos genómicos y de toxicidad, así como información de la literatura para explicar la distribución geográfica actual de la especie. Para ello, se reconstruyó la historia del grupo de genes *sxt* a través de un enfoque combinado que involucra la caracterización genómica del clúster de *R. raciborskii* y su toxicidad, a lo largo de las Américas. Además, se realizó un análisis filogenético del género basado en genomas publicados y secuencias espaciadoras intergénicas ribosómicas. Este capítulo se publicó en la revista *Molecular Phylogenetics and Evolution* Volume 148, Julio 2020, 106824

Capítulo 2: Se exploran dos hipótesis relacionadas con el posible rol biológico que tiene la STX en *R. raciborskii*. Por un lado, se propone a la STX como una molécula osmoprotectora frente a un estrés salino. Por otro lado, se plantea que la STX tiene un posible rol relacionado a la comunicación celular. Para ello, se realizaron experimentos con cultivos de laboratorio en condiciones controladas donde se evaluó la expresión y producción de STX según el diseño experimental diagramado.

Capítulo 3: La hipótesis a contrastar tiene que ver con la relación que hay entre el microbioma y la cianobacteria. Para ello, se hizo un análisis metatranscriptómico de la comunidad asociada al mucílago de *R. raciborskii*, donde se identificaron los géneros más activos y las principales funciones que realiza el microbioma y la cianobacteria. Parte de este capítulo, correspondiente a la descripción del microbioma asociada a la cepa MVCC19 y LB2897I, ha sido publicado en la revista Biodiversity Data Journal (<https://doi.org/10.3897/BDJ.9.e72514>) y se generará un segundo manuscrito a partir de la información metatranscriptómica obtenida.

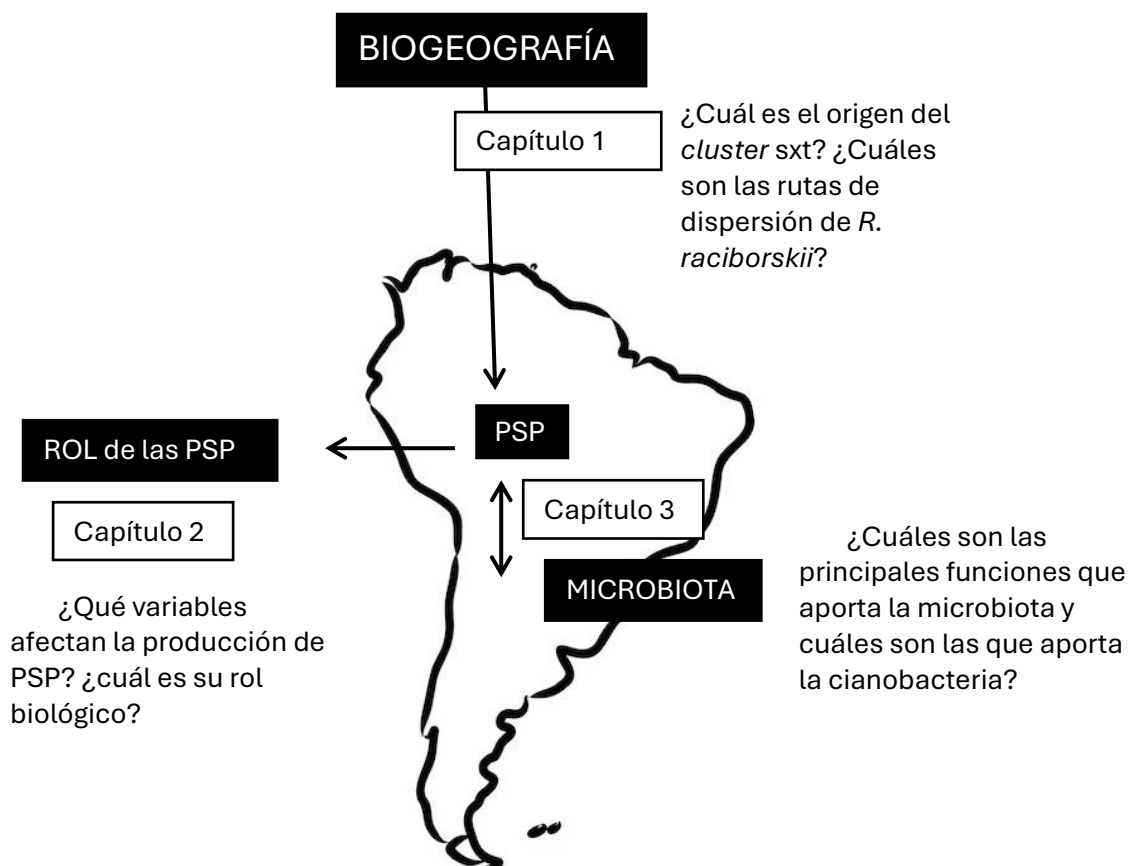


Figura 7. Diagrama general de la tesis.

Capítulo 1

Biogeografía de *R. raciborskii*: integración de datos genómicos, filogenéticos y de toxicidad

1.1 Resumen

La cianobacteria *Raphidiopsis* (*Cylindrospermopsis*) *raciborskii* (orden Nostocales), produce ya sea la citotoxina cilindrospermopsina (CYL) en cepas aisladas en Oceanía, Asia y Europa, la neurotoxina saxitoxina (STX) y análogos (PSP) en cepas aisladas en América del Sur (*cluster* genético *sxt*) y no produce toxinas en cepas provenientes de África. Sin embargo, este patrón geográfico particular generalmente se pasa por alto en las hipótesis actuales sobre las rutas de dispersión de las especies. En este capítulo, combinamos análisis genómicos, filogenéticos, datos de toxicidad y un estudio de la literatura disponible para determinar la historia evolutiva y propagación de la especie. La filogenia basada en 354 genes ortólogos de todos los genomas del orden Nostocales disponibles y las secuencias del gen del espaciador ribosomal intergénico (ITS) mostraron dos clados bien definidos: uno americano, que posee las cepas productoras de PSP; y otro caldo Oceanía/Europa/Asia, que posee las cepas productoras de CYL. Por lo tanto, proponemos una ruta de propagación de la especie donde África central sería el centro de dispersión original (donde están las poblaciones no tóxicas), llegando a África del sur y América del Norte (en el antiguo continente de Laurasia). La capacidad de producir CYL probablemente tuvo lugar en poblaciones que avanzaron al África subsahariana y luego a Oceanía y América del Sur. Por otro lado, observando el contexto genómico del *cluster sxt* encontrado en cepas productoras de PSP, proponemos que este rasgo fue adquirido por transferencia horizontal de genes una vez en América del Sur, donde se perdió la capacidad de producir CYL.

1.2 Introducción

Para explicar su origen y dispersión de *R. raciborskii* a lo largo de los años distintos autores han propuesto diferentes hipótesis. La primera propuesta la hizo Padisák (1997) quien, en base a las características de la especie, datos epidemiológicos e hidrológicos propuso dos orígenes. Por un lado, un origen primario de dispersión en los lagos africanos, donde ésta especie se habría extendido hacia Indonesia y Centroamérica. Esto sería la consecuencia de la presencia de una gran diversidad de cepas en los lagos africanos, donde *R. raciborskii* se adaptó a bajas concentraciones de nitrógeno y fósforo. Luego, desde dichos lagos se habrían dispersado a las regiones

tropicales de América Central e Indonesia. Por otro lado, un origen secundario en Australia, desde donde se produjo una expansión posterior mediante dos rutas: una a través del Océano Pacífico hacia América del Norte y del Sur, y una segunda a Asia Central y Europa (Figura 1.1).

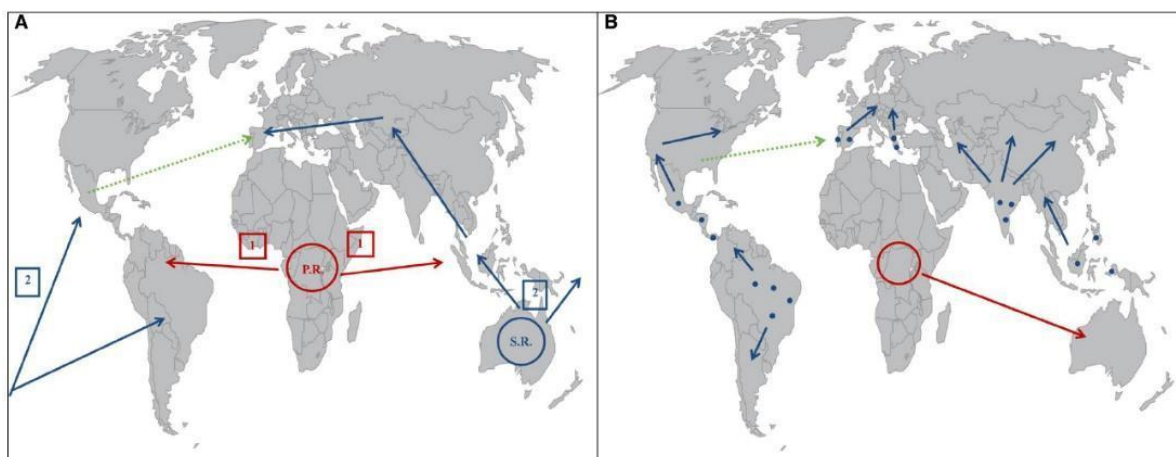


Figura 1.1. (A) Rutas de expansión global de *R. raciborskii* según Padisák (1997) con un origen primario (P.R.) en África y un origen secundario (S.R.) en Australia. La flecha verde representa los movimientos migratorios posteriores, según Cirés et al. (2014). (B) Rutas de expansión global de *R. raciborskii* según Haande et al. (2008). Los puntos azules representan hipotéticas zonas de refugio más cálidas en los continentes euroasiático y americano, y las flechas azules representan la expansión continental de *R. raciborskii* desde esas áreas. La flecha roja representa la expansión de *R. raciborskii* desde el continente africano hasta Australia. La flecha verde representa los movimientos migratorios posteriores, según Cirés et al. (2014). (Figura tomada de Antunes et al., 2015).

En el trabajo de Haande et al., 2008 también se propuso a África como centro primario de dispersión. Desde allí, su expansión habría sido hacia el Mediterráneo y Norteamérica y al resto de Europa desde Asia y Australia (Panou et al., 2018). Por el contrario, Moreira et al., (2015) propusieron un origen alternativo de *R. raciborskii*. Estos autores proponen a América como el principal centro de dispersión, desde el cual las especies se habrían extendido hacia África. Según algunos autores, esta expansión geográfica probablemente tuvo lugar gracias a un proceso dinámico de variación del genotipo dominante de *R. raciborskii* (Chonudomkul et al., 2004). De hecho, se ha propuesto que la variabilidad fenotípica y genética de *R. raciborskii* se explicaría por la existencia de diferentes ecotipos, que serían seleccionados localmente por diferentes filtros ambientales (Piccini et al., 2011).

Por lo tanto, las diferentes rutas de migración global propuestas están a favor de estos supuestos planteados (Gugger et al., 2005; Haande et al., 2008; Padisák, 1997).

La dispersión global de *R. raciborskii* y la falta de conocimiento sobre el papel biológico de las neurotoxinas son aspectos críticos que necesitan más estudios para avanzar en la comprensión del éxito de esta especie en los ambientes límnicos. La elucidación de los mecanismos subyacentes al patrón geográfico observado en la producción de toxinas en *R. raciborskii* requiere estudios genómicos que incluyen cepas de diferentes partes del mundo. Debido a que la presencia de las PSP está restringida a las cepas americanas, el objetivo de este capítulo fue, en primer lugar, investigar la evolución de la historia del grupo de genes *sxt*. Esto se llevó a cabo a través de un enfoque combinado que involucra la caracterización genómica de dos cepas americanas y una búsqueda en la literatura datos de toxicidad de *R. raciborskii* a lo largo de las Américas. Para ello se realizó un análisis filogenético del género basado en genomas publicados y en secuencias espaciadoras intergénicas ribosómicas. Toda la información recopilada se integró para explicar la distribución geográfica actual de la especie.

1.3 Objetivo

Develar el origen y rutas de dispersión de *R. raciborskii* a partir de estudios genómicos y filogenéticos.

1.4 Materiales y métodos

Se realizó una combinación de estudios genómicos y filogenéticos partiendo de la secuenciación de los genomas de las dos cepas de *R. raciborskii* (LB2897 y MVCC19). La cepa LB2897 no productora de STX (Colección de cultivo UTEX) se aisló de *Lemon Lake*, Indiana, EE. UU. (39.2568, -86.3929) (Yilmaz y Philips 2011). La cepa MVCC19 productora de STX se aisló de Javier Lake, Canelones, Uruguay (-34.8640, -56.0409) (Vidal y Kruk 2008, Piccini et al. 2011).

Se hizo un relevamiento bibliográfico para evaluar la producción de toxina de *R. raciborskii* a lo largo del continente americano (incluida la detección de PSP, CYL y otras toxinas). La búsqueda incluyó datos de observaciones de campo, experimentos, evaluaciones paleolimnológicas y simulaciones de modelos (Apéndice 1, Tabla 1.1). Las cepas LB2897 y MVCC19 se seleccionaron en función de su relación filogenética entre cepas de América del Sur y América del Norte.

1.4.1. Condiciones de cultivo y extracción de ADN

Los cultivos de las cepas MVCC19 y LB2897 *R. raciborskii* fueron crecidos en medio BG11 sin nitrógeno (Stanier et al., 1971) a una temperatura de 26 ° C y una intensidad de luz PAR de Fotones de 80 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ con un fotoperiodo claro: oscuro de 16: 8h. Para la extracción de ADN adaptó el método descrito por Zhou et al., 1996. Se filtraron 5 ml de cultivo a través de filtros estériles de policarbonato de 2,0 μm (Milipore). Para la lisis celular se utilizó un método químico. Las células fueron lisadas utilizando buffer TE (30 mM Tris·Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0) conteniendo 15 mg/ml lisozima y 10-20 μl de proteinasa K. Luego se incubó a 15-25 °C durante 10 minutos con vortex de 10 segundos cada 2 minutos. Luego se agregó el buffer de lisis según número de células y 10 μl de B-mercaptoetanol cada 1 ml de buffer. Una vez finalizada la lisis el ADN fue extraído utilizando una solución de cloroformo/alcohol isoamílico 24:1 por tres veces. Se recuperó la fase acuosa conteniendo el ADN el cual fue precipitado con isopropanol a temperatura ambiente durante una hora. Se centrifugó, se descartó el sobrenadante y el pellet obtenido se lavó con etanol frío 70% (v/v). Se secó y se resuspendió en agua estéril toda la noche a 4°C. Por último, se incubó a 37°C en constante agitación. Finalmente se midió la cantidad de ADN por espectrofotometría y se almacenó a -20°C hasta su envío a servicio de secuenciación.

1.4.1. Secuenciación y ensamblaje de los genomas

El genoma de la cepa MVCC19 fue obtenido a través de la secuenciación *paired-end* (2x100bp) en la Plataforma Illumina HiSeq 2500 (biblioteca Illumina TruSeq DNA Nano kit, Macrogen Inc., Corea) y se obtuvieron un total de 9,828,753 lecturas. Para la secuenciación de la cepa LB2897 se utilizó una plataforma Ion Torrent PGM (servicio genómico IIBCE) y se obtuvieron 221437 lecturas (*single end*, 305 pb). La calidad de las lecturas fue evaluada con el programa FastQC y el filtrado de secuencias basadas en la calidad se realizó utilizando el programa *Sickle*. Se establecieron como umbrales de corte 28 Phred y una longitud mínima de 50 pb. Para ambos genomas, ensamblaje *de novo* se realizó utilizando Spades (Bankevich et al., 2012) empleando los parámetros por defecto. Los estadísticos de ensamblaje se calcularon con el paquete de software Abyss (Simpson et al., 2009). Para descartar la contaminación en el ensamblado contigs con la herramienta BLASTn (Altschul et al., 1990) se hizo una búsqueda de secuencias similares dentro de los genomas completos del orden Nostocales. Los contigs que no fueron mapeados se descartaron. La anotación y la clasificación funcional en subsistemas se realizaron utilizando la Servidor web *Rapid Annotation using Subsystem Technology* (RAST) (Aziz et al., 2008). La anotación manual de genes se realizó con BLASTp (Altschul et al., 1990; Rutherford et al., 2000).

1.4.2. Propiedades del genoma

El genoma de la cepa MVCC19 tiene 3.515.201 pares de bases distribuidos en 155 contigs. Su N50 es de 116.886 (máx. longitud, 259.706 pb). El contenido G+C es de 40,1%. La cobertura media de nucleótidos es de 12,1X y se predijeron 3397 marcos de lectura abierta, 42 genes de ARNt y un grupo de ARNr completo.

El genoma de la cepa LB2897 tiene 2.749.671pb distribuidos en 222 *contigs*. Su N50 es 21.880 (máx. longitud de contig de 82,258 bp). El contenido G+C es de 39,9%. La cobertura media de nucleótidos es de 6,7X y se predijeron 3369 marcos de lectura abierta, 31 genes de ARNt y 5 genes de ARNr putativos. El genoma completo de la cepa MVCC19 se ha depositado en DDBJ / ENA / GenBank bajo la adhesión VIRO00000000. La versión descrita en esta tesis es la versión VIRO01000000, BioProject PRJNA552312, muestra biológica SAMN12188516. El genoma completo LB2897 también fue depositado en DDBJ / ENA / GenBank bajo la adhesión VOIM00000000. La versión descrita en esta tesis es VOIM01000000, BioProject PRJNA552339, BioSample SAMN12190206. Las lecturas originales (*raw reads*), están disponibles en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA552312> para la cepa MVCC19 y en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA552339> para la cepa LB2897.

1.4.3. Análisis de la secuencia del *cluster sxt*

Para el análisis comparativo del *cluster sxt* se utilizó el *cluster* que fue publicado para *R. raciborskii* T3 (Kellmann et al., 2008) como referencia. Las secuencias fueron obtenidas de la base de datos *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) con el número de acceso DQ787200. La anotación de los genes *sxt* fue chequeada mediante BLASTp contra el *GeneBank* (Altschul et al., 1990; Rutherford et al., 2000). Los análisis comparativos se realizaron con el paquete de R *genoPlotR* (Guy et al., 2010). Para determinar si los genes *sxtY* y *sxtZ* son realmente componentes del clúster *sxt* y hacer inferencias sobre su contexto genómico, se estudió la distribución filogenética de ambos genes. La identificación de *sxtY* y *sxtZ* en las cepas estudiadas se realizó mediante *BLASTp*. La visualización de los resultados comparativos del clúster se también se realizó utilizando el Paquete *genoPlotR* implementado en R (Guy et al., 2010).

1.4.4. Análisis filogenéticos:

- Filogenia del Orden Nostocales

Se generó una base de datos con 87 genomas del orden Nostocales disponibles en NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov>). La base de datos final comprendió todas las cepas disponibles del género *Raphidiopsis* (ex- *Cylindrospermopsis*) y dos genomas disponibles seleccionados al azar de especies de otros géneros (Apéndice 1, Tabla 1.2).

Los genes ortólogos se identificaron utilizando el software *Get homologues* (Contreras-Moreira and Vinuesa, 2013) utilizando el método *OrthoMCL* (H. Li et al., 2009) y se determinó mínimo de cobertura del 75% y valores de identidad de un 40% valores como umbrales para las búsquedas *BLASTp*. Se encontraron 24 genes ortólogos los cuales fueron alineados según sus secuencia aminoacídica utilizando *Clustal Omega* (Sievers et al., 2011) y concatenados para formar un superproteína que incluyó 4375 sitios alineados. Se construyó un árbol filogenético con el método de máxima verosimilitud (ML) usando *RaxML* (Stamatakis, 2014) con opción *autoMRE* para calcular los valores de cada nodo (Apéndice 1, Figura 1.1).

- Filogenia de *R. raciborskii*

Para obtener un árbol filogenético más robusto de las especies de *R. raciborskii*, se volvió hacer un análisis filogenético incluyendo sólo los 29 genomas más cercanos (Apéndice 1, Tabla 1.2). En este caso se obtuvieron 356 genes ortólogos identificados como se describió previamente. La alineación de proteínas y análisis filogenético también se realizó como se describió anteriormente y mostró 80,173 residuos para la alineación.

- Filogenia ribosomal basada en ITS

Para aumentar la resolución filogenética entre cepas estrechamente relacionadas se hizo un tercer análisis filogenético utilizando el gen del espaciador ribosomal intergénico (ITS). Esta filogenia incluyó también las cepas de *R. raciborskii* sin genomas secuenciados. Todas las secuencias ITS disponibles para los géneros *Raphidiopsis* y *Raphidiopsis* se obtuvieron del *GenBank*. Las secuencias homólogas del ITS homólogas de los genomas se localizaron utilizando *BLASTn* y las secuencias se alinearon utilizando *Clustal Omega* (Sievers et al., 2011) (Apéndice 1, Tabla 1.3). Una filogenia de máxima verosimilitud se infirió utilizando *RAxML* bajo el tiempo general reversible (GTR) y el modelo de sustitución de ADN con una distribución gamma y un análisis de Bootstrap de 100 réplicas para evaluar el soporte del nodo.

1.4.5. Average nucleotide identity score (ANI)

El cálculo de la identidad nucleotídica promedio (ANI, en inglés *Average Nucleotide Identity*) es el resultado de alinear especies bacterianas a partir de la secuencia genómica que se va a comparar. Se hizo la comparación entre las cepas alineadas, todas las combinaciones entre todos los genomas disponibles de *Raphidiopsis*. Dos genomas con un valor de ANI mayor a igual a 95% se consideran la misma especie (Apéndice 1, Tabla 1.4). Los puntajes de ANI se obtuvieron utilizando el script *ani.rb* desarrollado por (Rodriguez-R and Konstantinidis, 2016).

1.5 Resultados

1.5.1 Descripción del *cluster* STX en *R. raciborskii* MVCC19

Se encontró la mayoría de los genes comunes relacionados con la biosíntesis y exportación de STX (*cluster sxt*) presentes en todos los productores de PSP (Kellmann et al., 2008; Murray et al., 2011). El *cluster sxt* de la cepa MVCC19 mostró un alto grado de sintenia con el *cluster* propuesto por Kellmann et al. (2008) (Figura 1.2). Sin embargo, no se detectó una región que comprende genes *sxtX* y *sxtN*, relacionados con la producción de análogos de saxitoxina ni genes *sxtV* y *sxtW* implicados en el transporte de electrones (Figura 1.2).

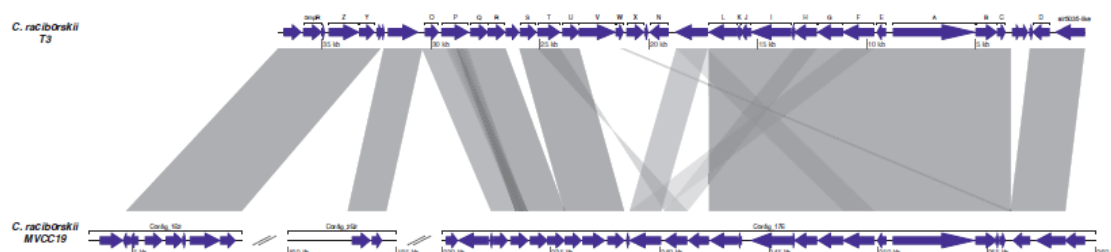


Figura 1.2. Organización genética y síntesis del clúster de genes *sxt* en *R. raciborskii* MVCC19 en comparación con *R. raciborskii* T3

Por otro lado, en la cepa no tóxica de *R. raciborskii* LB2897 se confirmó la ausencia de los genes *sxt*. Sin embargo, como también se describió para *R. brooki* por Soto-Liebe et al. (2010), se identificaron secuencias homólogas a genes reguladores relacionadas con la captación de nutrientes y señales de transducción (Figura 1.3), como *sxtY* (regulador de captación de fosfato), *sxtZ* (histidina quinasa) y *ompR* (osmorregulación conservada de membrana porinas), originalmente propuestos como miembros del clúster por Kellmann et al., (2008) pero sin evidencia experimental que lo respalde.

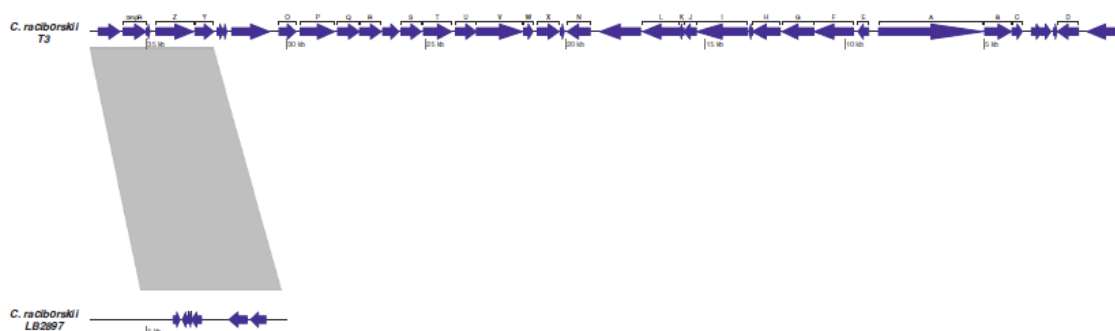


Figura 1.3. Comparación entre los genes *sxt* encontrados en *R. raciborskii* T3 productor de PSP y en *R. raciborskii* LB2897 no tóxico.

Para dilucidar si *sxtY*, *sxtZ* y *ompR* pertenecen al *cluster sxt*, se siguió un enfoque filogenético utilizando todos los genomas disponibles de *Raphidiopsis* sp (ex-*Raphidiopsis* spp.) del orden Nostocales. Se hizo un blast contra los genomas disponibles y se encontró que *sxtY* y *sxtZ* están ampliamente distribuidos en cepas tóxicas y no tóxicas (Apéndice, Tabla 1.5). Se aceptó un porcentaje de identidad mayor al 60%. En la filogenia (filogenia 1. Apéndice 1, Figura 1.1) generada a partir de las 24 proteínas ortólogas altamente conservadas encontradas en los genomas de orden Nostocales se puede ver también que estos genes están ampliamente distribuidos (Apéndice 1, Figura 1.1)

1.5.2. Filogenia de *R. raciborskii*

Para un segundo análisis filogenético (filogenia 2, Figura 1.4), se utilizó como *input* la concatenación de 356 proteínas ortólogas alineadas y obtenidas a partir de los 29 genomas más cercanos a *Raphidiopsis* (Apéndice 1, Figura 1.1). Se encontró que *R. raciborskii*, *R. brookii* y las cepas de *R. curvata* formaron un grupo monofilético con un fuerte soporte estadístico (100) (Figura 1.4). Además, el cálculo de la identidad de nucleótidos promedio (ANI genómico bidireccional) mostró que el porcentaje de genes compartidos entre los genomas de estas cepas osciló entre el 94,93% y 99,77%). En este segundo análisis filogenético se identificaron dos grupos bien definidos desde el punto de vista geográfico: un clado que comprende las cepas originarias de América y otro clado que comprende cepas originarias de Oceanía, Europa y Asia (Figura 5). El clado americano comprende además una cepa de América del Norte y varias de América del Sur donde la mayoría de ellas son productoras de PSP. La cepa LB2897 (EE. UU.), no productora de PSP se encuentra en una posición filogenética basal. En el clado americano también hay dos cepas aisladas de ecosistemas en Brasil que han sido reportadas como no productoras de PSP (CENA303 y CYLP) (Hoffmann et al., 2017).

Por lo tanto, aplicando un criterio de parsimonia la adquisición de la capacidad de producir PSP, puede ser mapeado hasta el antepasado común del clado sudamericano. La ausencia de esta capacidad en las cepas CYLP y CENA303 sería el resultado de un evento de pérdida secundaria. En este contexto, este sería un proceso evolutivo reversible mantenido como un polimorfismo de baja frecuencia dentro de la especie. Por otro lado, el grupo monofilético Oceanía / Europa / Asia poseen cepas productoras y no productoras de CYL. Las cepas productoras de CYL están reportadas en Australia (Saker, 2014) y Singapur (Mohamed Nor et al., 2019) y las no productoras en Europa (Fastner et al., 2003; Saker et al., 2003; Steenhauer et al., 2016; Valério et al., 2005).

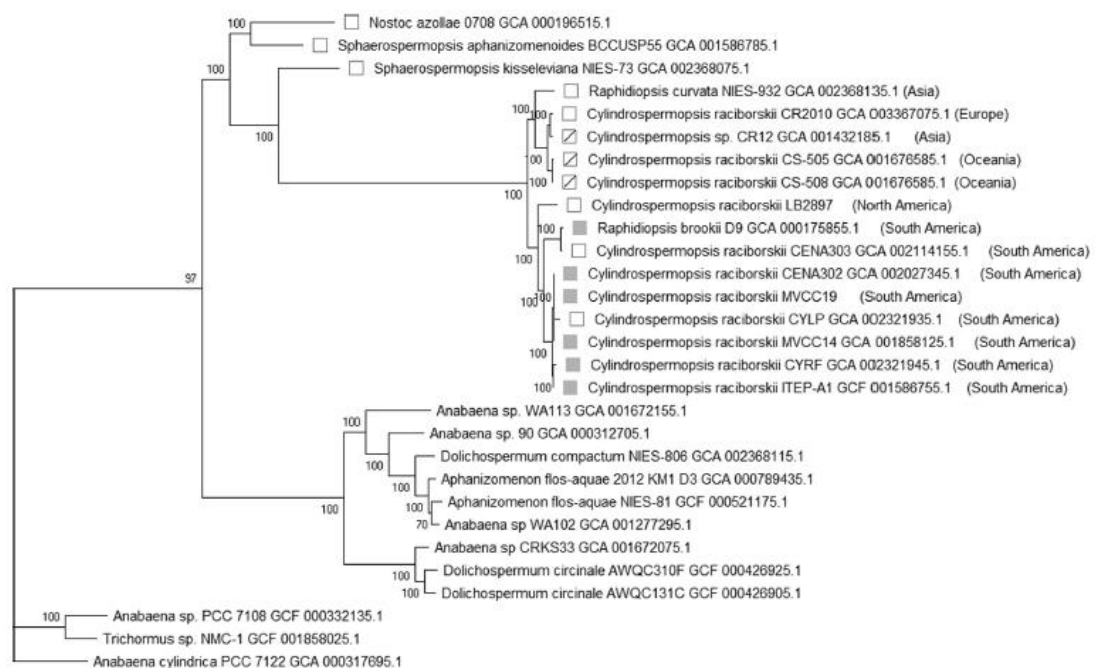


Figura 1.4 Filogenia de *R. raciborskii* (ex-*Cylindrospermopsis*) basada en la Máxima Verosimilitud utilizando 356 genes ortólogos putativos de 28 genomas. Los números representan soporte de arranque. Cuadrados grises, cepas productoras de PSP; cuadrados blancos que no son productores de PSP; cuadrados blancos con una franja diagonal, CYL-productores.

Con el fin de integrar todos los datos disponibles, se hizo una recopilación de todos los estudios que reportan la presencia de cepas de *R. raciborskii* productoras de cianotoxinas en América Latina y se vio que la presencia de PSP es clara en cepas de América del Sur incluyendo los reportes de floraciones dominadas por *R. raciborskii* desde zonas subtropicales a tropicales de Brasil (Figura 1.5).

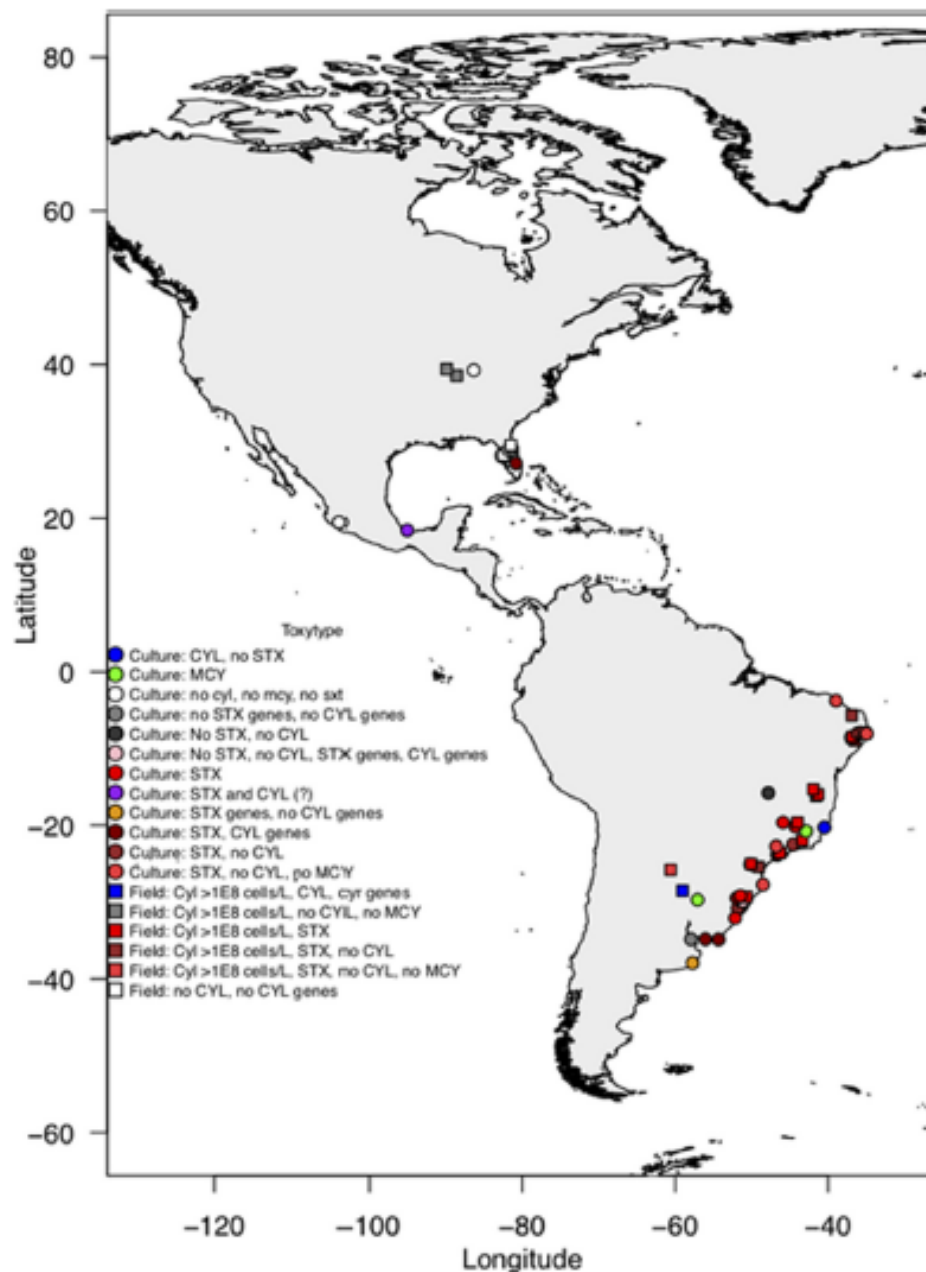


Figura 1.5. Mapa de las Américas que muestra los registros de toxicidad de *R. raciborskii*. Los símbolos indican el tipo de datos: círculos, culturas; cuadrados, muestras de campo de fitoplancton. Los colores indican la toxicidad: rojo, marrón y naranja, STX y análogos; azul, CYL; verde, otras toxinas; gris y blanco, no tóxico; resto de colores: combinación de las anteriores condiciones. CYL, producción de cilindrospermopsina; STX, producción de saxitoxina y análogos.

1.6. Discusión

1.6.1. Conservación del *cluster sxt*: contexto genómico y sintenia

El *cluster sxt* de *R. raciborskii* MVCC19 está compuesto por 26 genes relacionados a la biosíntesis y exportación de las PSP, y posee la mayoría de los genes centrales y comunes a todos los productores de PSP (Kellmann et al., 2008; Murray et al., 2011 (Figura 1.2). En el *cluster sxt* presente en MVCC19 no fueron encontrados los genes que han sido relacionados a la producción de análogos STX, como *sxtX* y *sxtN*, ni genes implicados en el transporte de electrones, *sxtV* y *sxtW*. Hallazgos similares fueron reportados por Stucken et al. (2010) para *R. brooki* D9. Se ha descrito que el gen *sxtX* estaría involucrado en la producción de Neosaxitoxina (NeoSTX) y codifica para una enzima similar a la hidroxilasa convirtiendo STX en NeoSTX (Kellmann et al., 2008). Sin embargo, se ha demostrado previamente que la cepa MVCC19 es capaz de producir NeoSTX entre otros análogos (Fabre et al., 2017, ver capítulo 2). Por lo tanto, no se puede descartar la existencia de un homólogo o un gen análogo fuera del *cluster sxt* que, al menos parcialmente, pueda cumplir la función del gen *sxtX*. Además, al igual que otras cianobacterias los cultivos no son axénicos. Esto ha impedido hasta el momento obtener genomas completos, lo que podría impedir la detección de algunos genes y dar lugar a inferencias erróneas (Alvarenga et al., 2017). La proteína producida por el gen *sxtN* fue descrita en *R. raciborskii* T3 como sulfotransferasa y está involucrada en la producción de análogos sulfatados (GTX2/3) (Cullen et al., 2018; Kellmann et al., 2008; Mihali et al., 2008). En el caso de *R. raciborskii*, las cepas tóxicas MVCC19 y MVCC14 de América del Sur demostraron también ser capaces de producir GTX 2/3 en altas concentraciones (Piccini et al., 2011), sin embargo, en este análisis no se detectó *sxtN* en MVCC19. Como sucede para *sxtX*, la función de *sxtN* puede ser complementada por otro locus en el genoma (Mihali et al., 2009).

La ausencia de los genes *sxtV* y *sxtW* en MVCC19 sugiere que estos genes no participan en la producción de toxinas. Encontramos que mientras la ubicación de *sxtV* en el grupo parece estar altamente conservado, *sxtW* mostró una posición mayormente variable (Figura 1.2). En ese sentido, el hecho de que los productores de PSP, como *R. raciborskii* CENA302 y *R. brooki* D9 (Hoff-Risseti et al., 2013; Stucken et al., 2010) también carezcan de ambos genes apoya nuestra conclusión sobre su papel no esencial en la función de clúster.

Si bien en la cepa LB2897 no productora de STX se confirmó la ausencia de todo el grupo de genes *sxt*, se encontraron secuencias homólogas de genes relacionados con la absorción de nutrientes y la señal transducción (Figura 1.3), como *sxtY* (regulador de absorción de fosfato), *sxtZ* (histidina quinasa) y *ompR* (osmorregulación conservada de

la membrana porinas). Estos genes han sido propuestos previamente como miembros del *cluster sxt* (Kellmann et al., 2008) pero sin evidencia experimental que lo apoye. Se ha visto que estos genes son altamente conservados en cepas productoras y no productoras de toxinas de *Anabaena circinalis* (Moustafa et al., 2009) sugiriendo que no son esenciales para la producción de PSP. Esto también se ha observado en *R. raciborskii* CENA302 (Abreu et al., 2018). Además, Soto-Liebe et al. (2010) mostró que *sxtY*, *sxtZ* y *ompR*, de *R. brookii* D9, están en una posición diferente en comparación al *cluster sxt* de *R. raciborskii* T3. En conjunto, estos resultados sugieren que estos genes no están física ni funcionalmente conectados con el *cluster sxt*; por lo tanto, no son indicativos de la producción de la toxina. Por su parte se estudiaron los genes en las regiones flanqueantes 5' y 3' del grupo, y el contexto genómico que aparece en todas las cepas de *Raphidiopsis* productoras de PSP. Los resultados sugieren que las cepas de *Raphidiopsis* parecen ser las mismas. La presencia de una proteína conservada similar a alr5035 que flanquea *sxtD* (*upstream*) en todos los genomas analizados apoya esta conjetura (Figura 1.3).

1.6.2. Origen y dispersión de PSP en *R. raciborskii*

La producción de PSP en *R. raciborskii* tiene un patrón geográfico claro. Nuestros hallazgos en el contexto genómico del *cluster sxt*, nos permitió reconstruir un árbol robusto de máxima verosimilitud (filogenia 2, Figura 1.4) a partir de los genomas estrechamente relacionados con *R. raciborskii* obtenidos en la filogenia 1 (Figura 1.4 y apéndice 1, Figura 1.1). Como se indicó anteriormente, dicha filogenia mostró que *R. raciborskii*, *R. brookii* y *R. curvata* forman un grupo monofilético (con un fuerte soporte estadístico) lo que indica que esos taxones pertenecen a la misma especie (Figura 1.4). Este hallazgo apoya la unificación de los géneros *Raphidiopsis* y *Cylindrospermopsis* bajo el género *Raphidiopsis* basado en un enfoque polifásico que incluye datos fenotípicos y filogenéticos (Aguilera et al., 2018). En nuestro análisis, se pudieron identificar dos grupos bien definidos: el clado americano y el clado Oceanía/Europa/Asia (Figura 1.4), que está de acuerdo con otros trabajos (Chonudomkul et al., 2004; Gugger et al., 2005; Piccini et al., 2011).

El clado americano comprende la cepa de América del Norte (no productora de STX) y varias de América del Sur (productoras de STX). Luego de analizar la posición de cada cepa en la filogenia (Figura 1.4) se puede ver que la cepa LB2897 proveniente de EE.UU (no productora de PSP) está en una posición filogenética basal. Esto sugiere que las cepas de América del Norte podrían representar un linaje divergente (Figura 1.4). Este hallazgo también está apoyado por el valor estimado de ANI (Apéndice 1, Tabla 1.4). Hay que tener en cuenta que hay dos cepas provenientes de Brasil

(CENA303 y CYLP) que fueron reportadas como no productoras de PSP (Hoffmann et al., 2017) (Figura 1.4). Por tanto, aplicando un criterio de parsimonia la adquisición de la capacidad de producir PSP podría ser mapeada hasta el antepasado común del clado sudamericano. En el caso de CYLP y CENA303 sería un evento de pérdida secundaria. En este contexto, este sería un proceso evolutivo reversible mantenido como un polimorfismo de baja frecuencia dentro de la especie.

Por otro lado, el grupo monofilético de Oceanía / Europa / Asia posee cepas productoras de CYL y no productoras de toxinas. Las productoras de CYL han sido detectadas en Australia (Saker, 2014) y Singapur (Mohamed Nor et al., 2019) y las no productoras en Europa (Steenhauer et al., 2016; Fastner et al., 2003; Saker et al., 2003; Valério et al., 2005). De acuerdo con Panou et al., (2018), cepas mediterráneas de *R. raciborskii* de Europa compartían un ancestro común con cepas de América del Norte. El hecho de que la cepa norteamericana LB2897 carezca de *cluster sxt* y *cyr* y sumada a su posición en el árbol, apoya esta hipótesis.

Con el fin de integrar todos los datos disponibles, se realizó una búsqueda bibliográfica de todos los estudios que reportan la presencia de toxinas en *R. raciborskii* en América. Se encontró que la presencia de PSP es clara en las cepas de América del sur, incluidas desde zonas subtropicales a tropicales de Brasil donde se han detectado floraciones dominadas por *R. raciborskii*. Aunque hay pocos reportes de esta especie en Norteamérica, hasta el momento hay un solo aislamiento del estado de Florida (EE.UU) que ha sido informado como productor de PSP, mientras que otros registros corresponden a casos no tóxicos (Apéndice 1, Tabla 1.1).

Por otro lado, la presencia de algunos genes implicados en la producción de CYL (*cluster cyr*) (Mihali et al., 2008) se detectaron en algunas cepas de Uruguay y Brasil (Hoff-Rissetti et al., 2013; Piccini et al., 2013). Hasta el momento la mayoría de los estudios con cepas sudamericanas incluyen cepas productoras de PSP y solo hay dos reportes donde la presencia de CYL se asoció con *R. raciborskii*, una en Brasil y una floración en Argentina (Figura 1.5, Apéndice 1, Tabla 1.1). En ese sentido, la presencia de genes *cyr* en América del Sur puede tener un efecto importante al mapear el evento de adquisición para la producción de CYL en la filogenia de la especie.

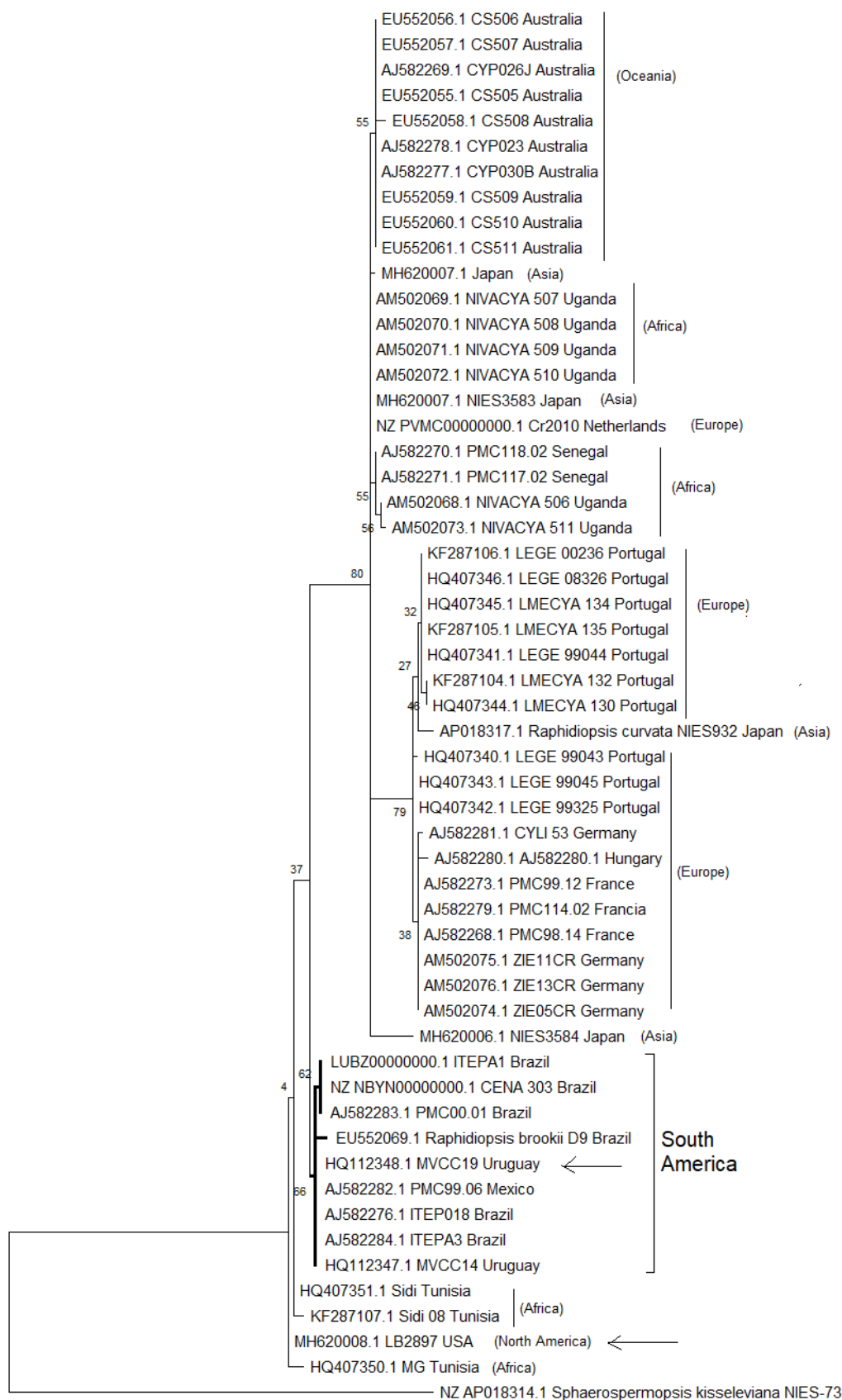
1.5.3. Reconstrucción de la ruta de dispersión de *R. raciborskii*

Utilizando los datos disponibles en ese momento, Padisák (1997) sugirió África como el principal centro evolutivo de *R. raciborskii*. Teniendo en cuenta la morfología, características ecológicas y la demanda de altas temperatura de la especie, Padisák sugirió que *R. raciborskii* se propagó desde África a lugares ecuatoriales en Indonesia y América Central. Luego propuso un segundo centro evolutivo en Australia, donde la

especie desarrolló la capacidad de prosperar en condiciones subtropicales y templadas. A partir de ahí, se habría expandido al resto del mundo. Esta propuesta fue apoyada más tarde por Haande y col 2008, que sugiere una propagación relativamente reciente de *Raphidiopsis* a través de América y Europa desde áreas más cálidas, junto a una reciente colonización de Australia por cepas africanas (Haande et al., 2008). Por el contrario, Moreira et al. (2015) sugirió que el origen de *R. raciborskii* estuvo en el continente americano y desde allí se propagó a África, seguida de la dispersión a Asia y Australia y siendo Europa el último continente en ser colonizado por la especie. Panou et al. (2018) sugirió un escenario similar.

La mayoría de estos estudios se basan en marcadores genéticos moleculares, como *16S ribosomal* e *ITS*, *PC-IGS*, *nifH* y *rpoC1*, y no consideran los fenotipos de toxicidad y genotipos de las cepas analizadas. En Nueva Zelanda, algunos autores encontraron que los aislamientos productores de CYL estaban más cerca del clados de América del sur que de los clados a los australianos (Wood et al., 2014). En el escenario propuesto de dispersión, la masa de tierra de Nueva Zelanda que emergió después del Oligoceno tardío (25 ma, Waters and Crow, 2006) puede haber sido colonizado por un protoclado sudamericano productor de CYL. Curiosamente, Baron-Sola et al., (2012) detectaron la presencia de genes *cyr* y CYL en muestras de campo de Argentina (El Chaco) dominadas por *R. raciborskii*. Aunque esta toxina no se asoció directamente a una cepa, la supuesta existencia de tal población abriría una nueva pregunta acerca de cuándo y dónde se perdió la capacidad de producción de CYL en América del sur.

Actualmente solo hay algunos genomas disponibles para esta especie y la mayoría pertenecen a cepas de Australia y Sudamérica. Con el fin de aumentar el alcance geográfico de nuestro estudio, realizamos un análisis filogenético basado en el ITS ribosomal de la especie (Figura 1.8).



0.050

Figura 1.8. Árbol de máxima verosimilitud basado en secuencias ITS ribosómicas de *R. raciborskii* (se muestran los números de acceso). Se indican los soportes del nodo Bootstrap. Los apoyos por debajo del 25% no están incluidos en el árbol.

Esta filogenia mostró un grupo griego/África del Norte/América del Norte (no productor de PSP) como el linaje basal de la especie, coincidiendo con las propuestas de Padisák (1997) y Haande et al. (2008). Hay que tener en cuenta que el soporte del nodo para estas ramas es bastante marginal (soporte de nodo inicial <39%). En un segundo linaje principal (soporte de nodo inicial 54%) habrían divergido y se dividieron en dos clados: uno que contiene las cepas sudamericanas (en su mayoría productores de PSP) y otro que contiene las cepas de África subsahariana/Oceanía/Europa (productores de CYL) en Oceanía o no productor de PSP (en África subsahariana y Europa) (Figura 1.8). Esta división principal está en su mayoría de acuerdo con la filogenia hecha con los ortólogos (Figura 1.4). Entonces, bajo este escenario y considerando el hallazgo de secuencias parciales de genes *cyr* en cepas americanas no productoras de CYL (Piccini et al., 2011; Hoff-Risseti et al., 2013), concluimos que la producción de CYL es un carácter ancestral de este segundo linaje (África subsahariana/Oceanía/Europa/cepas sudamericanas) que luego se perdió durante la expansión a América. De hecho, Yilmaz and Phlips, 2011 encontraron que los genes del *cluster cyr* de cepas norteamericanas de *Aphanizomenon ovalisporum* que producen CYL tuvieron más cambios de reemplazo dentro de las especies que entre especies, lo que sugiere la presencia de mutaciones (sustitución nocivas) (Yilmaz and Phlips, 2011). Teniendo en cuenta la posición de los productores de CYL en la filogenia basada en árbol de ortólogos que se muestra en la Figura 1.4 no podíamos descartar por completo una más reciente adquisición de la producción de CYL.

Tomando en cuenta todas las evidencias surge un nuevo escenario, donde el último ancestro común a todas las cepas de *R. raciborskii* aisladas hasta el momento sería un ancestro africano incapaz de producir ninguna toxina. Más tarde en un linaje basal surgió la producción de CYL pero no de PSP, y desde allí, la especie se propagó a América y Oceanía (Figura 1.9). La producción de CYL en muestras *R. raciborskii* de Nigeria (Mowe et al., 2014) también respaldan esta hipótesis.

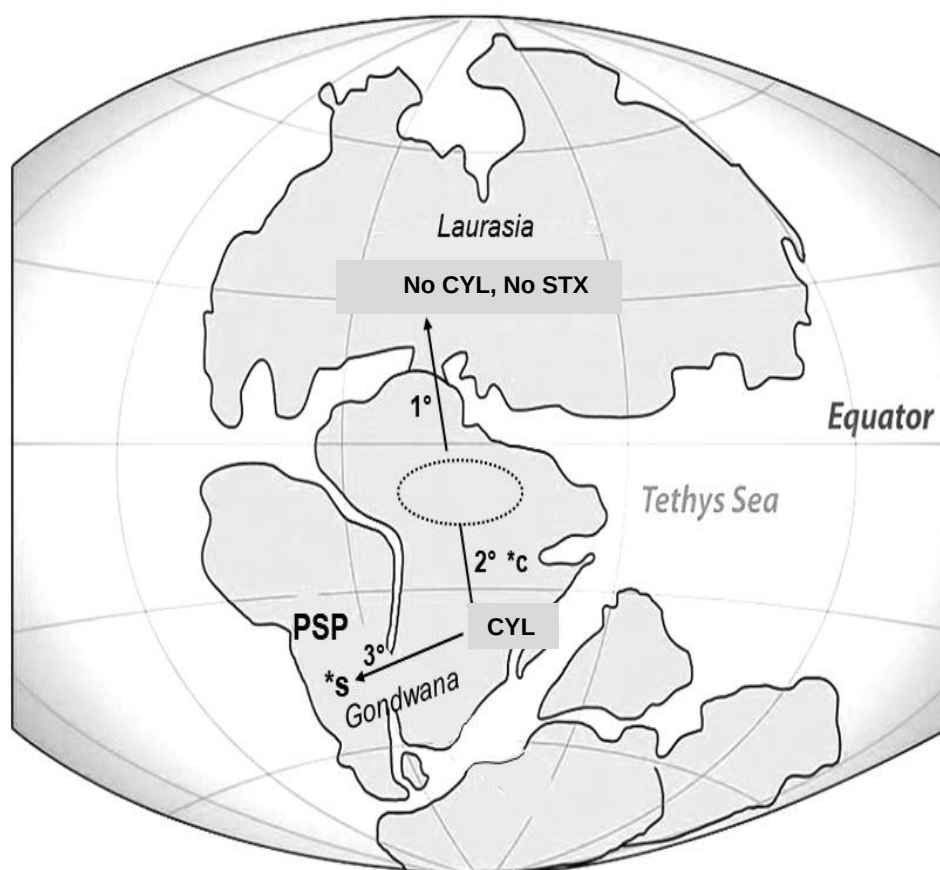


Figura 1.9. Escenario hipotético propuesto en este trabajo para el origen y dispersión de *R. raciborskii* basado sobre filogenia, características genómicas y tóxicas. productores de PSP, saxitoxina y análogos; CYL: cilindrospermopsina productores. La elipse punteada indica el primer centro de dispersión propuesto del especies, potencial tóxico desconocido. A partir de ahí, el primero se extendió al norte de África y Laurasia (1), luego a África Austral (2) y de ahí al Sur actual América (3). Los asteriscos indican la adquisición de toxicidad, *c para cilindrospermopsina y *s para saxitoxinas.

La evidencia recopilada en este capítulo de la tesis coincide con lo propuesto por Padisák (1997), confirmando a África tropical como un centro evolutivo primario de *R. raciborskii* (Figura 1.9). De acuerdo con los resultados de los análisis filogenéticos basados en espaciador ribosomal intergénico ITS y los genes ortólogos, y considerando la distribución filogenética de los genes involucrados en la síntesis de CYL o STX, planteamos la hipótesis de una propagación temprana desde un lugar tropical al norte de África y Laurasia (el continente que sería luego daría lugar a América del Norte y Eurasia) cuando la parte norte de África todavía estaba conectada (Dietz and Holden, 1970). Después, habría tenido lugar un evento evolutivo secundario que involucra la

adquisición del grupo para la síntesis de CYL. Estas poblaciones productoras de CYL se propagaron a lugares cálidos en el África subsahariana, Oceanía y América del Sur (Figura 1.9). Teniendo en cuenta las relaciones evolutivas observadas en las cepas, es plausible sugerir que en este momento puede haber ocurrido la invasión a los actuales continentes de Oceanía y América del sur poco antes la división de Gondwana en continentes durante el Cretácico (hace aproximadamente 150-100 millones de años). Esto concuerda con la divergencia de tiempo estimada y calculada para *C. raciborskii*/*R. brooki* por análisis bayesiano del reloj molecular, cuyas estimaciones ocurrieron hace ca. 100 millones de años (Sánchez-Baracaldo et al., 2014)

En este trabajo, la filogenia basada en ortólogos mostró también que la cepa LB2897 de América del Norte (no productora de PSP) tiene una posición basal con respecto a las cepas sudamericanas (Figura 1.4). Por otro lado, la filogenia reveló que esta cepa tendría una posición relativamente basal a todos los clados geográficos definidos (Figura 1.8). *R. raciborskii* LB2897 fue aislado del lago *Lemon* en Illinois (Yilmaz and Philips, 2011) y comparte su genotipo no tóxico con cepas europeas (Figura 1.4). Estos hallazgos, junto con hallazgos anteriores que proponen que las cepas mediterráneas de Europa están relacionados con las norteamericanas (Panou et al., 2018) y que este continente era parte de Laurasia, sugiere fuertemente que las cepas de América del Norte son ancestrales a las de América del Sur (Figura 1.9) y que surgieron antes de la división de Laurasia.

Por otro lado, encontramos que las poblaciones de *R. raciborskii* de la India parecen estar filogenéticamente relacionados con el clado de África/Oceanía. El ARNr 16S de *R. raciborskii* de la India (acceso número KU377740) estaría estrechamente relacionado con los aislamientos de Nueva Zelanda (números de acceso HG942526 y HG942525) lo cual refuerza nuestra hipótesis.

Una vez en América del Sur, la capacidad de producir CYL se perdió, mientras que ocurrió otro evento evolutivo para la especie: la adquisición del grupo de genes *sxt* y la capacidad de producir PSP (Figura 1.9). Desde Sudamérica, las poblaciones productoras de STX se habrían desplazado al norte (Figura 1.9, Apéndice 1, Tabla 1.1). Además, el aislamiento de una cepa productora de STX que posee los genes *cyr* de un lago de Florida (*R. raciborskii* CCMP1973) indicarían que los lagos de la parte sur del continente fueron colonizados más tarde por poblaciones sudamericanas (Figura 1.5 y Apéndice 1, Tabla 1.1).

Basándonos en la observación de que el contexto genómico de todas las cepas productoras de PSP es el mismo (Figura 1.2 y Figura 1.4) y en la conservación de la organización genómica del *cluster sxt* (Moustafa et al., 2009), la adquisición de este carácter podría haber ocurrido en un solo evento de transferencia horizontal de genes.

Según Murray et al. (2011), la producción de PSP está presente en clado *R. raciborskii*/*R. brookii* y *Dolichospermum*-*Anabaena* y *Aphanizomenon*, lo que indicaría que el carácter estaba presente en un ancestro común de los Nostocales. Sin embargo, el grupo de genes *sxt* de la cepa *D. circinale* descrito por Murray et al. (2011) tiene un contexto genómico diferente, careciendo de los genes *sxtY* y *sxtZ*. Esto implicaría que la adquisición del *cluster sxt* por parte de *R. raciborskii* y *D. circinale* podrían haber sido eventos independientes y que la capacidad de producir PSP no se heredó verticalmente.

Esta información, junto con el hallazgo de supuestas transposasas ubicadas en cada extremo del *cluster sxt* de *R. raciborskii* refuerza la idea de que la adquisición del *cluster* fue mediada por un evento de transferencia horizontal de genes. Sin embargo, se requieren más estudios que incluyan más genomas secuenciados necesarios para contestar las preguntas que aún quedan y confirmar las diferentes hipótesis.

2.6 Conclusiones

Los hallazgos realizados sugieren que África tropical fue el centro de dispersión original de las poblaciones no productoras de PSP de *R. raciborskii*. Las mismas se propagaron tempranamente en la evolución desde de allí al norte de África, Europa mediterránea y América del Norte. La capacidad para producir CYL probablemente tuvo lugar en África tropical, después de África subsahariana, Oceanía y América del Sur. Nuestros resultados indican que la capacidad de producir PSP fue adquirida por la especie después de colonizar el sur del continente americano y las poblaciones que tienen esta capacidad se habrían extendido hacia Norte. Por el contrario, la capacidad de producir CYL se habría perdido. A partir de una combinación de estudios filogenéticos, genómicos, de toxicidad y biogeografía de datos disponibles para *R. raciborskii* proponemos este escenario evolutivo como el más plausible para explicar la expansión geográfica y el éxito actual de la especie.



Biogeography of the cyanobacterium *Raphidiopsis* (*Cylindrospermopsis*) *raciborskii*: Integrating genomics, phylogenetic and toxicity data

Paula Vico^{a,b}, Sylvia Bonilla^{c,d}, Bruno Cremella^{c,d,e}, Luis Aubriot^{c,d}, Andrés Iriarte^{b,*}, Claudia Piccini^{a,*}

^a Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Avenida Italia 3318, 11600 Montevideo, Uruguay

^b Laboratorio de Biología Computacional, Departamento de Desarrollo Biotecnológico, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Avenida A. Navarro 3051, 11600 Montevideo, Uruguay

^c Sección Limnología, Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Igúá 4225, 11400 Montevideo, Uruguay

^d Physiology and Ecology Phytoplankton Group, CSIC, Uruguay

^e Laboratory of Environmental Analysis, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada

ARTICLE INFO

Keywords:

Raphidiopsis (*Cylindrospermopsis*) *raciborskii*

Saxitoxin

PSP

Sxt cluster

Biogeography

ABSTRACT

Raphidiopsis (*Cylindrospermopsis*) *raciborskii*, a globally distributed bloom-forming cyanobacterium, produces either the cytotoxin cylindrospermopsin (CYL) in Oceania, Asia and Europe or the neurotoxin saxitoxin (STX) and analogues (paralytic shellfish poison, PSP) in South America (encoded by sxt genetic cluster) and none of them in Africa. Nevertheless, this particular geographic pattern is usually overlooked in current hypotheses about the species dispersal routes. Here, we combined genomics, phylogenetic analyses, toxicity data and a literature survey to unveil the evolutionary history and spread of the species. Phylogenies based on 354 orthologous genes from all the available genomes and ribosomal ITS sequences of the taxon showed two well-defined clades: the American, having the PSP producers; and the Oceania/Europe/Asia, including the CYL producers. We propose central Africa as the original dispersion center (non-toxic populations), reaching North Africa and North America (in former Laurasia continent). The ability to produce CYL probably took place in populations that advanced to sub-Saharan Africa and then to Oceania and South America. According to the genomic context of the sxt cluster found in PSP-producer strains, this trait was acquired once by horizontal transfer in South America, where the ability to produce CYL was lost.

1. Introduction

Raphidiopsis (*Cylindrospermopsis*) *raciborskii* (Nostocales) (hereafter *C. raciborskii*) is one of the most studied filamentous cyanobacteria due to its global distribution around the world and its potential toxicity (Antunes et al., 2015; Briand et al., 2004; Burford et al., 2018). The success of this species is probably due to its phenotypic plasticity resulting in a good performance in a wide range of light and temperature conditions (Bonilla et al., 2012; Dokulil, 2016), as well as under different scenarios of nutrient availability (Amaral et al., 2014; Rigamonti et al., 2018).

Regarding its origin and spread routes, Padisák (1997) proposed a primary origin in African lakes, spreading later towards Indonesia and Central America. A possible secondary dispersion center was proposed to be in Australia, from where a subsequent expansion occurred by two routes: one through the Pacific Ocean to North and South America, and

a second one to Central Asia and Europe. Haande et al. (2008) also proposed Africa as primary dispersal center and its expansion to Mediterranean from North America and the rest of European strains coming from Asia and Australia (Panou et al., 2018). On the other hand, Moreira et al. (2015) proposed an alternative origin of *C. raciborskii* and suggested America as the primary dispersion center, from which the species spread to Africa. According to some authors, this geographical expansion probably took place thanks to a dynamic process of variation of the dominant genotype (Chonudomkul et al., 2004). In fact, it has been proposed that the phenotypic and genetic variability of *C. raciborskii* would be explained by the existence of different ecotypes, which would be locally selected by different environmental filters (Piccini et al., 2011).

C. raciborskii can produce the cytotoxic cylindrospermopsin (CYL) or the neurotoxic saxitoxin (STX) and analogs, known collectively as paralytic shellfish poison or PSP (Griffiths and Saker, 2003; Lagos et al.,

* Corresponding authors.

E-mail addresses: airiarte@higiene.edu.uy (A. Iriarte), cpiccini@iibce.edu.uy (C. Piccini).

<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2020.106824>

Received 12 September 2019; Received in revised form 7 February 2020; Accepted 7 April 2020

Available online 12 April 2020

1055-7903/ © 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

1999). However, the ability to produce one or the other toxin shows a geographic pattern and there are no records of isolates capable of producing both toxins simultaneously (Haande et al., 2008). The toxicity of *C. raciborskii* differs among strains from different continents resulting in an association between the geographical distribution of the species and the type of toxin produced. In this sense, CYL-producers has been reported in Australian, New Zealand and Asian strains (Hawkins et al., 1997; Saker et al., 2003; Chonudomkul et al., 2004; Wood and Stirling, 2003), while African and strains from the northern zone of North American are reported as not producing PSP nor CYL (Fastner et al., 2003; Mowe et al., 2015; Neilan et al., 2003; Kellmann et al., 2006; Yilmaz et al., 2008). However, CYL was associated with systems containing *C. raciborskii* in North America (Burns, 2008) and some North American strains produce another toxic compound (lipophilic congeners of phorbol 12-myristate 13-acetate: PMA) with effects in zebrafish (Jaja-Chimedza et al., 2015). Only strains isolated from South America (Uruguay and Brazil) have been reported to produce STX (Piccini et al., 2011; Antunes et al., 2015). In Europe, although the presence of CYL in aquatic ecosystems has been linked to the dominance of *C. raciborskii*, no strain has been positively identified as CYL-producer yet (Bernard et al., 2003; Fastner et al., 2003; Saker et al., 2003; Gkelis and Zaoutsos, 2014; Đorđević et al., 2015). It has been also proposed that the geographic patterns exhibited by the toxins of *C. raciborskii* could be partially explained by its high ecophysiological plasticity (Bonilla et al., 2012) and by the selection of ecotypes with different environmental requirements (Briand et al., 2004; Piccini et al., 2011).

PSP toxins are a group of potent alkaloid neurotoxins produced through a complex multi-enzymatic route and block specifically voltage-gated sodium channels in excitable cells and affect the generation of nerve impulses in higher animals (Cestèle and Catterall, 2000). Despite the complexity of the toxin assembly, all PSP-producer organisms appear to use the same biosynthetic pathway (Shimizu, 2003). The genetic cluster involved in saxitoxin synthesis (sxt) in *C. raciborskii* has been proposed to date from 2100 Ma and contains the genes sxtABD-GHIJKOSTUVWZ (Kellmann et al., 2008; Mihali et al., 2009; Pearson et al., 2010; Soto-Liebe et al., 2010), while the genes sxtCLNX would encode for putative hydroxylase, decarbamoylase, sulfotransferase and hydroxylase activities, and would intervene in the production of analogs. It spans ca. 35 kb encoding for 26 proteins (Kellmann et al., 2008) and it has been found in *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Raphidiopsis* and *Scytonema* from the order Nostocales and *Lyngbya wollei* from the Oscillatoriales order (Lagos et al., 1999; Wiese et al., 2010; Mihali et al., 2011; Sawayama and Nishikawa, 2011; Lajeunesse et al., 2012; Cullen et al., 2018). The function of each gene was predicted in *C. raciborskii* T3 strain isolated in Brazil by *in silico* and biochemical studies (Kellmann et al., 2008; Stucken et al., 2010). Based on the product STX, several congeners are synthesized and then modified by different tailoring genes, which result in different toxin profiles among species or strains.

Evolutionary studies regarding PSP have proposed that the toxicity conferred by this toxin would be an ancestral trait lost secondarily in some lineages (Moustafa et al., 2009; Orr et al., 2013). The diversity of the PSP analogs synthesized by all the PSP-producing species would indicate that the group has significant evolutionary changes (Murray et al., 2011). Although the genetic cluster and biogeography of PSP production in *C. raciborskii* has been intensively studied, the occurrence of non-toxic strains is still enigmatic and probably underestimated, since they are generally indistinguishable using traditional taxonomic approaches (Murray et al., 2011). The structure, organization and sequence similarity of the sxt cluster appears to reflect the phylogeny of the PSP-producing organisms, suggesting a vertical inheritance followed by purifying selection. However, the patchy phylogenetic distribution may be also explained in terms of multiple and independent horizontal transfer events (Moustafa et al., 2009). In any case, the observed relatively minor differences in gene composition among sxt

clusters may be explained by deletions, reordering, duplication and/or recombination (Murray et al., 2011).

Cylindrospermopsin (CYL) is described as cytotoxic, hepatotoxic, and neurotoxic (Ohtani et al., 1992) and its synthesis is encoded by the *cyr* genetic cluster. It spans 43 kb and 15 open reading frames containing genes required for the biosynthesis, regulation, and export of the toxin (Mihali et al., 2008). The *cyr* cluster (*cyr*) of Nostocales comprises a rearrangement of 2 polycistrons, *cyrA-cyrB-cyrE* and *cyrD-cyrK*, plus a single gene section including *cyrC* (Jiang et al., 2012). These 3 operon-like sections might be subjected to different regulation mechanisms and this could explain the different findings about which factors regulate CYL production reported by different works addressing the expression of different genes (Rigamonti et al., 2018). CYL variants include 7-epi-CYL and 7-deoxy-CYL (Ohtani et al., 1992; Banker et al., 2001; Li et al., 2001). Its production has been associated with several Nostocales species, such as *C. raciborskii*, *Umezakia natans*, *Aphanizomenon* sp., *Raphidiopsis curvata*, and *Anabaena bergii*, as well as in Oscillatoriales, *Lyngbya wollei* (Dittmann et al., 2013).

All toxin-producing species seem to have their toxin genes located in clusters, adjacent to each other, although the order of these genes may differ among species (Murray et al., 2011). The mobility of toxin genes may be responsible for the toxin profiles observed in different cyanobacterial strains (Wang et al., 2016). Interestingly, the presence of *cyr* genes in PSP-producing South American strains of *C. raciborskii* that were unable to synthesize CYL has been reported, which suggests that the CYL-production is an ancestral trait (Piccini et al., 2013; Hoff-Rissetti et al., 2013).

The global dispersion of *C. raciborskii* in aquatic environments and the lack of knowledge about the biological role of these toxins are critical aspects that need further studies to advance in the understanding of this species success. Elucidation of the mechanisms underlying the observed geographic pattern of toxin production in *C. raciborskii* requires genomic studies including several strains from different parts of the world. Owing to its restricted presence in American strains, the aim of this work was, in first place to investigate the evolutionary history of the sxt gene cluster through a combined approach involving the genomic characterization of the cluster from two American strains and a literature survey on reports of *C. raciborskii* toxicity along the Americas. Second, a phylogenetic analysis of the genus was performed based on published genomes and ribosomal intergenic spacer sequences. Then, all the gathered information was integrated to explain the current geographic distribution of the species.

2. Materials and methods

2.1. Cyanobacterial strains and culturing conditions

We selected two divergent strains of *C. raciborskii*, one that does not produce toxins (LB2897) (Yilmaz and Phlips, 2011; Piccini et al., 2013) and one that produces STX and the analogs NEO-saxitoxin, and GTX2/3 (MVCC19) (Piccini et al., 2011; Fabre et al., 2017). Strain LB2897 isolated from the Lemon Lake, Indiana, USA (39.2568, -86.3929) was purchased at the UTEX culture collection, and the strain MVCC19 was isolated from Lago Javier, Uruguay (-34.8640, -56.0409) (Piccini et al., 2011). Static cultures were grown in a modified nitrogen-free BG11 medium (Stanier et al., 1971) at 26 °C and PAR light intensity of 80 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ with a 16:8h light: dark photoperiod. Cyanobacterial cultures were mono-specific but not axenic since the presence of heterotrophic bacteria could not be ruled out.

2.2. Literature survey

In order to interpret genomic data in a wider context, a literature survey covering studies assessing *C. raciborskii* toxicity along the Americas (including detection of PSP, CYL or microcystin) was performed. The assessment included data from field observations,

experiments, paleolimnological assessments and model simulations (see Supplementary Table 5 for more information).

2.3. DNA extraction and quality control

Genomic DNA from *C. raciborskii* strains was extracted using the GenElute Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich). The concentration and purity of DNA was determined spectrophotometrically (Nanodrop) using the 260/280 nm ratio.

2.4. Genome sequencing

The sequence of the *sxt* genetic cluster of the strain MVCC19 was obtained through paired-end (2×100 bp) sequencing performed in the Illumina HiSeq 2500 platform (sequencing library with Illumina TruSeq DNA Nano kit, Macrogen Inc., Korea), as a result, 9,828,753 reads were generated. An Ion Torrent PGM platform was used for sequencing the genome of LB2897 (IIBCE genomic service) and 221,437 single reads of 305 bp were generated. Quality trimming was performed using SICKLE software. A minimum of 28 Phred score and a minimum of 50 bp length were set as thresholds for trimming. For both genomes, *de novo* assembly was performed using Spades v3.5.0. Genome assembly statistics were calculated with the ABYSS software package (Simpson et al., 2009). In order to discard sequence contamination in the assembled contigs, we did similar sequences searches within complete genomes of Nostocales, used as a reference by means of BLASTn (Altschul et al., 1990). Contigs with no hits were not further considered. Annotation and functional classification in subsystems were performed using the RAST webserver (Aziz et al., 2008). Manual annotation of genes of interest was performed in Artemis v.16 and BLASTp (Altschul et al., 1990; Rutherford et al., 2000).

The final genome for MVCC19 strain comprises 155 contigs, totaling 3,515,201 base pairs, with an N50 contig size of 116,886 (max. length, 259,706 bp) and a G + C content of 40.1%. An observed mean coverage of 12.1X was obtained for this strain. 3397 open reading frames, 42 tRNAs genes, and one complete rRNA cluster were predicted in MVCC19 genome.

The final assembly for LB2897 has 2,749,671 bp, distributed in 222 contigs. Mean nucleotide coverage of 6.7X was obtained for this strain. The N50 is 21,880, with a maximum contig length of 82,258 bp and a G + C content of 39.9%. RAST automatic annotation included 3369 protein-coding genes, 31 tRNAs genes, and 5 putative rRNA genes.

The MVCC19 whole-genome shotgun project has been deposited at DDBJ/ENA/GenBank under the accession VIRO00000000. The version described in this paper is version VIRO01000000, BioProject PRJNA552312, BioSample SAMN12188516. The LB2897 whole-genome shotgun project has been deposited at DDBJ/ENA/GenBank under the accession VOIM00000000. The version described in this paper is version VOIM01000000, BioProject PRJNA552339, BioSample SAMN12190206. Total original generated reads, assembly, RAST annotation for MVCC19 and LB2897 strains are available at www.higiene.edu.uy/ddbp/Andres/vico_et_al_2019_rawdata.html.

2.5. Sequence analysis of *sxt* cluster

We used the published *C. raciborskii* T3 strain saxitoxin cluster (Kellmann et al., 2008) as a reference for comparative assessment. Sequences were obtained from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) under the accession number DQ787200 (T3 *sxt* gene cluster, complete sequence). Annotation check for *sxt* genes was performed with BLASTp against the GenBank nr protein database (Altschul et al., 1990; Rutherford et al., 2000). Comparative plots analyses were performed with the platform-independent R genoPlotR package (Guy et al., 2011).

In order to determine if *sxtY* and *sxtZ* genes are actually components of the *sxt* cluster and make inferences about its genomic context, we

studied the phylogenetic distribution of both genes. The identification of the *sxtY* and *sxtZ* in the studied strains was performed by BLASTp. Visualization of the cluster comparative results was done using the genoPlotR package implemented in R (Guy et al., 2011).

2.6. Phylogenetic analyses

2.6.1. Nostocales phylogeny

Eighty-seven genomes of strains from the order Nostocales including assembly, coding sequences, and annotations, were downloaded from the NCBI website via ftp (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov>). The final database comprised all available strains from the genus *Cylindrospermopsis* and *Raphidiopsis* and two randomly selected genomes for each available species of other genera (Supplementary Table 1). Orthologous genes were identified using the OrthoMCL method (Li et al., 2009) as implemented in the Get_homologues software (Contreras-Moreira and Vinuesa, 2013). A minimum coverage of 75% and identity values of 40% were set as thresholds for BLASTp searches. The resulting 24 orthologous protein clusters were independently aligned using Clustal Omega (Sievers et al., 2011) and subsequently concatenated to form a super-protein that included 4375 aligned sites. A Maximum Likelihood (ML) phylogenetic tree was then built using RaxML (Stamatakis, 2014) with autoMRE option to calculate the node support values (Supplementary Fig. 1).

2.6.2. *C. raciborskii* phylogeny

In order to get a more robust phylogenetic tree of *C. raciborskii* species, a second phylogenetic analysis was performed including only the 29 closest-related genomes (see Supplementary Table 1). A total of 356 orthologs were identified as previously described, involving 80,173 residues for the alignment. Protein alignments and phylogenetic analysis were also performed as previously described.

2.6.3. Ribosomal ITS-based phylogeny

C. raciborskii strains with no sequenced genomes were included in a third phylogenetic analysis based on the ribosomal intergenic transcribed spacer (ITS), which allowed to increase the phylogenetic resolution among closely related strains. All the ITS sequences available for the genera *Cylindrospermopsis* and *Raphidiopsis* were retrieved from GenBank. Homologous ITS sequences from genomes were located using BLASTn. All sequences were aligned using Clustal Omega (Sievers et al., 2011) (Supplementary Table 2). A Maximum Likelihood phylogenetic tree was inferred using RaxML under the general time-reversible (GTR) model of DNA substitution with a gamma distribution and a bootstrap analysis for assessing node support (100 replicates).

2.7. Average nucleotide identity score (ANI)

ANI scores were computed (paired strains, all combinations) among all the available genomes of *Cylindrospermopsis* and *Raphidiopsis*. ANI score is a result of a whole-genome comparison and is a widely accepted method to delineate bacterial species from genomes sequence data. Two genomes displaying an ANI value of 95% or higher are considered as belonging to the same species (Supplementary Table 3). ANI's scores were obtained using the ani.rb script developed by (Rodriguez-R and Konstantinidis, 2016) (downloaded from enveomics.blogspot.com).

3. Results and discussion

3.1. Conservation of *sxt* cluster: Genomic context and synteny

The *C. raciborskii* MVCC19 *sxt* cluster is composed of 26 genes related to biosynthesis and export. It presents most of the core genes common to all PSP producers (Kellmann et al., 2008; Murray et al., 2011) and shows a high degree of synteny to that proposed by Kellmann et al. (2008) (Fig. 1). After extracting and analyzing the cluster

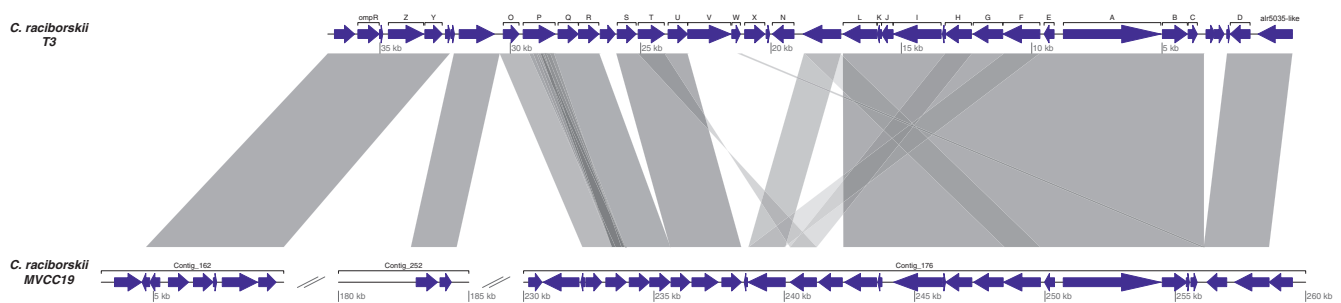


Fig. 1. Genetic organization and synteny of *Cylindrospermopsis raciborskii* MVCC19 *sxt* cluster compared to *C. raciborskii* T3.

sequence from the genome of the PSP-producing *C. raciborskii* MVCC19, we did not find all the tailoring genes proposed to be involved in the production of STX analogs, such as *sxtX* and *sxtN*, nor genes involved in the electron transport, *sxtV* and *sxtW*. Similar findings were reported by Stucken et al. (2010) for *R. brooki* D9. In this sense, it has been described that *sxtX* would be involved in the production of Neosaxitoxin (NEO), encoding a hydroxylase-like enzyme that converts STX to NEO (Kellmann et al., 2008). However, it has been previously shown that the strain MVCC19 is able to produce NEO, among other analogs (Fabre et al., 2017). Thus, we cannot rule out the existence of a homologous or analogous gene outside the cluster that, at least partially, fulfills the function of the *sxtX* gene. Also, as with other cyanobacteria (Alvarenga et al., 2017), the difficulty to axenically grow *C. raciborskii* isolates has impaired to obtain complete genomes so far, which might prevent the detection of some genes and lead to wrong inferences.

The protein produced by the gene *sxtN* was described in *C. raciborskii* T3 as a sulfotransferase involved in production of sulfated analogs of PSP toxins, such as the conversion of STX and GTX2/3 in GTX5 and C1/2, respectively (Kellmann et al., 2008; Mihali et al., 2008; Cullen et al., 2018). In the case of PSP-producing *C. raciborskii*, the toxic MVCC19 and MVCC14 strains from South America showed to be able to produce GTX 2/3 in high concentrations (Piccini et al., 2011), although here we did not detect *sxtN* in MVCC19. It has been already described that some of these tailoring genes are different or sometimes absent in some STX-producing organisms, which suggest that they may either be complemented by another locus in the genome or are not essential for PST biosynthesis (Mihali et al., 2009).

The absence of *sxtV* and *sxtW* in MVCC19 suggests that these genes are not involved in toxin production. We found that while *sxtV* location in the cluster appears to be highly conserved, *sxtW* showed a more variable position (Fig. 1). Indeed, the fact that PSP producers, such as *C. raciborskii* CENA302 and *R. brooki* D9 (Hoff-Rissetti et al., 2013; Stucken et al., 2010) also lack both genes supports our conclusion about their non-essential role in the cluster function.

In the non-toxic *C. raciborskii* LB2897 strain we confirmed the absence of the entire *sxt* gene cluster, as well as the absence of the genes involved in CYL synthesis by PCR (data not shown). However, as described for *R. brooki* by Soto-Liebe et al. (2010), we could find homologous sequences of genes related to nutrients uptake and signal transduction (Fig. 2), such as *sxtY* (phosphate uptake regulator), *sxtZ* (histidine kinase) and *ompR* (conserved osmoregulation of membrane porins), previously proposed as members of the cluster (Kellmann et al., 2008) but without supporting experimental evidence. These genes are highly conserved in toxic and non-toxic strains of *Anabaena circinalis* (Moustafa et al., 2009), suggesting they are not essential for the production of PSP, as pointed out for *C. raciborskii* CENA302 (Abreu et al., 2018). In order to elucidate if *sxtY*, *sxtZ*, and *ompR* are integral parts of the *sxt* cluster, we followed a phylogenetic approach using all available *Cylindrospermopsis* spp. genomes plus up to three genomes from other cyanobacterial genera belonging to the Nostocales order (Supplementary Table 4). The Nostocales phylogeny, based on 24 highly-conserved orthologous proteins, clearly indicates that *sxtY* and *sxtZ* are widely

distributed and present in toxic and non-toxic strains (Supplementary Figure 1). Besides, Soto-Liebe et al. (2010) showed that *sxtY*, *sxtZ*, and *ompR*, from *R. brooki* D9, are in a different position compared to the *C. raciborskii* T3 reference cluster. Taken together these results suggest that these genes are not physically nor functionally connected to the *sxt* cluster; thus, they are not indicative of toxicity.

Genes at the 5' and 3' flanking regions of the cluster were studied, and the genomic context in all PSP-producer *Cylindrospermopsis*/*Raphidiopsis* strains seems to be the same. The presence of a conserved *alr5035*-like protein flanking *sxtD* (upstream) in all analyzed genomes supports this conjecture (Fig. 1).

3.2. Origin and spread of PSP production in *C. raciborskii*

As it can be seen from the literature, the production of PSP in *C. raciborskii* exhibits a clear geographic pattern. This, together with the findings in the genomic context of the *sxt* cluster, prompted us to reconstruct a robust maximum likelihood tree of closely related genomes. The concatenation of 356 orthologous aligned proteins was used as input (see Supplementary Table 1 and Supplementary Fig. 1) for this phylogenetic analysis. We found that the *C. raciborskii*, *R. brooki* and *R. curvata* strains formed a monophyletic group with strong statistical support (Fig. 3), indicating that these taxa belong to the same species, as also supported by the genomic two-way ANI estimation (percentage of shared genes between strains of 94.93 to 99.77%) (Supplementary Table 3). This finding supports the recent unification of *Cylindrospermopsis* and *Raphidiopsis* under the genus *Raphidiopsis* based on a polyphasic approach that included phenotypic and phylogenetic data (Aguilera et al., 2018). Within this group and similar to previous findings (Chonudomkul et al., 2004; Gugger et al., 2005; Piccini et al., 2011), two well-defined groups could be identified: the American clade and the Oceania/Europe/Asia clade (Fig. 3). The American clade comprises one North- and several South American strains, most of them PSP-producers. LB2897 (USA), which is also non-producer, is located in a basal phylogenetic position suggesting that North American strains could represent a diverging lineage (Fig. 3) also supported by the estimated ANI score (Supplementary Table 3). Note that there are two strains from Brazil (CENA303 and CYLP) that were reported as unable to produce this toxin (Hoffmann et al., 2017) (Fig. 3). Thus, applying a parsimony criterium the acquisition of the PSP-production ability could be mapped back to the common ancestor of the South American clade, being its absence in CYLP and CENA303 the result of a secondary lost event. In this context, this would be an evolutionary reversible process maintained as a low-frequency polymorphism within the species.

On the other hand, the monophyletic group Oceania/Europe/Asia possess CYL-producing and non-producing strains. The CYL-producers in Australia (Saker, 2014) and Singapur (Mohamed Nor et al., 2019) and the non-producers in Europe (Stenhauer et al., 2016; Fastner et al., 2003; Saker et al., 2003; Valério et al., 2005). According to Panou et al. (2018), Mediterranean *C. raciborskii* strains from Europe would share a common ancestor with strains from North America. The fact that the North American strain LB2897 lacked *sxt* and *cyr* clusters and its

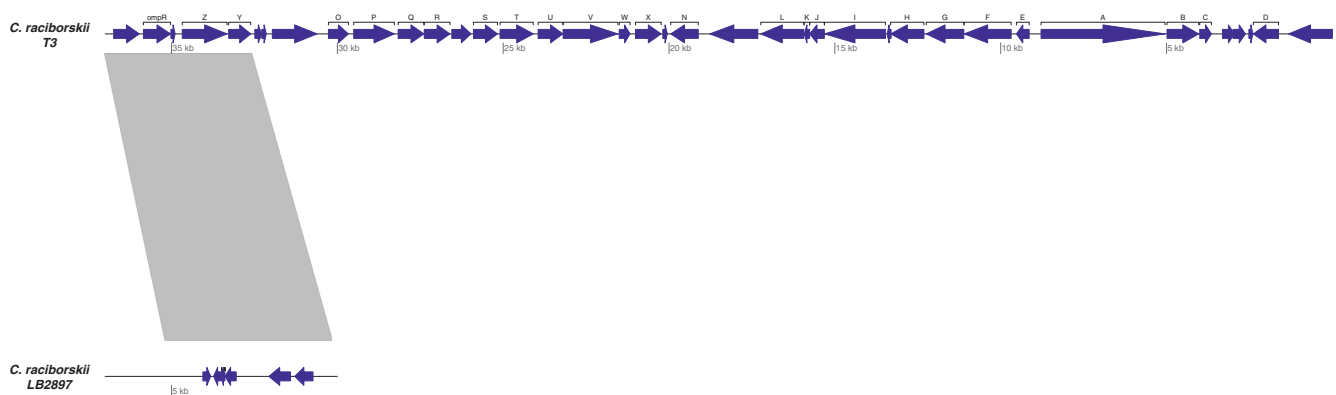


Fig. 2. Comparison between sxt genes found in the PSP-producing *C. raciborskii* T3 and in the non-toxic *C. raciborskii* LB2897.

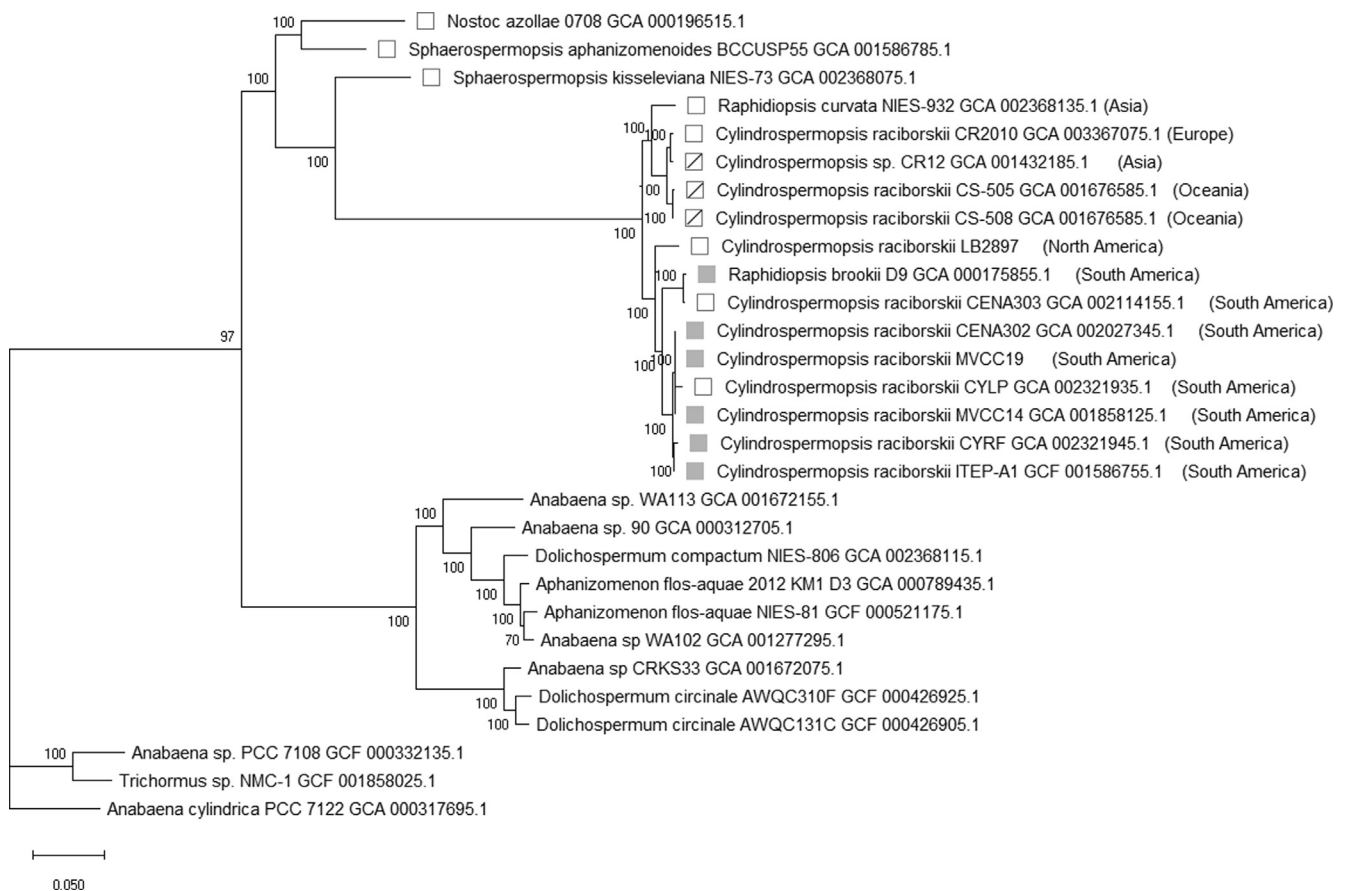


Fig. 3. Maximum Likelihood-based *C. raciborskii* phylogeny using 356 putative orthologous genes from 28 genomes. Numbers represent bootstrap support. Gray squares, PSP-producer strains; white squares non-PSP producers; white squares with a diagonal stripe, CYL-producers.

position at the tree would be in agreement with this theory.

In order to integrate all the available data, a literature survey was carried out including all the studies reporting the presence of *C. raciborskii* toxins in America. We found that PSP presence is clear in South American strains, including blooms dominated by *C. raciborskii* from the subtropics to tropical areas in Brazil (Fig. 6). Although there were few reports of this species in North America, there is only one isolate from Florida reported as PSP-producer, while other records corresponded to non-toxic cases (Supplementary Table 5). This unique report, despite unpublished, can be extremely important in the reconstruction of the evolutionary history of the toxicity (Rigamonti, 2016, see references in Supplementary Table 5).

The presence of genes involved in the production of cylindrospermopsin (*cyr* cluster) (Mihali et al., 2008) was reported in strains

from Uruguay and Brazil (Hoff-Rissetti et al., 2013; Piccini et al., 2013). Most of the studies involving South American strains included PSP-producers and there are only two reports where the presence of CYL was associated with *C. raciborskii*, one in Brazil and a bloom in Argentina (Fig. 6, Supplementary Table 5). The presence of *cyr* genes in South America may have a remarkable effect when mapping the CYL production acquisition event in the phylogeny of the species.

It is interesting to note that a third toxin, microcystin, was also reported as being produced by two *C. raciborskii* strains from South America (Fig. 6) and an isolate from Greece (Panou et al., 2018). Furthermore, the genes *mcyA* and *mcyE* involved in microcystin synthesis were detected in a Tunisian strain (Fathalli et al., 2011). These findings deserve a new study based on more information in order to make a hypothesis about the link between microcystin production and

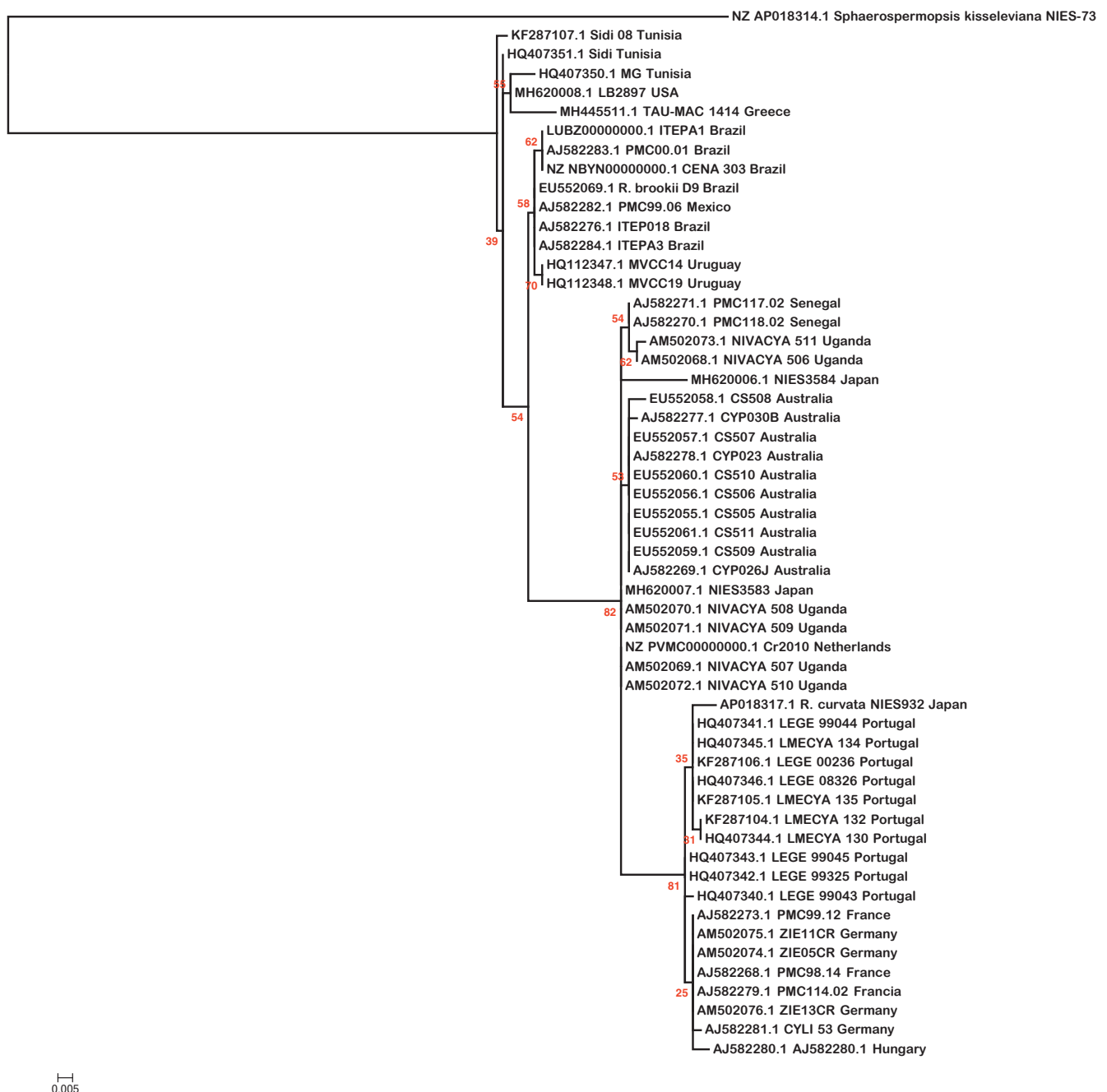


Fig. 4. Maximum likelihood tree based on *C. raciborskii* ribosomal ITS sequences (accession numbers are shown). Bootstrap node supports are indicated. Note that supports below 25% are not included in the tree.

biogeography.

3.3. Reconstruction of *C. raciborskii* dispersal route

More than twenty years ago and using the available data from all around the world, Padisák (1997) suggested Africa as the primary evolutionary center for *C. raciborskii*. Taking into account morphological and ecological characteristics, such as the high-temperature demand of the species, Padisák suggested that *C. raciborskii* spread from Africa to equatorial places in Indonesia and Central America and proposed a secondary evolutionary center in Australia, where the species evolved the ability to thrive in subtropical and temperate conditions. From there, it would have further expanded to the rest of the world. This proposal was later supported by a phylogenetic study of *C.*

raciborskii strains, suggesting a relatively recent spread of *Cylindrospermopsis* across America and Europe from warmer areas, together to a recent colonization of Australia by African strains (Haande et al., 2008). On the contrary, Moreira et al. (2015) suggested that the origin of *C. raciborskii* was in the American continent and from there it spread to Africa, followed by dispersion to Asia and Australia and being Europe the last continent to be colonized by the species. Panou et al. (2018) suggested a similar scenario but with Mediterranean Europe being colonized from North America and the rest of Europe from Africa, which would be a secondary radiation center. However, most of these studies are based on molecular genetic markers, such as ribosomal 16S and ITS, PC-IGS, *nifH* and *rpoCI*, and did not consider the toxicity phenotypes and genotypes of the analyzed strains. In New Zealand, Wood et al. (2014) found that CYL-producing isolates were closer to the South

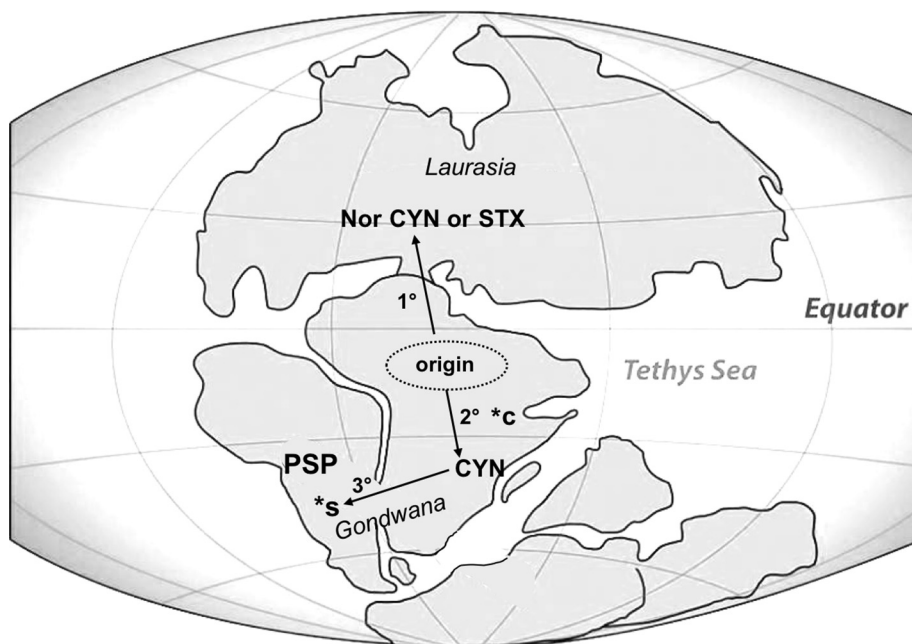


Fig. 5. Hypothetical scenario proposed in this work for the origin and dispersion of *C. raciborskii* based on phylogeny, genomic and toxic characteristics. PSP, saxitoxin and analogs producers; CYN: cylindrospermopsin producers. The dotted ellipse indicates the proposed first dispersion center of the species, toxic potential not known. From there, the first spread to North Africa and Laurasia (1), later to Southern Africa (2) and from there to current South America (3). Asterisks denote the acquisition of toxicity, *c for cylindrospermopsin and *s for saxitoxins.

American clades than to the Australian ones (Wood et al., 2014). In the proposed scenario of dispersal, the New Zealand landmass that emerged after the late Oligocene (25 MYA, Waters and Craw, 2006) may have been colonized by a CYL-producing South American proto-clade. Interestingly enough, Baron-Sola et al. (2012) detected the presence of *cyr* genes and CYL in field samples from Argentina (El Chaco) dominated by *C. raciborskii*. Although this toxin was not directly associated to a strain, the putative existence of such a population would open a new question about when and where the CYL-production ability was lost in South America (see above).

To date, there are a few available genomic sequences for this species and most of them belong to strains from Australia and South America. In order to increase the geographic span of our study we performed a phylogenetic analysis based on the ribosomal ITS of the species (Fig. 4). This phylogeny showed a Greek/North Africa/North America non-toxic group as the basal lineage of the species, agreeing with the proposals by Padisák (1997) and Haande et al. (2008). Note that the node support for these branches is rather marginal (bootstrap node support < 39%), so no branching ordering could be clearly stated among these basal lineages of the phylogeny. A second main lineage (bootstrap node support 54%) diverged and further divided in two clades, one comprising the South American strains (mostly PSP-producers) and another including the sub-Saharan Africa/Oceania/Europe strains (CYL-producers in Oceania or non-toxic in sub-Saharan Africa and Europe) (Fig. 4). This main division is mostly in accordance with the orthologous based phylogenetic tree (Fig. 3). Under this scenario and considering the finding of partial sequences of *cyr* genes in non-CYL producer American strains (Piccini et al., 2011; Hoff-Risetti et al., 2013), we conclude that the production of CYL is an ancestral character of this second main lineage (Sub-Saharan Africa/Oceania/Europe/South American strains) that was later lost during the spread to America. Indeed, Yilmaz and Philips (2011) found that *cyr* genes from North American strains of CYL-producing *Aphanizomenon ovalisporum* had more replacement changes within species than between species, suggesting the presence of slightly deleterious replacement mutations (Yilmaz and Philips, 2011). A similar evolutionary mechanism could have been taken place in *Cylindrospermopsis*.

Nonetheless, when we assessed the presence of *cyrA*, *cyrB* and *cyrC* genes in South American genomes, only low-identity gene homology was detected (40%). This incongruence between the PCR-based and genomic-based studies may be attributed to a technical bias since PCR

can amplify low-frequency polymorphisms that are not necessarily present in the sequenced genomes. Considering this incongruence and the position of CYL producers in the orthologous based phylogenetic tree shown in Fig. 3 we could not completely discard a more recent acquisition of CYL production.

Taking all the evidence into account a new scenario would emerge, where the last common ancestor to all current *C. raciborskii* was African and unable to produce any toxin. Later in a basal lineage arose the production of CYL but not PSP, and from there, the species spread to America and Oceania (Fig. 5). The CYL production in *C. raciborskii* samples from Nigeria (Mowe et al., 2015) also supports this hypothesis.

Based on the literature and in the evidence gathered in the present work, we agree with Padisák's early proposal of tropical Africa as a primary evolutionary center of *C. raciborskii* (Fig. 5). According to the results from phylogenetic analyses based on ribosomal ITS and orthologous genes, and considering the phylogenetic distribution of genes involved in CYL or STX synthesis, we hypothesized an early spread from a tropical place to North Africa and Laurasia (the continent that would later give place to North America and Eurasia) (Dietz and Holden, 1970), back when the northern part of Africa was still connected. Then, a secondary evolutionary event involving the acquisition of the cluster for CYL synthesis took place. These CYL-producing populations spread to warm places in sub-Saharan Africa, Oceania and South America (Fig. 5). Considering the observed evolutionary relationships of strains, it is plausible to suggest that this step in the invasion of the current Oceania and South America continents may have occurred shortly before the split of Gondwana into continents during the Cretaceous, ~150–100 million years ago. This agrees with the estimated divergence time calculated for *C. raciborskii*/*R. brooki* by Bayesian relaxed molecular clock analyses, which estimates occurred ca. 100 million years ago (Sánchez-Baracaldo et al., 2014).

In the present work, orthologues-based phylogeny showed that non-toxic LB2897 strain from North America has a basal position with respect to the South American strains (Fig. 3). On the other hand, ITS phylogeny revealed that this strain would have a relatively basal position to all the defined geographic clades (Fig. 4). *C. raciborskii* LB2897 was isolated from Lemon lake in Illinois and share its non-toxic genotype and phenotype with European strains. These findings, together to previous reports suggesting that Mediterranean strains from Europe are related to North American ones (Panou et al., 2018), and that this continent was part of Laurasia, strongly suggest that strains from the

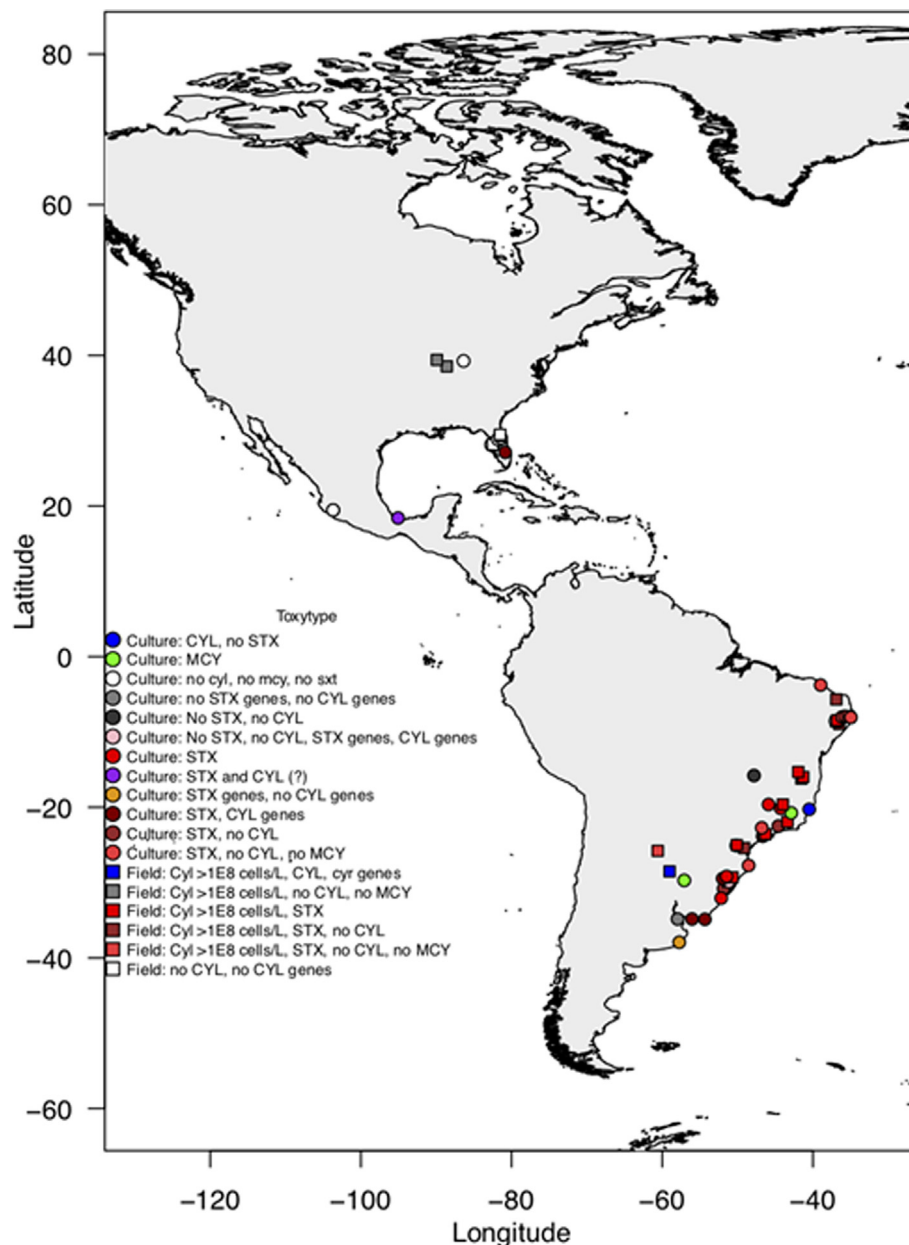


Fig. 6. Map of the Americas showing the records of *C. raciborskii* toxicity. Symbols indicate the type of data: circles, cultures; squares, phytoplankton field samples. Colours indicate the toxicity: red, brown and orange, STX and analogues; blue, CYL; green, MCY; grey and white, non toxic; rest of colours: combination of the above conditions. CYL, cylindrospermopsin production; STX, saxitoxin and analogs production, MCY, microcystins production.

northern part of North America are ancestral to that from South America (Fig. 5) and arose before the splitting of Laurasia.

Interestingly we found that *C. raciborskii* populations from India appear to be phylogenetically related to those from Africa/Oceania clade. The 16S rRNA from uncultured *C. raciborskii* of India (accession number KU377740) seems to be closely related to New Zealand isolates (accession numbers HG942526 and HG942525) (data not shown), strengthening our hypothesis. Once in South America, the ability to produce CYL was somehow lost, while another evolutionary breakthrough for the species occurred: the acquisition of the *sxt* gene cluster and the ability to produce PSP (Fig. 5). From South America, the STX-producing populations would have moved North (Fig. 6, Supplementary Table 5). Moreover, the isolation of a STX-producing strain harboring *cyr* genes from a Florida lake (*C. raciborskii* CCMP1973) would indicate that lakes from the southern part of the continent were colonized later by South American populations (see Fig. 6 and supplementary

material). Based on the observation that the genomic context in all PSP-producing strains is the same (Fig. 1B, Fig. 3) and the conservation of genomic organization of the *sxt* cluster (Moustafa et al., 2009), we suggest that the acquisition of this character by *C. raciborskii* occurred in a single event of horizontal gene transfer. According to Murray et al., the production of PSP is present in *C. raciborskii*/R. *brookii* and *Dolichospermum-Anabaena* and *Aphanizomenon* clades, which would indicate that the character was present in a common ancestor of the Nostocales. However, the *sxt* gene cluster of the *D. circinale* strain described by Murray et al. has a different genomic context, lacking the *sxtY* and *sxtZ* genes and exhibiting a different genetic arrangement. This would imply that the acquisition of *sxt* cluster by *C. raciborskii* and *D. circinale* could have been independent events and that the ability to produce PSP was not vertically inherited. This, together with the finding of putative transposases located at each end of the *sxt* cluster of *C. raciborskii* reinforce the idea of a horizontal gene transfer-mediated

acquisition. Further studies including more sequenced genomes are necessary in order to fill the gaps in the evidence and to confirm the different hypotheses.

4. Conclusions

Based on our findings, we propose tropical Africa as the original dispersion center of non-toxic *C. raciborskii*, which early spread from there to North Africa, Mediterranean Europe and North America. The ability to produce CYL probably took place in tropical Africa, after the first expansion, in populations that later spread to warm places in sub-Saharan Africa, Oceania, and South America. The ability to produce STX was acquired by the species after colonizing the American continent and populations having this ability would have spread towards North. Conversely, the ability to produce CYL appears to be lost. Based on a combination of phylogenetic, genomic, toxicity and biogeographic data available for *C. raciborskii* we propose an evolutionary scenario that would explain the geographic expansion and success of the species.

CRedit authorship contribution statement

Paula Vico: Conceptualization, Validation, Formal analysis, Investigation, Data curation, Visualization, Writing - review & editing. **Sylvia Bonilla:** Conceptualization, Investigation, Resources, Funding acquisition. **Bruno Cremella:** Conceptualization, Visualization. **Luis Aubriot:** Investigation, Resources. **Andrés Iriarte:** Conceptualization, Methodology, Software, Validation, Resources, Visualization, Funding acquisition, Supervision. **Claudia Piccini:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Resources, Writing - review & editing, Supervision, Project administration.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This work was supported by PEDECIBA and CSIC-Universidad de la República. We want to thank R. Sotelo-Silveira from the sequencing facility at IIBCE. This work was carried out in partial fulfillment of the requirements of P.V. for the doctoral degree from PEDECIBA. P.V. was recipient of a fellowship from ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación, Uruguay). CP, AI, LA and SB are members of the SNI and PEDECIBA.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.mpev.2020.106824>.

References

Abreu, V.A.C., Popin, R.V., Alvarenga, D.O., Schaker, P.D.C., Hoff-Rissetti, C., Varani, A.M., Fiore, M.F., 2018. Genomic and genotypic characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii*: Toward an intraspecific phylogenetic evaluation by comparative genomics. *Front. Microbiol.* 9, 306.

Aguilera, A., Gómez, E.B., Kaštovský, J., Echenique, R.O., Salerno, G.L., 2018. The polyphasic analysis of two native *Raphidiopsis* isolates supports the unification of the genera *Raphidiopsis* and *Cylindrospermopsis* (Nostocales, Cyanobacteria). *Phycologia* 57, 130–146.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.

Alvarenga, D.O., Fiore, M.F., Varani, A.M., 2017. A metagenomic approach to cyanobacterial genomics. *Front. Microbiol.* 8, 809.

Amaral, V., Bonilla, S., Aubriot, L., 2014. Growth optimization of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in response to phosphate fluctuations. *Eur. J. Phycol.* 49, 134–141.

Antunes, J.T., Leão, P.N., Vasconcelos, V.M., 2015. *Cylindrospermopsis raciborskii*: review of the distribution, phylogeography, and ecophysiology of a global invasive species. *Front. Microbiol.* 6, 1–13.

Aziz, R.K., Bartels, D., Best, A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R.A., et al., 2008. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genom.* 9 (1), 75.

Banker, R., Carmeli, S., Werman, M., Teltsch, B., Porat, R., Sukenik, A., 2001. Uracil moiety is required for toxicity of the cyanobacterial hepatotoxin cylindrospermopsin. *J. Toxicol. Environ. Heal. Part A* 62, 281–288.

Baron-Sola, A., Ouahid, Y., del Campo, F.F., 2012. Detection of potentially producing cylindrospermopsin and microcystin strains in mixed populations of cyanobacteria by simultaneous amplification of cylindrospermopsin and microcystin gene regions. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 75, 102–108.

Bernard, C., Harvey, M., Briand, J.F., Biré, R., Krysz, S., Fontaine, J.J., 2003. Toxicological comparison of diverse *Cylindrospermopsis raciborskii* strains: evidence of liver damage caused by a French *C. raciborskii* strain. *Environ. Toxicol.* 18, 176–186.

Bonilla, S., Aubriot, L., Soares, M.C.S., González-Piana, M., Fabre, A., Huszar, V.L.M., et al., 2012. What drives the distribution of the bloom-forming cyanobacteria *Planktothrix agardhii* and *Cylindrospermopsis raciborskii*? *FEMS Microbiol. Ecol.* 79, 594–607.

Briand, J.F., Le Boulanger, C., Humbert, J.F., Bernard, C., Dufour, P., 2004. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) invasion at mid-latitudes: selection, wide physiological tolerance, or global warming? *J. Phycol.* 40, 231–238.

Burford, M.A., Willis, A., Chuang, A., Man, X., Orr, P.T., 2018. Recent insights into physiological responses to nutrients by the cylindrospermopsin producing cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*. *J. Oceanol. Limnol.* 36, 1032–1039.

Burns, J., 2008. Toxic cyanobacteria in Florida waters. In: *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs*. Springer, pp. 127–137.

Cestèle, S., Catterall, W.A., 2000. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie* 82, 883–892.

Chonudomkul, D., Yongmanitchai, W., Theeragool, G., Kawachi, M., Kasai, F., Kaya, K., Watanabe, M.M., 2004. Morphology, genetic diversity, temperature tolerance and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) strains from Thailand and Japan. *FEMS Microbiol. Ecol.* 48, 345–355.

Contreras-Moreira, B., Vinuesa, P., 2013. GET_HOMOLOGUES, a versatile software package for scalable and robust microbial pangenome analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 7696–7701.

Cullen, A., D'Agostino, P.M., Mazmouz, R., Pickford, R., Wood, S., Neilan, B.A., 2018. Insertions within the saxitoxin biosynthetic gene cluster result in differential toxin profiles. *ACS Chem. Biol.* 13, 3107–3114.

Dietz, R.S., Holden, J.C., 1970. Reconstruction of Pangaea: breakup and dispersion of continents, Permian to Present. *J. Geophys. Res.* 75, 4939–4956.

Dittmann, E., Fewer, D.P., Neilan, B.A., 2013. Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and evolutionary roots. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 23–43.

Dordević, N.B., Simić, S.B., Ćirić, A.R., 2015. First identification of the cylindrospermopsin (CYN) producing by cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju in Serbia. *Fresenius Environ. Bull.* 24, 3736–3742.

Dokulil, M.T., 2016. Vegetative survival of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) at low temperature and low light. *Hydrobiologia* 764, 241–247.

Fabre, A., Lacerot, G., de Paiva, R.R., Soares, M.C.S., de Magalhães, V.F., Bonilla, S., 2017. South American PSP toxin-producing *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) decreases clearance rates of cladocerans more than copepods. *Hydrobiologia* 785, 61–69.

Fastner, J., Heinze, R., Humpage, A.R., Mischke, U., Eaglesham, G.K., Chorus, I., 2003. Cylindrospermopsin occurrence in two German lakes and preliminary assessment of toxicity and toxin production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates. *Toxicon* 42, 313–321.

Fathalli, A., Jenhani, A.B.R., Moreira, C., Welker, M., Romdhane, M., Antunes, A., et al., 2011. Molecular and phylogenetic characterization of potentially toxic cyanobacteria in Tunisian freshwaters. *Syst. Appl. Microbiol.* 34, 303–310.

Gkelis, S., Zoutsos, N., 2014. Cyanotoxin occurrence and potentially toxin producing cyanobacteria in freshwaters of Greece: a multi-disciplinary approach. *Toxicon* 78, 1–9.

Griffiths, D.J., Saker, M.L., 2003. The Palm Island mystery disease 20 years on: a review of research on the cyanotoxin cylindrospermopsin. *Environ. Toxicol.* 18, 78–93.

Gugger, M., Molica, R., Le Berre, B., Dufour, P., Bernard, C., Humbert, J.-F., 2005. Genetic diversity of *Cylindrospermopsis* strains (cyanobacteria) isolated from four continents. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1097–1100.

Guy, L., Kultima, J.R., Andersson, S.G.E., Quackenbush, J., 2011. GenoPlotR: comparative gene and genome visualization in R. In: *Bioinformatics*. Oxford University Press, pp. 2334–2335.

Haande, S., Rohrlack, T., Ballot, A., Røberg, K., Skulberg, R., Beck, M., Wiedner, C., 2008. Genetic characterisation of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) isolates from Africa and Europe. *Harmful Algae* 7, 692–701.

Hawkins, P.R., Chandrasena, N.R., Jones, G.J., Humpage, A.R., Falconer, I.R., 1997. Isolation and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* from an ornamental lake. *Toxicon* 35, 341–346.

Hoff-Rissetti, C., Dörr, F.A., Schaker, P.D.C., Pinto, E., Werner, V.R., Fiore, M.F., 2013. Cylindrospermopsin and saxitoxin synthetase genes in *Cylindrospermopsis raciborskii* strains from Brazilian freshwater. *PLoS ONE* 8 (8), e74238.

Hoffmann, L., Ramos, R.J.T., Guedes, I.A., Costa, P.F., Miguel, C.R.D., Silva, R., 2017. Draft genome sequences of two Brazilian cyanobacterial strains of *Cylindrospermopsis raciborskii*: differences in membrane transporters, saxitoxin production, and anti-oxidant activities. *Genome Announc.* 5, e00879–e917.

Jaja-Chimedza, A., Saez, C., Sanchez, K., Gantar, M., Berry, J.P., 2015. Identification of teratogenic polymethoxy-1-alkenes from *Cylindrospermopsis raciborskii*, and

- taxonomically diverse freshwater cyanobacteria and green algae. *Harmful Algae* 49, 156–161.
- Jiang, Y., Xiao, P., Yu, G., Sano, T., Pan, Q., Li, R., 2012. Molecular basis and phylogenetic implications of deoxycylindrospermopsin biosynthesis in the cyanobacterium *Raphidiopsis curvata*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 2256–2263.
- Kellmann, R., Mills, T., Neilan, B.A., 2006. Functional modeling and phylogenetic distribution of putative cylindrospermopsin biosynthesis enzymes. *J. Mol. Evol.* 62, 267–280.
- Kellmann, R., Mihali, T.K., Young, J.J., Pickford, R., Pomati, F., Neilan, B.A., 2008. Biosynthetic intermediate analysis and functional homology reveal a saxitoxin gene cluster in cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4044–4053.
- Lagos, N., Onodera, H., Zagatto, P.A., Andrinolo, D., Azevedo, S.M., Oshima, Y., 1999. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the fresh water cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon* 37, 1359–1373.
- Lajeunesse, A., Segura, P.A., Gélina, M., Hudon, C., Thomas, K., Quilliam, M.A., Gagnon, C., 2012. Detection and confirmation of saxitoxin analogues in freshwater benthic *Lyngbya wollei* algae collected in the St. Lawrence River (Canada) by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1219, 93–103.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., et al., 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078–2079.
- Li, R., Carmichael, W.W., Brittain, S., Eaglesham, G.K., Shaw, G.R., Liu, Y., Watanabe, M.M., 2001. First report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from *Raphidiopsis curvata* (Cyanobacteria). *J. Phycol.* 37, 1121–1126.
- Mihali, T.K., Kellmann, R., Muenchhoff, J., Barrow, K.D., Neilan, B.A., 2008. Characterization of the gene cluster responsible for cylindrospermopsin biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 716–722.
- Mihali, T.K., Kellmann, R., Neilan, B.A., 2009. Characterisation of the paralytic shellfish toxin biosynthesis gene clusters in *Anabaena circinalis* AWQC131C and *Aphanizomenon* sp. NH-5. *BMC Biochem.* 10, 8.
- Mihali, T.K., Carmichael, W.W., Neilan, B.A., 2011. A putative gene cluster from a *Lyngbya wollei* bloom that encodes paralytic shellfish toxin biosynthesis. *PLoS ONE* 6 (2), e14657. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014657>.
- Mohamed Nor, N.H., Te, S.H., Mowe, M.A.D., Gin, K.Y.-H., 2019. Environmental factors influence cylindrospermopsin production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (CR12). *J. Plankton Res.* 41, 114–126.
- Moreira, C., Fathalli, A., Vasconcelos, V., Antunes, A., 2015. Phylogeny and biogeography of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Arch. Microbiol.* 197, 47–52.
- Moustafa, A., Loram, J.E., Hackett, J.D., Anderson, D.M., Plumley, F.G., Bhattacharya, D., 2009. Origin of saxitoxin biosynthetic genes in cyanobacteria. *PLoS ONE* 4 (6), e5758. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005758>.
- Mowe, M.A.D., Mitrovic, S.M., Lim, R.P., Furey, A., Yeo, D.C.J., 2015. Tropical cyanobacterial blooms: a review of prevalence, problem taxa, toxins and influencing environmental factors. *J. Limnol.* 74, 205–224.
- Murray, S.A., Mihali, T.K., Neilan, B.A., 2011. Extraordinary conservation, gene loss, and positive selection in the evolution of an ancient neurotoxin. *Mol. Biol. Evol.* 28, 1173–1182.
- Neilan, B.A., Saker, M.L., Fastner, J., Törökné, A., Burns, B.P., 2003. Phylogeography of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Mol. Ecol.* 12, 133–140. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01709.x>.
- Ohtani, I., Moore, R.E., Runnegar, M.T.C., 1992. Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 7941–7942.
- Orr, R.J.S., Stüken, A., Murray, S.A., Jakobsen, K.S., 2013. Evolution and distribution of saxitoxin biosynthesis in dinoflagellates. *Mar. Drugs* 11, 2814–2828.
- Padisák, J., 1997. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. *Arch. Für Hydrobiol. Suppl. Monogr. Beitrage* 107, 563–593.
- Panou, M., Zervou, S.K., Kaloudis, T., Hiskia, A., Gkelis, S., 2018. A Greek *Cylindrospermopsis raciborskii* strain: missing link in tropic invader's phylogeography tale. *Harmful Algae* 80, 96–106.
- Pearson, L., Mihali, T., Moffitt, M., Kellmann, R., Neilan, B., 2010. On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. *Mar. Drugs* 8, 1650–1680.
- Piccini, C., Aubriot, L., D'Alessandro, B., Martigani, F., Bonilla, S., 2013. Revealing toxin signatures in cyanobacteria: report of genes involved in cylindrospermopsin synthesis from saxitoxin-producing *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Adv. Microbiol.* 03, 289–296.
- Piccini, C., Aubriot, L., Fabre, A., Amaral, V., González-Piana, M., Giani, A., et al., 2011. Genetic and eco-physiological differences of South American *Cylindrospermopsis raciborskii* isolates support the hypothesis of multiple ecotypes. *Harmful Algae* 10, 644–653.
- Rigamonti, N., Aubriot, L., Martigani, F., Bonilla, S., Piccini, C., 2018. Effect of nutrient availability on cylindrospermopsin gene expression and toxin production in *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Aquat. Microb. Ecol.* 82, 105–110.
- Rodriguez-R, L.M., Konstantinidis, K.T., 2016. The envomics collection: a toolbox for specialized analyses of microbial genomes and metagenomes. *PeerJ Prepr.* 4, e1900v1.
- Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M.A., Barrell, B., 2000. Artemis: Sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* 16, 944–945.
- Saker, M.L., Nogueira, I.C.G., Vasconcelos, V.M., Neilan, B.A., Eaglesham, G.K., Pereira, P., 2003. First report and toxicological assessment of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* from Portuguese freshwaters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 55, 243–250.
- Saker, M., 2014. Cyanobacterial blooms in tropical north Queensland water bodies. PhD Thesis. James Cook University, Townsville, Australia.
- Sánchez-Baracaldo, P., Ridgwell, A., Raven, J.A., 2014. A neoproterozoic transition in the marine nitrogen cycle. *Curr. Biol.* 24, 652–657.
- Sawayama, Y., Nishikawa, T., 2011. A synthetic route to the saxitoxin skeleton: synthesis of decarbamoyl α -saxitoxinol, an analogue of saxitoxin produced by the cyanobacterium *Lyngbya wollei*. *Angew. Chemie Int. Ed.* 50, 7176–7178.
- Shimizu, Y., 2003. Microalgal metabolites. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 236–243.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., et al., 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7, 539.
- Simpson, J.T., Wong, K., Jackman, S.D., Schein, J.E., Jones, S.J.M., Birol, I., 2009. ABySS: A parallel assembler for short read sequence data. *Genome Res.* 19, 1117–1123.
- Soto-Liebe, K., Murillo, A.A., Krock, B., Stucken, K., Fuentes-Valdés, J.J., Trefault, N., et al., 2010. Reassessment of the toxin profile of *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 and function of putative sulfotransferases in synthesis of sulfated and sulfonated PSP toxins. *Toxicon* 56, 1350–1361.
- Stanier, R.Y., Kunisawa, R., Mandel, M., Cohen-Bazire, G., 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriol. Rev.* 35, 171–205.
- Steenhauer, L.M., Wierenga, J., Carreira, C., Limpens, R.W.A.L., Koster, A.J., Pollard, P.C., Brussaard, C.P.D., 2016. Isolation of cyanophage CrV infecting *Cylindrospermopsis raciborskii* and the influence of temperature and irradiance on CrV proliferation. *Aquat. Microb. Ecol.* 78, 11–23.
- Stucken, K., John, U., Cembella, A., Murillo, A.A., Soto-Liebe, K., Fuentes-Valdés, J.J., et al., 2010. The smallest known genomes of multicellular and toxic cyanobacteria: comparison, minimal gene sets for linked traits and the evolutionary implications. *PLoS ONE* 5 (2), e9235. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009235>.
- Valério, E., Pereira, P., Saker, M.L., Franca, S., Tenreiro, R., 2005. Molecular characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains isolated from Portuguese freshwaters. *Harmful Algae* 4, 1044–1052.
- Wang, D.Z., Zhang, S.F., Zhang, Y., Lin, L., 2016. Paralytic shellfish toxin biosynthesis in cyanobacteria and dinoflagellates: a molecular overview. *J. Proteomics* 135, 132–140.
- Waters, J.M., Craw, D., 2006. Goodbye Gondwana? New Zealand biogeography, geology, and the problem of circularity. *Syst. Biol.* 55, 351–356.
- Wood, S.A., Stirling, D.J., 2003. First identification of the cylindrospermopsin-producing cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in New Zealand. *New Zeal. J. Mar. Freshw. Res.* 37, 821–828.
- Wood, S.A., Pochon, X., Luttringer-Plu, L., Vant, B.N., Hamilton, D.P., 2014. Recent invader or indicator of environmental change? A phylogenetic and ecological study of *Cylindrospermopsis raciborskii* in New Zealand. *Harmful Algae* 39, 64–74.
- Wiese, M., D'Agostino, P.M., Mihali, T.K., Moffitt, M.C., Neilan, B.A., 2010. Neurotoxic alkaloids: Saxitoxin and its analogs. *Mar. Drugs* 8, 2185–2211.
- Yilmaz, M., Philips, E.J., Szabo, N.J., Badylak, S., 2008. A comparative study of Florida strains of *Cylindrospermopsis* and *Aphanizomenon* for cylindrospermopsin production. *Toxicon* 51, 130–139.
- Yilmaz, M., Philips, E.J., 2011. Diversity of and selection acting on *Cylindrospermopsis* *cyrB* gene adenylation domain sequences in Florida. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2502–2507.

Capítulo 2

Interpretación del posible papel que tienen las PSPs en *Raphidiopsis raciborskii*: osmo-regulación y denso-dependencia

2.1 Resumen

A pesar de su relevancia para la salud humana y ecosistémica, la función biológica de las cianotoxinas es aún desconocida. Las PSP son neurotoxinas capaces de bloquear los canales de sodio activados por voltaje, capacidad que puede ser clave en situaciones de estrés osmótico, por lo que se ha hipotetizado un rol de osmoprotección. Por otro lado, se ha reportado evidencia experimental, para otra especie de cianobacteria, que sugiere un rol en la comunicación a nivel poblacional en donde las PSP actuarían como infoquímicos. Es necesario entonces contar con más información que permita esclarecer el papel biológico de estas toxinas en *R. raciborskii*. El objetivo de este capítulo fue determinar qué variables abióticas (estrés osmótico) y bióticas (densidad poblacional) afectan la producción de PSPs en *R. raciborskii*. Para ello, se realizaron experimentos de laboratorio con cultivos de dos cepas de *R. raciborskii* (una tóxica y no-tóxica). Por un lado, se estudió el crecimiento en condiciones de estrés salino y se encontró, para ambas cepas, que no es afectado por el estrés osmótico indicando que la capacidad de producir PSP no estaría relacionado a la osmoprotección. Por otro lado, se determinó si la densidad poblacional de *R. raciborskii* afecta la expresión de los genes *sxt* y la producción de PSP. Se encontró un efecto inverso entre la densidad poblacional y la producción de PSP. A menor densidad celular la producción de diferentes variantes de PSP por célula fue mayor. Estos resultados nos permiten inferir un rol de comunicación de las PSP, en donde estas moléculas actuarían como un infoquímico

2.2 Introducción

Las cianotoxinas son metabolitos secundarios generados bajo diversas condiciones ambientales y celulares. En las floraciones de cianobacterias, las concentraciones de cianotoxinas pueden llegar a ser muy altas, con impactos negativos importantes para la salud humana y fuentes de agua destinadas para diversos fines (Huisman et al., 2005; Bonilla, 2009, Chorus, 2012). Existe una gran diversidad de toxinas que se pueden agrupar en hepatotoxinas, citotoxinas, dermatotoxinas o neurotoxinas según sus efectos en los animales (Raposo et al., 2020). Dentro de las neurotoxinas, las PSP (saxitoxinas y análogos) están presentes en algunas especies de cianobacterias, particularmente del orden Nostocales (Soto et al., 2010). La biosíntesis de STX está ampliamente caracterizada y depende de enzimas codificadas por el *cluster* de genes *sxt* (Kellmann et al., 2008; Vico et al., 2020). Las toxinas PSP son alcaloides neurotóxicos que comparten un anillo de tetrahidropurina. Para dar lugar a los diferentes análogos, este anillo puede ser sustituido en las posiciones C11, N1 y C13 (R1–R4), (Tabla 1, Raposo et al., 2020). Los análogos de PST se clasifican según su cadena lateral R4 la cual origina los siguientes grupos principales que en orden decreciente de toxicidad se denominan carbamoilo, decarbamoilo y N-sulfocarbamoilo (Tabla 1). Dentro del grupo carbamilo encontramos a la STX, NeoSTX (que son no sulfatadas) y las GTXs 1-4 (gonyautoxinas, monosulfatadas). Por su parte, dentro del grupo N-sulfocarbamoilo se destaca la GTX5 (gonyautoxinas, también monosulfatadas) (Wiese et al., 2010).

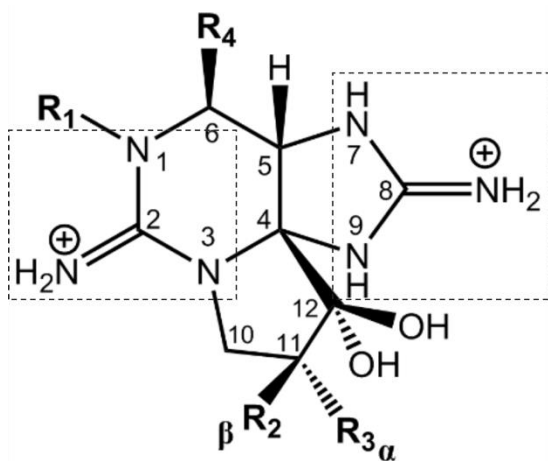


Figura 2.1. Estructura molecular común de las PSP Los dos motivos guanidos están señalados con líneas punteadas (Adaptado de Raposo et al 2020).

Las PSP son moléculas pequeñas de bajo peso molecular (típicamente entre 200 y 600 Da) que hasta el momento no han sido reportadas formando parte de otros complejos de macromoléculas (Durán-Riveroll and Cembella, 2017). La afinidad de las

PSP con el sitio de unión del canal de sodio (NaV) es 1:1, lo que significa que una molécula bloquea el canal de NaV total o parcialmente. Sin embargo, los diferentes análogos se unen al mismo sitio de unión del canal de NaV con diferente afinidad, dependiendo de su grupo funcional (Durán-Riveroll and Cembella, 2017). Debido a que las diferentes PSP muestran diferentes grados de toxicidad en las células animales, generalmente se abordan los factores relacionados a la toxicidad (Perez et al., 2011) y no al papel biológico y ecológico de las mismas. Teniendo en cuenta que *R. raciborskii* a menudo forma floraciones en ecosistemas acuáticos de todo el mundo (Antunes et al., 2015; Burford et al., 2016) y que las cepas reportadas en América son las únicas productoras de STX (Piccini et al., 2011; Vico et al., 2020) es necesario aportar información que permita entender el papel de estos metabolitos en los organismos. Uno de los factores que ha sido estudiado y sobre el cual no se ha llegado a un consenso, es la relación que puede tener la concentración de Na⁺ en el medio y la producción de las PSP. Debido a que en la evolución el blanco original de la STX fueron los canales celulares de K (anteriores evolutivamente que los NaV) varios autores han estudiado la presencia de iones Na⁺ en relación con la regulación de la producción de STX (Brentano et al., 2016; Ongley et al., 2016; Pomati et al., 2004b; Soto-Liebe et al., 2012). Por ejemplo, en relación con la concentración de sales en el medio, Pomati et al. (2004) encontraron que en la cepa de *R. raciborskii* T3, la STX se acumula positivamente en respuesta al aumento en la concentración de NaCl extracelular. Soto-Liebe et al. (2012) demostraron que la cepa *R. brookii* D9 era capaz de exportar STX fuera de la célula en respuesta a la presencia de distintas concentraciones de Na⁺ y K⁺ en el medio. Esto sería causado por sistemas de exportación tipo MATE, codificados en el propio *cluster* de genes *sxt* (*sxtF* y *sxtM*). Además, frente a condiciones de estrés iónico se modula la localización intracelular/extracelular de STX, de una manera que mejora el fitness. Por otro lado, en un lago dominado por *R. raciborskii*, se observó un aumento de STX como respuesta a la alta conductividad (Brentano et al., 2016) y estudios de laboratorio han correlacionado la producción de STX con condiciones de alta salinidad, específicamente en cepas de América del sur (Burford et al., 2016). En el caso de los eucariotas, los canales NaVs han sido objeto de estudio durante muchos años y son blanco de toxinas producidas en la naturaleza (Ren et al., 2001). En el caso de los procariotas la función de estos canales es relativamente desconocida. Sin embargo, luego de la caracterización del primer canal NaV clonado a partir de bacterias se vio que ambos (eucariotas y procariotas) comparten propiedades funcionales y farmacológicas. (Bagnérís et al., 2015; Ren et al., 2001). A partir de ahí se han identificado cientos de canales de sodio en bacterias (BacNaV) (Irie et al., 2010; Koishi et al., 2004; Lee et al., 2012) y se cree que desempeñan un papel en la motilidad bacteriana, quimiotaxis y la

homeostasis (DeCaen et al., 2014; Fujinami et al., 2007; Ito et al., 2004). Por lo tanto, podemos hipotetizar que dado que la STX tiene como blanco los NaV ésta podría actuar extracelularmente como un mecanismo osmo protector contra las variaciones de Na⁺ en ambientes límnicos. Si los BacNaV responden a las PSP de forma similar a la que ha sido reportada para células eucariotas (impidiendo el ingreso del sodio), aquellas cepas capaces de producir esta toxina tendrán una mejor adecuación frente al cambio en la presión osmótica provocada por variaciones de salinidad, en comparación a las cepas que no tóxicas.

Otro papel que ha sido menos estudiado es la posibilidad de que estas toxinas funcionen como un infoquímico (Holland and Kinnear, 2013; Kaplan et al., 2012; Omidí et al., 2017). Los infoquímicos son compuestos químicos que transportan información ya sea dentro de un individuo, entre individuos de la misma especie o entre individuos de diferentes especies (Dicke and Sabelis, 1988). Teniendo en cuenta que las cianobacterias dominan la formación de floraciones (Zhai et al., 2012) y aunque no hay evidencia concluyente de comunicación química en ellas (*quorum sensing*), es posible que el desarrollo de las floraciones pueda ocurrir a través de los mismos procesos que ya se conocen para las bacterias (proliferación celular repentina, formación de colonias, la producción *biofilms* y la síntesis de toxinas) (Herrera and Echeverri, 2021). Las bacterias perciben su propia densidad de población donde la detección de un *quorum* depende de la concentración local de señales que rodean a la bacteria (Braun and Bachofen, 2004; Mangwani et al., 2012; Waters and Bassler, 2005; Zhou et al., 2016). De esta forma, en las bacterias tanto la expresión génica como algunos procesos fisiológicos responden a la densidad celular (Lee and Zhang, 2015). En ese sentido para la cianobacteria *Microcystis*, productora de microcistina Zhai et al., 2012, sugirieron que la detección de quórum puede desempeñar un papel en la producción de microcistina-LR y se vio en un estudio más reciente que la producción de microcistina-LR y la expresión de genes *mcy* (microcistina) es regulada positivamente a medida aumentan las densidades celulares de forma dependiente de la densidad celular (Wang et al., 2021). Aunque es aún controversial, hay numerosos estudios con *Microcystis sp.* que plantean que la división celular, la densidad poblacional y el crecimiento pueden afectar directamente la transcripción de genes de *mcy* y la producción de microcistina (Kaebernick et al., 2002; Long et al., 2001; Lyck, 2004; Pereira and Giani, 2014; Wood et al., 2012; Zurawell et al., 2011).

Por el contrario, para el caso de *R. raciborskii* no hay casi estudios que relacionen la síntesis de toxinas con la densidad y la comunicación celular. Sin embargo, teniendo en cuenta que algunos autores han observado que la biosíntesis de STX está relacionada con el crecimiento en *R. raciborskii* (Stucken et al., 2014) y que nuestro

grupo de trabajo ha demostrado que la expresión de genes *sxt* aumenta con el crecimiento de forma aparentemente constitutiva (Vico et al., 2016), podemos hipotetizar que la STX en esta especie si podría tener un papel en la comunicación celular y pudiendo actuar como un infoquímico.

2.3 Objetivo

Determinar la influencia del estrés osmótico (variable abiótica) y la densidad poblacional (variable biótica) en la producción de PSPs en *R. raciborskii*.

2.4 Materiales y métodos

2.4.1 Evaluación de la respuesta celular al sodio (experimento 1, parte 1):

Se realizaron experimentos utilizando la tasa de crecimiento como variable de respuesta robusta para determinar si existe una influencia del sodio en el *fitness* del organismo.

El experimento consistió en cultivar a la cepa productora de STX (MVCC19) y a la no productora (LB2897) a dos concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) 10 mM (Pomati et al., 2004) y 40mM estando dentro del rango de los valores de conductividad presentes en el agua dulce. Para ello, se partió de cultivos en crecimiento exponencial con agitación constante, intensidad de luz de 60 $\mu\text{mol quanta/m}^2\text{s}^{-1}$, a 26°C y fotoperíodo de 12:12 (Bonilla et al., 2012b; Cremella, 2014). En ambas cepas se dejó un tratamiento sin NaCl (control). Para los cálculos de salinidad se tuvo en cuenta la salinidad intrínseca del medio de cultivo BG11 (2mM) (Stanier et al., 1971). Cada tratamiento se hizo por triplicado y se tuvo en cuenta que la concentración inicial fuera similar entre ambas cepas. Se siguió el crecimiento a través de la determinación de clorofila *a in vivo* por fluorometría (fluorómetro Turner Designs, Aquafluor) cada 24 hs. La tasa de crecimiento se utilizó como indicador global de la aptitud siendo la variable de respuesta medida durante 15 días. La tasa de crecimiento se calculó por triplicado para cada condición de cada cepa y se calculó según el modelo propuesto por (Cremella, 2017). Para el análisis de los resultados se trabajó con el promedio de las 3 réplicas de las tasas máximas (dentro de la fase exponencial de crecimiento) de cada réplica. Se realizaron pruebas de ANOVA para determinar diferencias significativas entre los tratamientos.

En la figura 2.2 se muestra un esquema del experimento 1.

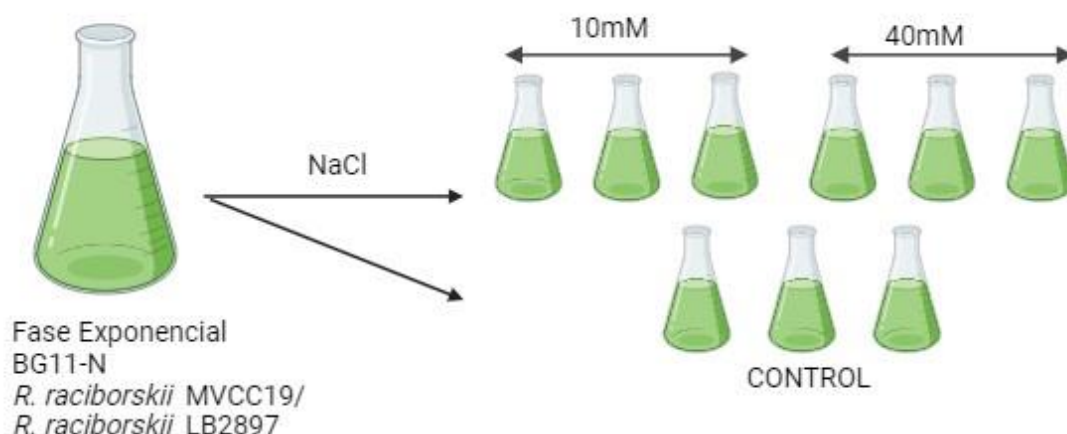


Figura 2.2. Esquema del diseño experimental 1 para la cepa LB2897 (no tóxica) y la cepa MVCC19 (productora de STX y análogos).

2.4.2. Evaluación Denso-dependencia (experimento 2, objetivo 2):

Se realizaron experimentos utilizando la tasa de crecimiento como indicador global de la aptitud para explorar si la densidad poblacional (abundancia celular) de *R. raciborskii* afecta la expresión de los genes *sxt* y la producción de STX y análogos (variables respuesta).

El experimento consistió en cultivar la cepa MVCC19 en medio BG11-N (Stanier et al., 1971) a dos densidades celulares iniciales diferentes en las mismas condiciones de luz, temperatura y fotoperíodo (60 $\mu\text{mol quanta/m}^2\text{s}^{-1}$, 26°C y fotoperíodo 16:8) (Bonilla et al., 2012; Cremella B, 2014) (Figura 2.3). Para ello, se partió de dos cultivos en crecimiento exponencial previamente aclimatados a las condiciones mencionadas. Se filtró el cultivo por un copo de 20 micras para retirar el medio de cultivo. Luego, se resuspendió la biomasa retenida en la malla (filamentos de *R. raciborskii*) en medio BG11-N. Uno de los cultivos fue resuspendido en un volumen igual de medio BG11-N al que tenía antes de ser filtrado (tratamiento control) y el otro fue resuspendido en el doble de medio BG11-N (tratamiento diluido 50%). Se verificó la densidad inicial de organismos en ambos tratamientos (densidad óptica, 750 nm: $0,28 \pm 0,09$ mAU y $0,49 \pm 0,042$ mAU tratamiento diluido y control respectivamente). Se extrajeron alícuotas para realizar conteos celulares de forma diaria durante 15 días. Para los conteos celulares las muestras fueron fijadas con lugol. La cuantificación se realizó en cámaras de 1ml mediante la selección de campos aleatorios hasta contabilizar 100 filamentos, de acuerdo con Sournia, 1978. Entre los 0 y 5 días, en los tiempos 0, 1, 2 y 5 días (inicio de la fase exponencial) se tomaron muestras para extracción de ARN para evaluar la expresión de toxinas por qPCR. Para el análisis de concentración de toxinas se tomaron

muestras en los tiempos 0, 48 y 144 hs que se preservaron a -20°C. Cada tratamiento se hizo por cuadruplicado. Se controló que la intensidad de luz que recibieron ambos tratamientos en los matraces fuese la misma y constante, para lo cual se utilizaron mallas que filtraban la luz en el tratamiento diluido. La luz percibida por los organismos se calculó según (Kenesi et al. 2008) a partir de la luz incidente y en el centro del recipiente. Las variables respuesta fueron la tasa de crecimiento, indicador global de la adecuación del organismo al ambiente, la expresión de genes *sxt* y la producción de toxinas (Figura 2.3). La tasa de crecimiento fue calculada según Vico et al., 2016.

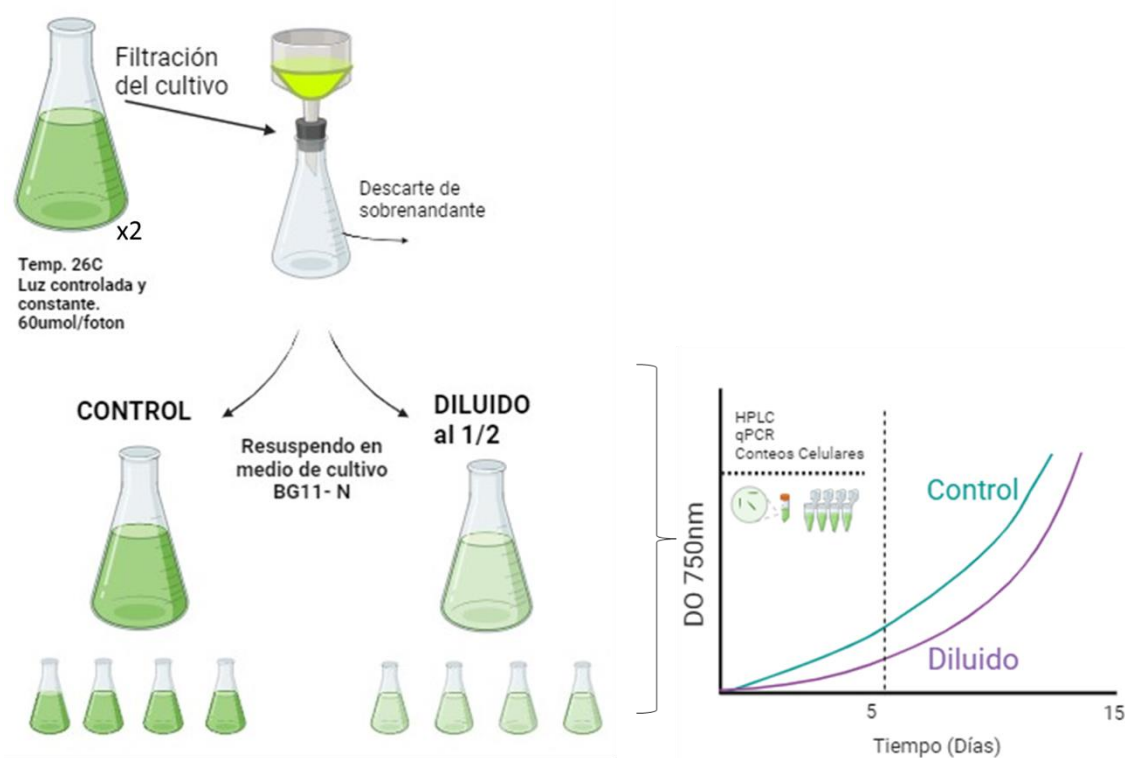


Figura 2.3. Esquema del diseño experimental 2. El cultivo de *R. raciborskii* previamente fue aclimatado a las condiciones de luz y temperatura indicadas, fue filtrado y suspendido usando medio BG11-N para los dos tratamientos (control y diluido). Se tomaron muestras para análisis (biomasa, qPCR y HPLC) entre los días 0 y 5.

2.4.3 Extracción de ARN del experimento 2

Para los análisis de expresión génica de cada réplica se filtraron 9 ml repartidos en tres filtros de 2μ (Milipore) y se conservaron en *RNAlater* (ambion) a -20 °C para su posterior utilización. La lisis celular fue hecha con el protocolo mencionado anteriormente. Para la extracción de ARN se utilizó el kit RNA Mini kit (Qiagen) siguiendo las indicaciones del fabricante. La cantidad de ARN obtenida fue evaluada por Qbit y nanodrop. Durante todo el proceso se mantuvo al ARN en frío. El ARN extraído fue

sometido a un tratamiento con DNase según el protocolo descrito en el kit (Invitrogen). Se utilizó 5 µl del ARN extraído y se realizó la RT para la síntesis de ADNc (High Capacity RNA to DNA, Invitrogen). El ADNc obtenido fue conservado a -20 °C bajo la dilución 1/10 para su análisis posterior.

2.4.4 PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR), experimento 2

La cuantificación de la expresión de los genes *sxt* fue determinada por qPCR. Las condiciones de la técnica de qPCR ajustada a cultivos de *R. raciborskii* y los *primers* específicos utilizados fueron puestos a punto anteriormente (Vico et al., 2016). Se utilizó el kit Power SYBER Green (Invitrogen) con un volumen final de 20 µl por reacción: 9,5 µl de agua, 0,5 µl de BSA (30 mg/ml), 7.76 µg de mix (Power SYBER Green), 0,12 µl de cada primer (50 µM) y 2 µl de cDNA de muestra. Se utilizó el termociclador Touch™ Real-Time PCR Detection System (BIO RAD) con las siguientes condiciones de ciclado: 2 minutos a 50°C, 15 minutos a 95°C, y 40 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C y 30 segundos a 72°C. Al final se realizó la cuba de melting desde 65°C a 95°C en incrementos de 1° cada 4 seg.

Se cuantificó la expresión de genes *sxt* (*sxtU*) en los dos tratamientos a diferentes tiempos durante los primeros 5 días del experimento (día 0, 1, 2 y 5). Se utilizó el gen *sxtU* porque se sabe que durante la biosíntesis de saxitoxina, su producto codifica para un intermediario común a todos los análogos de STX (Kellmann et al., 2008; Vico et al., 2016).

2.4.5. Curva de calibración y cuantificación de copias de cada gen (*sxtU*), experimento 2

Para determinar la eficiencia de amplificación de los genes elegidos se utilizó el gen de interés clonado en vectores (plásmidos, vector TOPO-TA cloning Kit, Invitrogen) y células competentes de *Escherichia coli* (Martínez De La Escalera, 2020). Para la cuantificación del número de copias de cada gen se hizo una dilución seriada 1/10 a 1/100000 de los genes clonados. Se realizó el ajuste de la curva y se determinó el número de copias por microlitro. Se calculó el número original de copias que hay en cada muestra a partir del número de copias génicas que contiene cada reacción de PCR. Se calculó también el cambio en la proporción de transcritos de *sxtU* como proporción de transcritos *sxtU* finales sobre la proporción de transcritos *sxtU* iniciales para el control y el tratamiento diluido.

2.4.6. Cuantificación de PSP por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Se cuantificó la concentración de ocho variantes de STX (Gonyautoxinas: GTX-1, 2, 3, 4 y 5, Neosaxitoxina (Neo-STX), Decarbamoil saxitoxina (Dc-STX) y Saxitoxina (STX)) mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para el análisis de las toxinas se analizaron tres réplicas por tratamiento y se tomaron 10ml de en el día 0, el día 2 y el día 5. Cada muestra fue acidificada con HCl 0.05M e inmediatamente congelada a -80 C para luego ser enviada para su análisis en servicio externo (TerraMares – Tecnología Ambiental, Rio Grande, Brasil). La concentración de saxitoxina (STX) y posibles análogos (GTX1, GTX2, GTX3, GTX4, GTX5 y Neo-STX) fueron determinadas y cuantificadas por HPLC (Rourke et al., 2008) con columna cromatográfica C8, y utilizando un detector de fluorescencia entre 330 y 390 nm (lámpara de xenón). Los cromatogramas se analizaron en base a la biblioteca de espectros de absorción para estándares (Material de Referencia Certificado (MRC), Consejo Nacional de Investigación de Canadá) y se obtuvo el valor total de STX equivalente en $\mu\text{g.L}^{-1}$ por muestra (Oshima, 1995). La concentración total de PSP se calculó como la suma de la concentración de cada análogo. El índice de toxicidad se calculó teniendo en cuenta la sumatoria de cada variante en relación a la STX (STX equivalente por célula; Lucas et al., 2004). Se determinó la toxicidad como equivalentes de saxitoxina por célula (eq STX/célula) con los siguientes coeficientes: STX = 1; NeoSTX = 0,92; GTX1 = 0,99; GTX2 = 0,36; GTX3 = 0,64; GTX4 = 0,73 (Lukas et al., 2004). La cuantificación de STX y análogos por HPLC fue total, es decir no se cuantificó la fracción intracelular y extracelular por separado. Sin embargo, se calculó la concentración de toxina por célula y se expresó en femtogramos/célula. Para el análisis de resultados se calculó la tasa de cambio en la producción de toxinas como el cambio en la proporción de PSPtotales del día 2/PSPtotal inicial y PSPtotales en el día 5/ PSPtotal en el día 2 tanto para el control y como para el tratamiento diluido. Se realizaron pruebas de ANOVA para determinar diferencias significativas entre los tratamientos.

2.5 Resultados

2.5.1. Evaluación del crecimiento de *R. raciborskii* en relación al sodio (experimento 1):

No se encontraron diferencias significativas en las tasas de crecimiento entre el control y los tratamientos con salinidad mencionados en ninguna de las dos cepas (ANOVA, $p > 0,05$). LB2897 mostró un leve decrecimiento en presencia de la máxima concentración de Na^+ (40mM) pero sin alcanzar diferencias significativas con el control luego de 14 días (Figura 2.4, Tabla 2). Ambas cepas registraron crecimiento exponencial entre los días 2 y 7 el cual decrece hacia la fase estacionaria a partir del día 10 en LB2897 y en el día 7 en MVCC19 (Fig. 2.4).

Tabla 2.1 Tasas de crecimiento ($\mu \text{ día}^{-1}$) para las dos cepas en cada tratamiento del experimento con NaCl. Promedio $\pm$ desvío estándar ($n=3$).

Cepa	Tratamiento	Tasa máxima de crecimiento (d-1)
LB2897	Control	0,24 ($\pm 0,01$)
	10mM de Na	0,21 ($\pm 0,03$)
	40mM de Na	0,25 ($\pm 0,02$)
MVCC19	Control	0,20 ($\pm 0,03$)
	10mM de Na	0,25 ($\pm 0,01$)
	40mM de Na	0,20 ($\pm 0,01$)

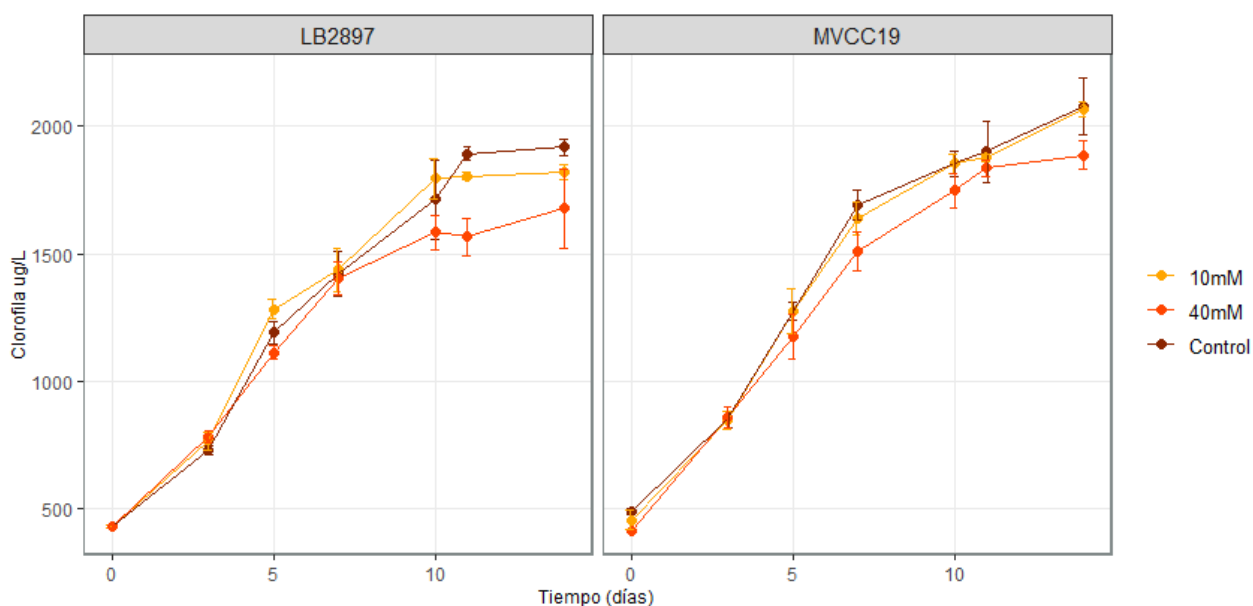
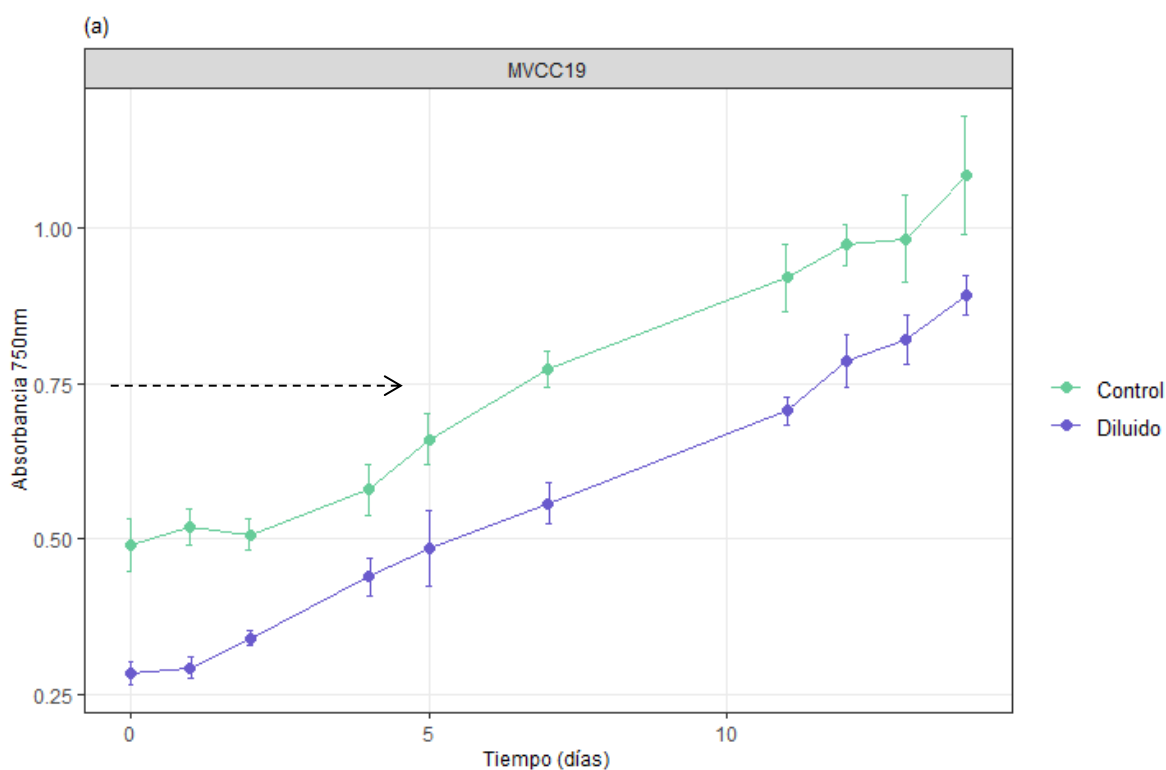


Figura. 2.4. Curvas de crecimiento de cada cepa LB2897 y MVCC19 en la condición de control (BG11-N) y BG11-N con NaCl 10 mM y NaCl 40mM. Las barras verticales representan la desviación estándar (n = 3).

2.5.2 Evaluación de la denso-dependencia: crecimiento de *R. raciborskii* en dos densidades celulares diferentes

El crecimiento de los organismos presentó diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA, $p < 0,01$) (Figura 2.5.a). La velocidad de crecimiento máxima (μ_{Max}) ocurrió al inicio de la fase exponencial (entre el día 2 y 5) y fue significativamente mayor para el cultivo diluido con respecto al control (μ_{Max} control: $0,36 \pm 0,04 \text{ d}^{-1}$; μ_{Max} diluido: $0,41 \pm 0,01 \text{ d}^{-1}$; ANOVA, $p=0,01$). Durante los primeros 5 días, el cultivo control incrementó 3 veces el número de células por ml mientras que el diluido aumentó 6,26 veces (Figura 2.5b).



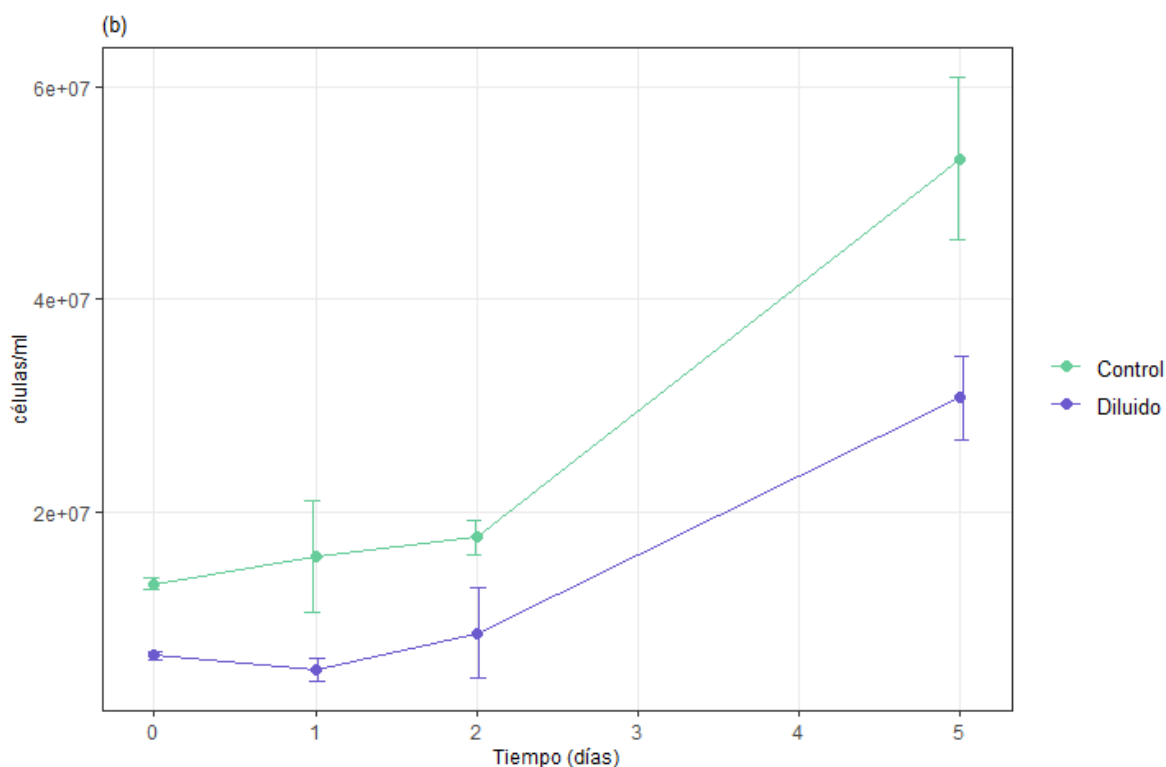


Figura 2.5. Curva de crecimiento para *R. raciborskii* MVCC19 en cultivo control (verde) y cultivo diluido (violeta) en medio de cultivo BG11 privado de Nitrógeno. Evolución temporal de la densidad óptica (DO), a 750nm durante toda la curva de crecimiento (15 días) (a) y en (b) se muestra el del número de células por mililitro durante el tiempo de incubación del experimento (5 días). La (--->) indica el rango de tiempo donde se realizó el experimento

2.5.3 Evaluación de la expresión del gen *sxtU*

La tendencia de expresión del gen *sxtU* fue similar entre ambos tratamientos (rs, $p > 0.05$) (Figura 2.6). Al igual que la tasa máxima de crecimiento, la transcripción del gen *sxtU* mostró un aumento mayor en el tratamiento diluido que en el control, siendo 103 (± 13.26) veces mayor al día 5 en relación al día 0 en el tratamiento diluido y 4.8 (± 5.77) veces en el control (ANOVA, $p < 0.05$).

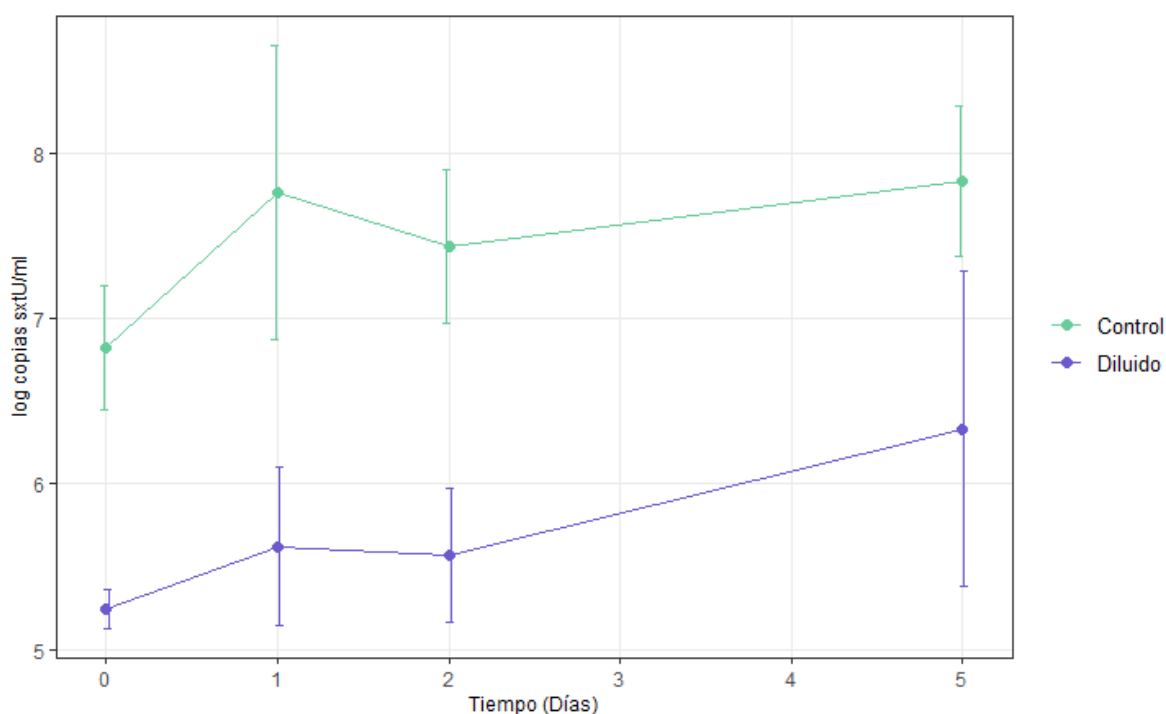


Figura 2.6. Abundancia de transcritos (copias/ml) de los genes *sxtU* para tratamiento control y el tratamiento diluido en función del tiempo de incubación (días) en *R. raciborskii* MVCC19. Eje Y en log10.

Las PSPs detectadas a lo largo del experimento fueron GTX-2, GTX-3, GTX-4, GTX-5, NeoSTX y STX. Los tratamientos (control y diluido) difieren en concentración total y presencia de análogos. La toxicidad fue mayor en el tratamiento diluido que en el control (ANOVA, $p < 0.05$). La concentración de PSP/célula en el tratamiento diluido varió significativamente entre el día 0 y el día 2 y entre el día 2 y el día 5 (ANOVA, $p < 0.05$ para ambos tiempos) mientras que no se detectaron cambios significativos en el control (Figura 2.7a). Las diferencias significativas en el tratamiento diluido se debieron a la variación en la concentración por célula de los análogos GTX-3, GTX-4, GTX-5 y NeoSTX detectados principalmente en el día 2 (Figura 2.7b).

El análogo GTX-4 fue el de mayor concentración por célula y el único detectado en ambos tratamientos en todos los tiempos de incubación. GTX-4 registró su máxima concentración en el tratamiento diluido el día 2 ($1,33 \pm 0,94$ fg/cél.). Los análogos GTX-3 y GTX-5 también fueron detectados en ambos tratamientos, pero no en todos los tiempos. En el control, solo se observó a GTX-3 y GTX-5 en dos de las réplicas del tiempo 2 y el tiempo 5 con una concentración $< 0,01 \pm 0,03$ fg/cél. En el tratamiento diluido, GTX-3 aparece el día 2 y se mantuvo constante durante todo el tiempo de incubación ($0,01 \pm 0,004$ fg/cél) y GTX-5 registró valores máximos el día 2 y 5 ($0,11 \pm 0,14$ fg/cél y $0,19 \pm 0,15$ fg/cél respectivamente). La STX, NeoSTX y GTX-2, fueron

detectados solamente en el tratamiento diluido a partir del día 2. La STX fue detectada solamente en el día 2 ($0,12 \pm 0,11$ fg/cél) mientras que NeoSTX y GTX-2 fueron detectadas tanto el día 2 ($0,47 \pm 0,5$ y $0,02 \pm 0,03$ fg/cél, respectivamente) y el día 5 ($0,02 \pm 0,03$ y $0,002 \pm 0,003$ fg/cél, respectivamente). No se detectaron análogos de GTX-1 y DC-STX en ninguna de las 18 muestras (Figura 2.7).

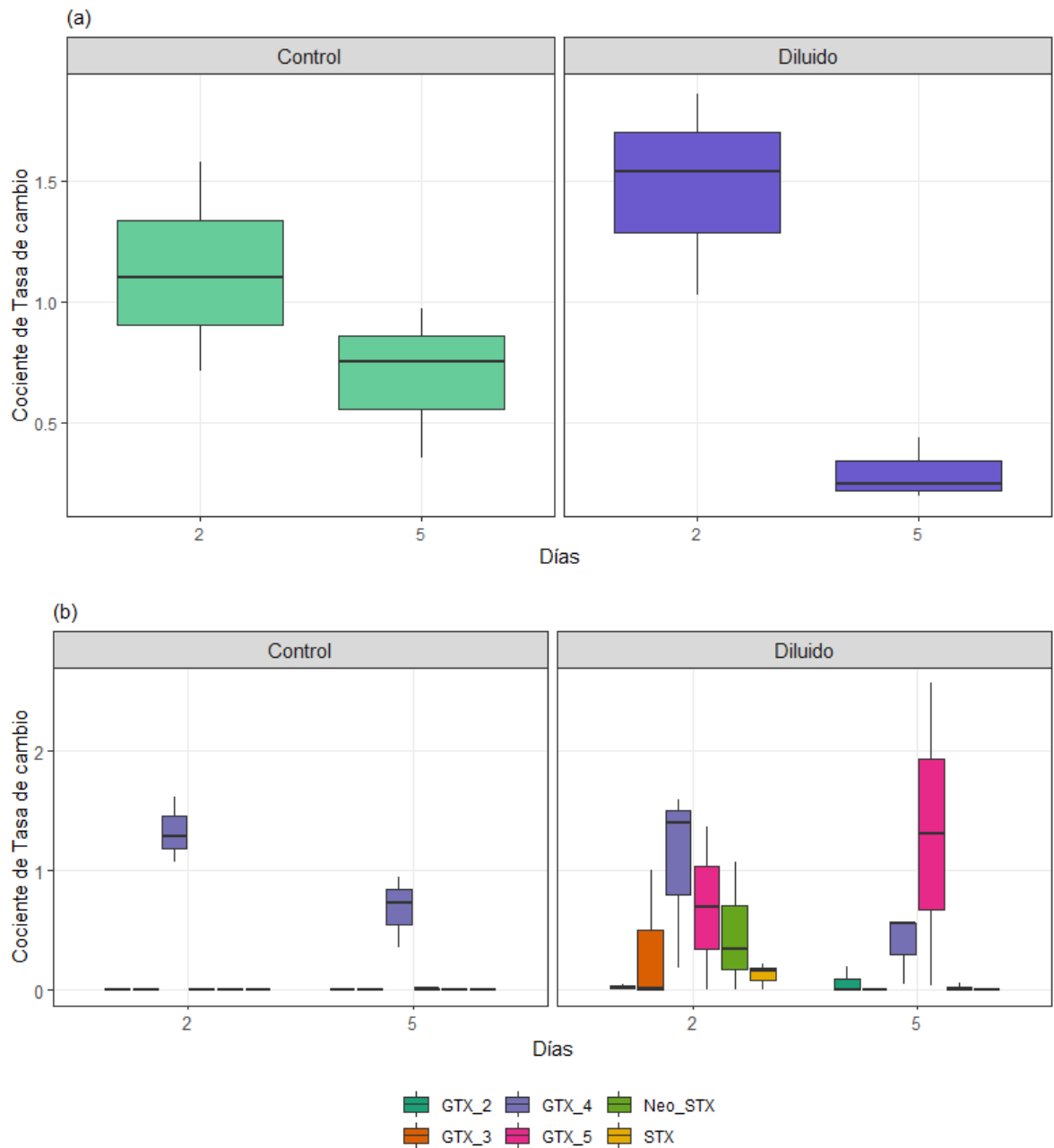


Figura 2.7 (a) Tasa de cambio de la concentración de PSP totales (suma de las variantes) expresada como el cambio de la proporción de PSP/célula entre el tiempo inicial y el día 2, y entre el día 2 y el día 5, para el tratamiento control y tratamiento diluido. (b) Tasa de cambio de STX, GTX-2, GTX-3, GTX-4 y NeoSTX expresada como el cambio en la proporción cada

variante/célula entre el tiempo inicial y el día 2 y entre el día 2 y el día 5 para el tratamiento control y tratamiento diluido.

En la figura 2.8 se observa un efecto de la densodependencia en el tratamiento diluido, con una relación inversa entre la concentración total de PSP y el número de células. En el tratamiento diluido al llegar al día 5, la densidad celular se asemeja a la densidad celular del tratamiento control y se observan niveles similares de PSP/célula (Figura 2.10).

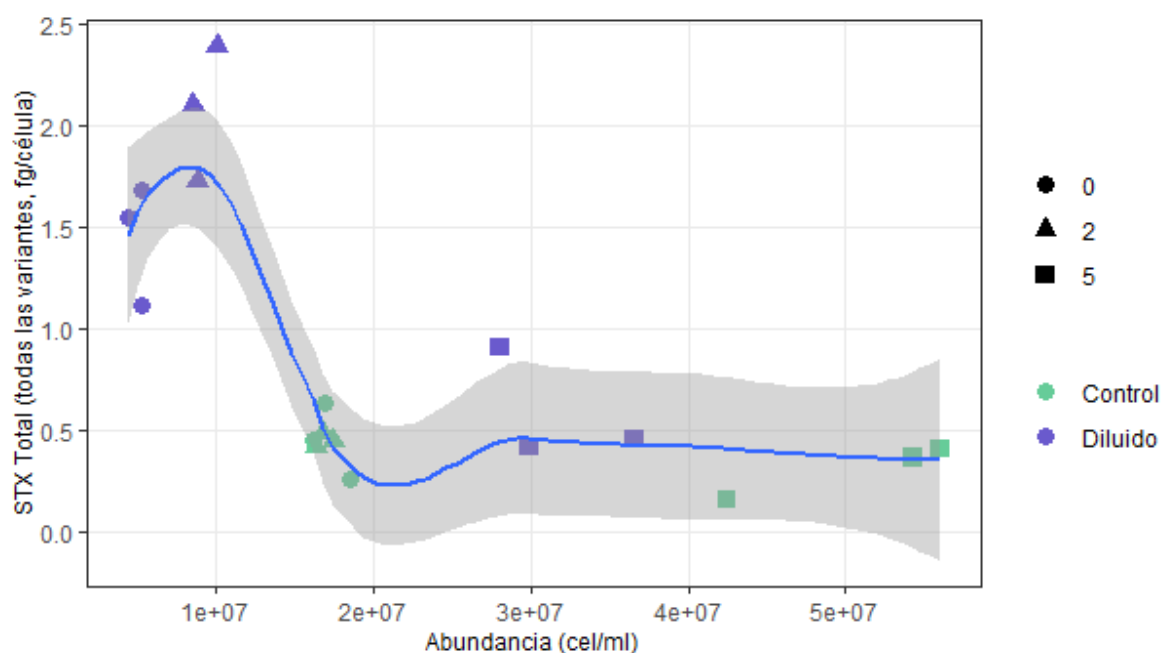


Figura 2.8. Concentración de PSP en función de la abundancia de células. El círculo negro indica el día 0, el triángulo el día 2 y el cuadrado el día 3. Áreas grises muestran el intervalo de confianza (método utilizado loess y formula $y=x$).

No se encontró una relación significativa entre las tasas de crecimiento y la tasa de cambio de PSP/célula. En la figura 2.11 se observa cómo entre el día 2 y el día 5 (donde la tasa de crecimiento fue mayor), la concentración de toxinas por células durante ese período fue similar entre el control y el tratamiento.

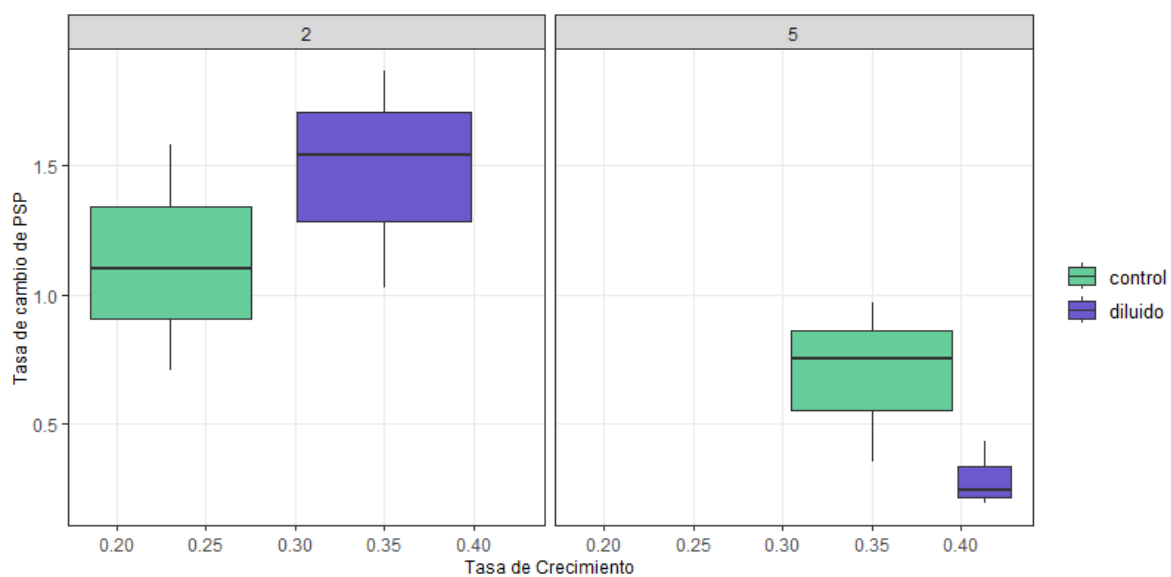


Figura 2.9. Tasa de cambio de producción de PSP/célula entre el día 0 a 2 y el día 2 a 5 vs las tasas de crecimiento durante ese periodo.

2.6. Discusión

Nuestros resultados permiten apoyar la hipótesis de que las PSP cumplen un rol de comunicación a nivel poblacional, descartando una función de osmoprotección. Los resultados son novedosos y plantean un nuevo escenario de trabajo para estudiar las respuestas de esta especie frente a los cambios ambientales.

2.6.1. Efecto de la osmolaridad en la síntesis de saxitoxina

La evidencia que nosotros encontramos no apoya nuestra hipótesis de trabajo. Se observó que el crecimiento de ambas cepas no se vio afectado por el aumento de la salinidad, indicando tolerancia a cambios de esta variable. Se ha observado para otras cepas de *R. raciborskii* que pueden sobrevivir a salinidades de hasta 4 g/l de NaCl (60 mM) pero manteniendo el metabolismo óptimo entre 2 y 3 g/l (30 y 50 mM) de NaCl (Duval et al., 2018; Moisander et al., 2002), valores en rangos similares a los usados en nuestro trabajo. Los únicos antecedentes sobre el papel de la STX en respuesta al estrés salino se obtuvieron de estudios con una misma cepa de *R. raciborskii* (Pomati et al., 2004; Ongley et al., 2016), pero sin realizar comparaciones con otras cepas tóxicas o no tóxicas para despejar respuestas diferenciales en relación a la salinidad.

Nuestros resultados concuerdan con el trabajo de Lima et al., (2020) quienes reportaron la tolerancia a 10 mM de NaCl de cuatro cepas de *R. raciborskii* (dos productoras de STX y dos no tóxicas) sin evidenciar efectos en el crecimiento, contenido de STX, clorofila-a, perfiles de proteínas o contenido celular de STX. Se podría hipotetizar entonces, que en *R. raciborskii* no se encuentran los canales de NaV como tal. Por lo tanto, la eliminación de los iones Na⁺ estaría mediada por los transportadores H⁺/ATP dependiente o por transportadores tipo ABC. Esto implica que la especie no necesitaría un mecanismo osmoprotector que impida el ingreso de iones Na⁺ frente a cambios ambientales. Además, aunque haya presencia de BacNav en cianobacterias, tampoco está claro que sean sensibles a las neurotoxinas como son en los vertebrados. Por ejemplo, la tetrodotoxina (TTX) que es similar a la STX y es otro de los bloqueadores de canales iónicos más estudiados, se une a los canales NaV con baja afinidad nanomolar con efectos neurotóxicos (Payandeh and Minor, 2015).

3.6.2. Efecto de la densidad poblacional en la síntesis de saxitoxina

Los resultados mostraron una relación inversa entre la expresión (y producción) de PSP y la densidad celular poblacional lo que implica que la producción de toxinas no se debe al crecimiento del cultivo. La capacidad de producir variantes de STX (en una concentración detectable) fue registrada solamente cuando la densidad celular fue modificada. Es decir, al disminuir la densidad celular a la mitad, a partir del día 2 se observó una respuesta rápida en la producción de GTX-3, GTX-4 (principalmente), GTX-

5 y NeoSTX. La detección de los análogos NeoSTX, GTX-2 y GTX-3 encontrados en este trabajo concuerdan con hallazgos previos de nuestro grupo de trabajo para la cepa MVCC19 (Fabre et al., 2017; Claudia Piccini et al., 2011) y otras cepas de origen brasilero (T2 y C10) (Lagos et al., 1999; Castro et al., 2004). Es posible entonces, que los diferentes análogos tengan funciones variables dentro de las células. Desde el punto de vista químico, puede deberse a que tienen diferentes afinidades para unirse al mismo sitio (NaV) (Wiese et al., 2010, Durán-Riveroll & Cembella, 2017) debido a las diferencias en las cargas parciales. La afinidad de las PSP con los canales de sodio se debe principalmente a la presencia de los grupos guanidinio en el anillo tetrahidropurínico cargados positivamente y los hidroxilos en la posición C12 (Shen et al., 2018) (Tabla 2, introducción general). La afinidad también está modulada por los sustituyentes y se reduce significativamente en presencia de grupos sulfato en el C11 para la síntesis de las gonyautoxinas (GTXs) (Llewellyn, 2006; M. Raposo et al., 2020). Por ejemplo, se ha visto que la afinidad por NaV del análogo GTX-4 (detectado en este trabajo), disminuye con respecto a STX y NeoSTX al tener un grupo funcional sulfatado (Durán-Riveroll and Cembella, 2017; Lukowski et al., 2019). Asimismo, se ha visto que solo una O-sulfotransferasa, codificada por el gen *sxtSUL*, es necesaria para generar GTX-4 y GTX-3 partir de STX (Andrinolo et al., 2002; N Lagos et al., 1999; M. Raposo et al., 2020; van Apeldoorn et al., 2007). Según lo encontrado en el capítulo anterior (Vico et al., 2020) el gen *sxtSUL*, estaría ausente en el genoma de la cepa estudiada (MVCC19). Sin embargo, se encontró que la secuencia del gen *sxtSUL* obtenida a partir de la proteína purificada O-sulfotransferasa en la cianobacteria *Microseira wollei* (*Lyngbya wollei*) (Lukowski et al., 2019) es homóloga a la secuencia de otro gen del *cluster sxt*, el gen *sxtP* que si fue identificado en el genoma de MVCC19 (NLQ04505.1). Esto confirma la presencia del gen involucrado en la síntesis de GTX-4 y GTX-3 en la cepa MVCC19.

Con respecto a la variante GTX-3, estudios anteriores en la cepa MVCC19 han demostrado que esta cepa produce esa variante en altas concentraciones (Piccini et al., 2011). Por otro lado, la variante GTX-5 detectada en este estudio pertenece al grupo N-sulfonocarbamilo (Tabla 2, introducción general) y tiene una menor afinidad por Nav (Lukowski et al., 2019) en comparación con la STX, NeoSTX y GTX2/3 y GTX1/4 (toxinas del grupo Carbamilo). Se ha descrito que la sulfotransferasa codificada por el gen *sxtN* es la encargada de producir GTX-5 a partir de STX (Raposo et al., 2020; Soto-Liebe et al., 2010, Mihali et al., 2011). Si bien este gen no ha sido detectado en la cepa analizada en nuestro estudio (Vico et al., 2020), la detección de la variante GTX5 nos permite volver a proponer lo anteriormente mencionado en el capítulo 2: a veces los genes que están ausentes en algunos organismos productores de STX, pueden ser

complementados por otro *locus* en el genoma. Por lo tanto, las reacciones en cascada que involucra a los genes *sxtN* y *sxtSUL* (sulfotransferasas) y a la STX como sustrato, permite obtener una mezcla de GTX5, GTX4 y GTX3 (Rapaso et al., 2020).

Es posible que los diferentes análogos de la toxina tengan distintas funciones dentro de las células debido a sus diferencias en la afinidad de unión al receptor y en los mecanismos enzimáticos para generarlas. El aumento en la tasa de producción de toxina se regula positivamente cuando la densidad celular es menor y esta situación habría dado lugar al aumento de algunas variantes. Teniendo en cuenta la tendencia inversa entre la producción de toxinas y la densidad celular poblacional podemos plantear que podría haber un efecto denso dependiente relacionado con la comunicación celular (comportándose como infoquímicos). Por un lado, intrapoblacional, entre los filamentos de la cianobacteria, si es que hay canales de NaV, censando variaciones en la densidad de organismos en la población. Y, por otro lado, para el reclutamiento del microbioma presente en la cianobacteria a través de fenómeno de quimiotaxis. Si bien las funciones biológicas de los canales de Na en los procariontes aún no está clara, se han identificado en bacterias (BacNaV) y se los ha relacionado también con la motilidad bacteriana, homeostasis y quimiotaxis (DeCaen et al., 2014; Fujinami et al., 2007; Irie et al., 2010; Ito et al., 2004; Koishi et al., 2004; Lee et al., 2012). Por lo tanto, si la densidad celular de la cianobacterias es alterada, probablemente también se generen alteraciones en la ficosfera al modificar la proximidad de los filamentos. En ese sentido, proponemos que otro de los mecanismos que tiene la cianobacteria para incorporar dicha microbiota que se vio “diluida” en la ficosfera sea a través de la síntesis de variantes de PSP que tengan un rol en esa comunicación. En nuestro estudio, la detección de variantes con un aumento significativo en la tasa de producción de toxinas se vio a las primeras 48hs del experimento. Además, para esta misma cepa se ha demostrado que las PSP no están presente en todos los filamentos de la población y, cuando está presente, se distribuye de manera irregular dentro de la célula (Piccini et al., 2015). Dicha producción podría ser un mecanismo por el cual las bacterias interactúan con las PSP. Por ejemplo, para los dinoflagelados marinos ya se ha propuesto que las bacterias asociadas pueden influir de forma indirecta en la producción de PSP a través de la síntesis de cofactores que inhiben o estimulan la síntesis (Gallacher and Smith, 1999). La presencia de una actividad oxidasa/reductasa en dinoflagelados se demostró inicialmente en un extracto de *A. tamarense* productor de PSP, donde las bacterias examinadas fueron capaces transformar las PSP, con posibles mecanismos de transformación de GTX 2/3 a GTX 1/4 y de GTX 1/4 a GTX 2/3 (Smith et al., 2002).

3.6.3 Implicancias ecológicas de las PSP en *R. raciborskii*

La toxicidad en ambos tratamientos difirió significativamente el día 2 indicando la variabilidad que tiene la producción de PSP en *R. raciborskii*, asociado con la condición fisiológica del organismo (Castro et al., 2004). Por ejemplo, condiciones de estrés lumínico mediado por radiación UV-B provocan un aumento significativo en la expresión del gen *stxU* sugiriendo que la producción de saxitoxina podría ser una respuesta al estrés (Beamud et al., 2016). Nuestros resultados implican que la concentración de toxinas en el ambiente también puede depender de la densidad poblacional de los organismos. Por ejemplo, se ha reportado en trabajos en lagos eutróficos en Uruguay con floraciones de la especie, en los que se encontraron tendencias inversas entre la biomasa y la relación STX/biomasa (González-Madina et al., 2021; Somma, 2014) con la concentración de STX/biomasa fue mayor a bajos niveles de biovolumen de *R. raciborskii* que cuando la población superó los 104 mm³/L (~0.36 y ~0.09 ugSTX/mm³, para biomasa altas y bajas, respectivamente en la Laguna del Sauce (González-Madina et al., 2021). En un ciclo anual del fitoplancton el lago Javier, también se encontró una tendencia inversa entre la biomasa y la concentración de STX/unidad de biomasa (Somma 2014). Por lo tanto el uso de la biomasa como bioindicador de la potencial peligrosidad de exposición a cianotoxinas (Chorus and Welker, 2021) puede indicar situaciones de más alto o más bajo riesgo, ya que al menos en esta especie, la cuota de toxina podría responder de manera inversa a la biomasa. Como hemos demostrado para esta especie, las variantes de la toxina cambian, lo que afecta la toxicidad, por lo tanto, para la gestión de los ecosistemas acuáticos se debe tener en cuenta estos aspectos para tomar decisiones. Las variaciones de la toxicidad, dependientes de la densidad poblacional, puede tener consecuencias tróficas ya que pueden afectar también la capacidad de depredación del zooplancton (Fabre et al., 2017). *R. raciborskii* es una de las especies más frecuentes en floraciones de América del Sur que producen generalmente PSP (Piccini et., 2011, Bonilla et al., 2012, Vico et al., 2016, Vico et al., 2020,). Por lo tanto, sería necesario realizar mayor cantidad de estudios ecofisiológicos que permitan aportar información para correlacionar mejor los indicadores de biomasa (biovolumen o clorofila-a) que establezcan rangos de confianza de peligrosidad de exposición a esta toxina para mejorar los planes de gestión

2.7 Conclusiones y perspectivas

La principal conclusión de este capítulo es que se observó una asociación negativa entre la densidad celular y la producción de PSP donde GTX-4 fue la variante detectada en mayor concentración por célula. La producción de distintas variantes de PSP (que tienen diferentes afinidades y modalidades de interactuar con los canales NaV) a

distintas densidades celulares sugiere que estos compuestos formarían parte de un mecanismo de comunicación entre los integrantes de la población. En el marco conceptual del holobionte de *R. raciborskii* (como se mencionó en la introducción general), hipotetizamos que dicha comunicación a través de las PSP no estaría confinada únicamente a las cianobacterias, sino también a la interacción entre éstas y el microbioma. Para contrastar esta hipótesis es necesario primeramente conocer la estructura de dicho microbioma y su función. Eso se abordará en el capítulo 3.

Capítulo 3

Descripción de los componentes y aproximación funcional al holobionte

3.1 Resumen

Recientemente se ha propuesto que un aspecto importante para explicar el éxito de las cianobacterias es la presencia de bacterias heterótrofas asociadas a su mucílago (microbiota). Dicha microbiota es fuente relevante de funciones metabólicas, generando que ambas partes sean mutuamente dependientes para sobrevivir. En este capítulo analizamos el microbioma de dos cepas de *R. raciborskii*, MVCC19 y LB2897, mediante dos abordajes: *metabarcoding* (secuenciación de amplicones del gen ARNr 16S) y metatranscriptómica. Se encontró que bajo idénticas condiciones de luz y temperatura, sus diferencias se evidencian en la estructura comunitaria del microbioma. A su vez, mediante la caracterización funcional se determinó que hay un conjunto de vías metabólicas que podrían considerarse complementarias. En tal relación, la cianobacteria proporciona la materia orgánica mientras que el microbioma tendría funciones relacionadas al metabolismo del nitrógeno, carbohidratos, degradación de carbono entre otras. Por lo tanto, tener en cuenta las características funcionales que resulten de esta interacción, implica que para entender y predecir la aparición y dominancia de estos organismos es necesario estudiarlos como holobiontes.

3.2 Introducción

En la actualidad existe un amplio conocimiento sobre la biología y ecología de cianobacterias planctónicas formadoras de floraciones tóxicas. Sin embargo, la mayoría de los estudios solo contemplan aspectos relacionados al organismo cianobacteria sin tener una visión holística que considere el rol de su microbiota, la funcionalidad y su diversidad (Dziallas and Grossart, 2011a; Eiler et al., 2004; Klawonn et al., 2015; Kolmonen et al., 2004). Por su parte, uno de los objetivos de la ecología microbiana es conocer el vínculo entre la composición de las comunidades microbianas y los procesos ecológicos como es el ciclo del carbono (fijación de CO₂ y respiración), el ciclo del nitrógeno (nitrificación, fijación de nitrógeno, desnitrificación) y ciclo del azufre (asimilación, respiración anaeróbica, etc). Esta información es necesaria para comprender los mecanismos fundamentales que controlan los procesos microbianos y las interacciones que se dan en los ecosistemas, así como aspectos relacionados a la estructura y función de las comunidades microbianas (Prosser, 2012)

Durante su ciclo de vida, las cianobacterias segregan un mucílago o exopolisacárido (EPS) compuesto por polisacáridos, péptidos, ADN y ácidos grasos donde se aloja su

microbiota asociada (Rossi and De Philippis, 2015). Se ha propuesto que la síntesis del EPS es una respuesta fisiológica a fluctuaciones en el ambiente permitiendo a las cianobacterias mantener su fitness y el microbioma asociado (Rossi and De Philippis, 2015). Las características químicas del EPS y su abundancia depende de la especie, la cepa de bacterias y el cultivo o condiciones ambientales. En condiciones oligotróficas, el EPS es la fuente de carbono orgánico disponible que, para ser metabolizado, necesita de enzimas producidas por diferentes bacterias (Haande et al., 2008). Durante las floraciones, la abundancia relativa del microbioma varía dependiendo de la biomasa de las cianobacterias (Woodhouse et al., 2018). En ese sentido, los procesos aparentemente más vinculados a la interacción cianobacteria-bacteria son la degradación de materia orgánica y el ciclo de nitrógeno. Entonces, es posible que las bacterias que tienen diferentes funciones metabólicas se seleccionen y que las diferencias estructurales y funcionales en la comunidad sean influenciadas por la materia orgánica y los nutrientes disponibles en el EPS (Louati et al., 2015). La incorporación de bacterias a la ficósfera (microzona rica en polisacáridos que poseen las cianobacterias, donde están las bacterias heterótrofas) probablemente ocurre a través de la quimiotaxis, contactos aleatorios y transmisión vertical (Seymour et al., 2017).

Por otro lado, como las cianobacterias sintetizan toxinas, es probable que, debido a la exposición a estos compuestos, el microbioma también tenga habilidades metabólicas que les permitan degradar o utilizar a las toxinas como fuente de carbono. En algunas cianobacterias tóxicas, como *Microcystis* spp., se demostró que las bacterias presentes en la ficósfera difieren notablemente de los planctónicos de vida libre (Wu et al., 2019). Por ejemplo, para las especies del complejo *Microcystis aeruginosa* (CMA) se ha reportado la existencia de poblaciones capaces de degradar microcistinas donde el *cluster* responsable de sintetizar las enzimas necesarias se expresa de manera constitutiva y se estimula cuando la concentración de microcistina aumenta (Gugger et al., 2005; Jiang et al., 2011; Lezcano et al., 2018). Además, estudios basados en cultivos mostraron cambios significativos en la composición de la comunidad bacteriana asociada al CMA dependiendo de la temperatura (Dziallas and Grossart, 2011b, 2011a) y se demostró que las bacterias capaces de degradar microcistina pueden inducir la producción de la toxina, estimulando la transcripción de uno de los genes involucrados en su biosíntesis (Y. Chen et al., 2019; Zhu et al., 2015). Asimismo, en cepas no tóxicas de *Microcystis* se reportó ausencia de genes para la síntesis completa del lipopolisacárido, encontrando solo los necesarios para la síntesis del lípido A. Este resultado sugiere que algunos miembros de la comunidad bacteriana estarían

íntimamente involucrados a la producción de la toxina (Xie et al., 2016) y permiten a las bacterias el acceso a compuestos específicos, como vitaminas y algunos componentes del lipopolisacárido de la membrana externa mientras que le proporciona a las bacterias carbono altamente biodisponible. Como contraparte, *Microcystis* spp. no tienen la capacidad de fijar nitrógeno por lo que podría beneficiarse del nitrógeno liberado por los rizobios presentes en su microbiota y al enriquecimiento de genes de fijación de nitrógeno (Jankowiak and Gobler, 2020).

Aunque se plantea que el éxito en *R. raciborskii* en tolerar, colonizar y adaptarse a diferentes condiciones ambientales (temperatura, luz y nutrientes) se debe a una estrategia que combina plasticidad fenotípica (Bonilla et al. 2016, Bonilla et al. 2012, Willis et al. 2018, Soares et al. 2012) y la existencia de diferentes ecotipos (Piccini et al. 2011), se desconoce cómo afectan estos cambios ambientales a la estructura del microbioma. En este sentido, conocer la composición y funcionalidad de su microbioma es relevante, no sólo para entender su papel en el crecimiento y la dinámica de la población de *R. raciborskii*, sino también como un medio para descubrir qué taxones bacterianos son capaces de degradar las PSP, característica que por ejemplo podría ser estudiada a futuro como un potencial biotecnológico para el tratamiento de agua potable.

En este capítulo se muestra la primera descripción de la comunidad bacteriana heterótrofa asociada a dos cepas de *R. raciborskii* pertenecientes a distintos ecotipos (Vico et al. 2020, Piccini et al. 2011). En primer lugar, se utilizó la metagenómica del gen 16S rRNA para evaluar los componentes bacterianos asociados con la ficósfera de dos cepas de *R. raciborskii*: MVCC19 productora de saxitoxina y LB2897 no productora. En segundo lugar, se estudió el metatranscriptoma de la cepa tóxica MVCC19 donde se reporta el perfil transcripcional y funcional de su microbiota asociada. En la figura 3.1 se muestran los filamentos de *R. raciborskii* MVCC19 y su comunidad de bacterias heterótrofas asociadas.

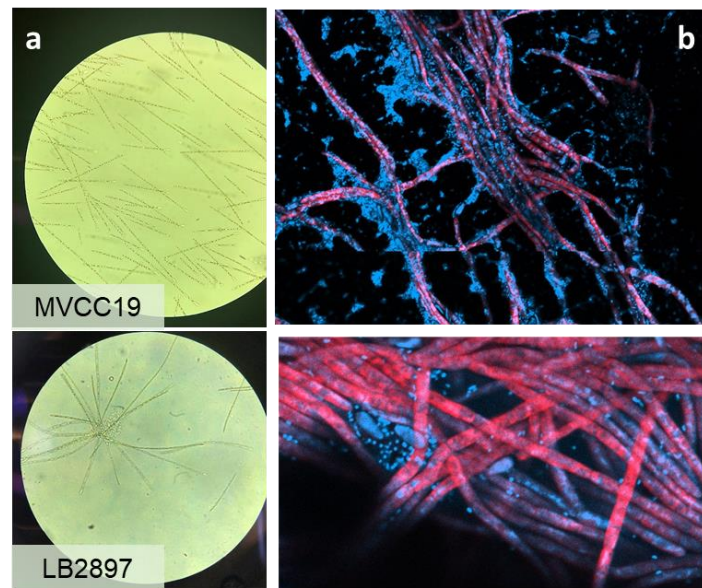


Figura 3.1. (a) Microfotografías de las cepas de *R. raciborskii* que muestran filamentos. Se muestra la diferencia entre la morfología de los filamentos (recto y separado para MVCC19 y ligeramente curvado unido para LB2897). (b) Microscopía confocal que muestra el microbioma de *R. raciborskii* (azul) y el filamento de *R. raciborskii* (rojo).

3.3 Objetivos

- Describir taxones bacterianos presentes en el microbioma asociado a *R. raciborskii*.
- Comparar la diversidad y el perfil de taxones que están presentes en ambas cepas analizadas.
- Identificar las funciones relevantes expresadas por el microbioma y por *R. raciborskii* así como las compartidas por ambos.

3.4 Metodología

3.4.1 Cepas de cianobacterias, condiciones de cultivo y muestras

Se analizaron las dos cepas con las que se ha trabajado en esta tesis, LB2897 y MVCC19. En la tabla 3.1 se presenta un resumen de sus características morfológicas, tóxicas y biogeográficas.

Tabla 3.1 Morfología, toxicidad y características biogeográficas de *R. raciborskii* MVCC19 y *R. raciborskii* LB2897. K, conductividad. SD, desviación estándar. STX, saxitoxina y análogos. CYN, cilindrospermopsina. El número de datos se indica entre paréntesis. ^aBonilla et al. 2016; ^bClark and Jones, 2006,2011,2013; ^cSoma et al., com. pers.; ^dPiccini et al. 2011; ^eVico et al. 2020; ^fEsta tesis.

	MVCC19	LB2897
Lago donde la cepa fue aislada, coordenadas.	Lago Javier ^a (lat, lon). -34,8640, -56,0409	Lemon lake ^b (lat, lon) 39,2568, -86,3929
Origen/uso del agua^a	Lago eutrófico y artificial /recreación ^a	Lago artificial/recreación ^b
Clima	Subtropical ^a	Templado ^b
Área (km²)	0,235 ^a	6677 ^b
Profundidad máx. (m)	10 ^a	6,1 ^b
K (mScm⁻¹) ± SD superficie/fondo	0,48 ± 0,02 (6) /0,55 ± 0,02 (6) ^c	0,154 ± 27,54 (18)/0,156 ± 33,1(18) ^b
pH ± SD	8,4 ± 0,08 (53) ^a	8,08 ± 1,01 (21) ^b
Temperatura (°C) Invierno/Verano	11/25,8 ^a	-5,0/30,0 ^b
Fósforo total (mg l⁻¹) ± SD	0,083 ± 0,008 (54) ^a	0,077 ± 0,03 (30) ^b
Morfología		

Morfología del filamento	Largos y separados	Largos y ligeramente curvos, unidos.
Largo del filamento (μm) $\pm$ SD	130,3 $\pm$ 55 (50)	162 $\pm$ 84 (50)
Ancho del filamento (μm) $\pm$ SD	2,57 $\pm$ 0,4 (50)	2,09 $\pm$ 0,26 (50)
Largo de células (μm) $\pm$ SD	8,3 $\pm$ 0,4 (30)	8,5 $\pm$ 0,6 (30)
Volumen de filamentos (μm^3)	590,2 (50)	556,11 (50)
Heterocito	Terminal	Terminal
Producción de PSP (STX/GTX2/GTX3/GTX4/GTX5)	Yes ^{d,e,f}	no ^{d,e}
Producción de CYN	No ^d	no ^d
Características biogeográficas	Clado América del Sur ^e	Clado de América del Sur Ancestral relacionado con cepas de África del Norte ^e

3.4.2. Procesamiento de muestras

Los cultivos estáticos se cultivaron en un medio BG11 modificado sin nitrógeno (Stanier et al. 1971) a 26°C y una intensidad de luz PAR de 80 μmol fotones $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ con fotoperiodo de 16:8 (luz/oscuridad). En estas condiciones se analizó la morfología de las dos cepas y se comparó, midiendo 30 células y 50 filamentos bajo el microscopio de cada una (aumentos 400x y 1000x). El biovolumen se calculó siguiendo el protocolo de Hillebrand et al., 1999.

3.4.3 Extracción de ADN y secuenciación del gen codificante para el ARN 16S

Para la extracción de ADN se adaptó el método descrito por Zhou et al. 1996 (Martínez De La Escalera et al., 2014). Se filtraron 5ml de cultivo a través de filtros estériles de policarbonato de 2,0 μm (Millipore). Para la lisis celular se utilizó un método químico. Es decir, las células fueron lisadas utilizando buffer TE (30 mM Tris·Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0) conteniendo 15 mg/ml lisozima y 15ul de proteinasa K. Luego se incubó a 15-25 °C durante 10 minutos, agitando con vórtex durante 10 segundos cada 2 minutos. Luego se agregó el buffer de lisis según número de células y 10ul de B-mercaptoetanol cada 1 ml de buffer. Una vez finalizada la lisis, el ADN fue extraído utilizando una solución de cloroformo/alcohol isoamílico 24:1 por tres veces. Se recuperó la fase acuosa conteniendo el ADN el cual fue precipitado con isopropanol a temperatura ambiente durante una hora. Se centrifugó, se descartó el sobrenadante y el pellet obtenido se lavó con etanol frío 70% (v/v). Se secó y se resuspendió en agua estéril toda la noche a 4°C. Por último, se incubó a 37°C en agitación constante. Finalmente se midió la cantidad de ADN por espectrofotometría y se almacenó a -20°C hasta su envío a servicio de secuenciación.

Se realizó la secuenciación del amplicón del gen que codifica para el ARNr 16S en el Servicio de secuenciación de Macrogen Inc. (Corea del Sur). Las bibliotecas de secuenciación fueron preparadas de acuerdo con los protocolos de secuenciación metagenómica de Illumina, cuya secuencia amplificada son las regiones V3-V4 del gen codificante para el ARN ribosomal 16S. Las secuencias de primers utilizados para las primeras amplificaciones fueron: 341F / 805R (341F: CCTACGGGNGGCWGCAG, 805R: GACTACHVGGGTATCTAATCC) (Herlemann et al. 2011). El producto final purificado fue luego cuantificado usando qPCR de acuerdo con la Guía del Protocolo de Cuantificación de qPCR (KAPA Kits de cuantificación de bibliotecas para plataformas de secuenciación de Illumina) y calificados con Tape Station DNA screen tape (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania). Se utilizó secuenciación *paired-end* con lecturas de 300 pb de longitud (2 × 300 pb) en la plataforma MiSeq™ (Illumina, San Diego, EE. UU.).

3.4.4 Microbioma: análisis de secuencias codificantes para el ARNr 16S

Los análisis bioinformáticos del microbioma se realizaron en R (versión 4.1.0) utilizando el Paquete DADA2 (<https://benjjneb.github.io/dada2/tutorial.html>). Los perfiles de calidad de las lecturas fueron inspeccionados y editados utilizando los parámetros recomendados en DADA2 (Callahan et al., 2016). Esto es, un umbral máximo de error de 2 nucleótidos en combinación con el recorte de 10 nucleótidos en cada extremo. Se eliminaron las quimeras y se definieron las variantes de secuencia del amplicón (ASV, por sus siglas en inglés) y se asignó la taxonomía utilizando la base de datos SILVA. Las ASV se asignan con un porcentaje de 100% de similitud. Las OTUs, en cambio, usan un porcentaje de similitud del 97%. El paquete DADA2 tiene un paso de aprendizaje de errores de secuenciación y permite predecir las ASV. Las ASV con menos de 10 lecturas en total se eliminaron. Para múltiples alineaciones se utilizó el paquete *Decipher* (Wright, 2015) y el árbol de filogenia se construyó con el paquete *Phangorn* (Schliep, 2011) con los parámetros recomendados por Callahan et al. (2016). La composición de los microbiomas bacterianos en diferentes niveles taxonómicos se analizó con Paquete *Phyloseq* (McMurdie and Holmes, 2013) y los gráficos se generaron utilizando el paquete *ggplot2* (Gómez-Rubio, 2017). Los análisis de rarefacción de la muestra se realizaron utilizando la biblioteca *Ranacapa* (Kandlikar et al., 2018). La diversidad alfa se evaluó como el Índice de diversidad de Shannon y diversidad beta como la distancia de Bray-Curtis.

3.4.5 Extracción de ARN y metatranscriptómica

Para los análisis del metatranscriptoma se partió de los mismos filtros utilizados para el experimento del capítulo 3. Se filtraron 9 ml repartidos en tres filtros de 2 μ (milipore) conservados en RNAlater (ambion) a -20°C . La lisis celular fue hecha con el protocolo mencionado anteriormente y para la extracción de ARN se utilizó el kit Direct-zolTM RNA Miniprep (Zymo Research). Este kit incluye, según el protocolo propuesto por el fabricante, un paso con trizol y un tratamiento con DNAasa I. La cantidad de ARN obtenida fue evaluada por Qbit y su calidad e integridad fue evaluada mediante Bioanalyzer en la plataforma de secuenciación del IIBCE. El ARN fue conservado en -80°C y fue enviado a secuenciar en tubos *ARNstable tubes* (Sigma).

3.4.6 Estudió de la diversidad funcional mediante análisis de metatranscriptoma

Se prepararon bibliotecas de transcriptos RNAseq hebra específica utilizando un TruSeq Stranded Total RNA (NEB Microbe), y la secuenciación se hizo con Illumina HiSeq x Ten sequencer (150pbx2). Se evaluó la calidad de la secuencia sin procesar antes del preprocesamiento y anotación utilizando el programa *FastQC* versión 11.9 Las secuencias cortas y/o de baja calidad y los adaptadores se recortaron con *Sickle* v1.33 (<https://github.com/najoshi/sickle>). Se utilizó el paquete *Subread* (Liao et al., 2013) para la construcción del índice del genoma de referencia y el mapeo contra el genoma. El propio genoma, secuencia y anotación, de la cepa MVCC19 previamente ensamblado en esta tesis. Luego, se utilizó el programa *FeatureCounts* (Liao et al., 2014) para contabilizar los *reads* mapeados a cada gen. Las estadísticas del mapeo fueron calculadas con el paquete *samtools* (Heng Li et al., 2009). Los *reads* que no mapearon contra el genoma de *R. raciborskii* MVCC19 se extrajeron utilizando los paquetes *samtools* (Heng Li et al., 2009) *picard* (<http://broadinstitute.github.io/picard/>) y *subread* (Liao et al., 2014). Estos *reads* fueron procesados según el *pipeline* de análisis metatranscriptómico SAMSA2 (Westreich et al., 2018). Las secuencias de ARN ribosómico se eliminaron utilizando *SortMeRNA* (Kopylova et al., 2012) y los *Pair-end reads* se fusionaron (*merge*) con *PEAR* v0.9.10. Estos pasos los incluye el *pipeline* SAMSA2. Luego de esto, las secuencias limpias fueron anotados con el alineador de secuencia *DIAMOND* (versión 0.8.3) y mapeados contra la base de datos de proteínas no redundantes RefSeq (www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/) del centro nacional de biotecnología de Estados Unidos (NCBI, por sus siglas en inglés) (creada en enero de 2019) (Buchfink et al., 2014; Tatusova et al., 2014) y contra SEED (Overbeek et al., 2014) por agrupación jerárquica de anotaciones funcionales y contra KEGG (Kanehisa and Goto, 2000) para comparar las funciones que aporta el microbioma con respecto a *R. raciborskii*. Se identificaron las vías en KEGG con los números KO utilizando el

mapeado online (<https://www.genome.jp/kegg/ko.html>). Para el análisis de los transcritos se eliminaron los que corresponden a proteínas hipotéticas y de alta expresión como por ejemplo ribosomales, factores de elongación, ADN polimerasa, al considerarse de expresión constitutiva. Se hizo un análisis por separado de los *reads* asignados a MVCC19 para identificar las funciones mayormente representadas en la cianobacteria y por otro lado se analizaron desde el punto de vista taxonómico y funcional los *reads* que no fueron asignados, los cuales corresponden al microbioma.

3.5. Resultados

3.5.1. Composición taxonómica del microbioma mediante secuenciación de amplicones del gen ARN ribosomal 16S

Después de filtrar por calidad, y eliminar las quimeras se obtuvo un total de 50.753 y 35.908 lecturas para el microbioma de *R. raciborskii* LB2897 y MVCC19, respectivamente. Se agruparon las secuencias redundantes en variantes de secuencia de amplicón (ASV) utilizando un valor de corte de 100% de identidad. La riqueza de taxones fue de 31 y 22 y el índice de diversidad de Shannon tuvo valores de 2,2 y 2,4 para LB2897 y MVCC19, respectivamente. El filo más representado en ambos ecotipos fue Proteobacteria. Entre éstos, las Alphaproteobacteria fueron las dominantes (Tabla 3.2, Figura 3.1). En ambos microbiomas, pocos géneros bacterianos representaron más del 50% de la comunidad.

En el caso de la cepa MVCC19 la bacteria más abundante pertenece al clado *Rhizobium-Allorhizobium-Agrobacterium* (o *Neorhizobium*) (Mousavi et al. 2014) (familia Rhizobiaceae, clase Alphaproteobacteria), con una abundancia relativa de 22,5%. Seguido por SM1A02, perteneciente a la familia Phycisphaeraceae, Planctomycetes (13,8%), y la familia Cytophagaceae del phylum Bacteroidetes (12,3%).

En el caso de LB2897, SM1A02 fue el género más abundante (26,2%), seguido de los géneros *Hirschia*, de la familia Hyphomonadaceae, clase Alphaproteobacteria (20,5%), *Labrys*, de la familia Xanthobacteraceae, clase Alphaproteobacteria (13,3%) y *Cutibacterium*, de la familia Propionibacteriaceae, clase Actinobacteria (12,36%) (Figura 3.2).

Tabla 3.2. Taxones del microbioma de *R. raciborskii* LB2897 y MVCC19 que presentan más del 97% de identidad de secuencia en el gen ARN ribosomal 16S. *El número de acceso de la secuencia en el GB se indica entre paréntesis junto a la identidad

Género	Abundancia Relativa (%)		Anotación de la secuencia más similar identificada en el <i>GenBank</i> .*	Origen indicado para cada muestra.
	LB2897	MVCC19		
SM1A02	26,17	13,79	Gen parcial de rRNA 16S de bacteria no cultivable (99%, LR643748)	Sistema de tratamiento de las aguas residuales.
<i>Hirschia</i>	20,54	5,80	Clon bacteriano no cultivable Hyphomonadaceae 1d_33690 (100%, MG805085)	Lodos depurados del proceso de eliminación de nitrógeno completamente autótrofo sobre nitrito con un filtro biológico aireado sumergido y el efecto del carbono inorgánico en la eliminación de nitrógeno y la actividad microbiana
<i>Labrys</i>	13,35	0,00	Clon de alpha proteobacteria no cultivable cafs1349 (100%, MF438647.1)	Agua
<i>Cutibacterium</i>	12,36	0,00	Más de 100 secuencias con 100 % de identidad, incluidos <i>C. acnes</i> (MT242489) y clones ambientales de <i>Paramecium</i> (MH556018)	Microbioma bucal. Aislamiento y caracterización de microorganismos predominantes durante la descomposición de materiales de desecho en un compostador a escala de campo
<i>Gemmobacter</i>	10,74	0,00	<i>Gemmobacter aquaticus</i> cepa 05SS-25 (100%, MG780340)	Sedimento de agua dulce
<i>Neorhizobium</i>	0,23	22,51	<i>Rhizobium</i> sp. TH167 (100%, KT826347)	Agregados de cianobacterias
<i>Brevundimonas</i>	0,00	12,30	<i>Brevundimonas lenta</i> cepa P4-2 (100%, MN181016, MH348813, MG642117)	Agua. Humedales construidos. Hielo
<i>Blastomonas</i>	0,24	9,64	<i>Blastomonas</i> sp. cepa MPSM-12 (100%, MG494710)	Daphnia es un reservorio de bacterias tolerantes al mercurio en el medio ambiente.
<i>Azospirillum</i>	2,03	2,86	Clon bacteriano no cultivable SIP21-RS-6 (99%, FR774694)	Suelo rizosférico de arroz.
<i>Asinibacterium</i>	0,80	6,47	<i>Sediminibacterium</i> sp. cepa FW305-C-49 (99%, MK402932)	Agua subterránea
CL500-29_marine_group	2,36	0,00	Clon bacteriano no cultivable Wat111 (100%, KC189789)	Estructura de la comunidad bacteriana sobre <i>Hydrilla verticillata</i> y <i>Vallisneria americana</i> en un manantial de agua dulce

<i>Niveispirillum</i>	0,91	4,23	LT628527.1	Lago eutrófico. Asociado con la cianofloración.
<i>Phenylobacterium</i>	0,00	5,68	Clon bacteriano no cultivable SPN0-300day-93 (99%, MF085152)	PAHs Suelo contaminado
<i>Bryobacter</i>	1,81	0,00	Clon bacteriano no cultivable (100%, LC336249)	Reactor de esponja colgante de flujo descendente (DHS) que trata el gas tolueno como fuente de carbono
<i>Devosia</i>	1,94	0,00	Clon bacteriano no cultivable (100%, LR640062)	Sistema de tratamiento de las aguas residuales
<i>Emticicia</i>	0,00	9,76	Clon bacteriano no cultivable PIExp_89 (97%) KJ818846	Impacto de las nanopartículas de TiO fabricadas en las comunidades de bacterias planctónicas y sésiles (río Moselle)
<i>Gemmatimonas</i>	1,60	0,25	<i>Aquabacterium</i> sp. clon no cultivable bac21-T3-T2 (100%) KY606809	Biofilms de agua caliente después del tratamiento de choque térmico.
<i>Phreatobacter</i>	1,12	0,00	Rhizobiales. Clon bacteriano no cultivable 1d_92826 (100%) MG803495	Lodos de depuradora del proceso de eliminación de nitrógeno completamente autótrofo sobre nitrito con un filtro biológico aireado sumergido y el efecto del carbono inorgánico en la eliminación de nitrógeno y la actividad microbiana.
OLB12	0,75	0,00	Clon bacteriano no cultivado F5K2Q4C04I6QGN (99%) GU911896	Lodos activados
<i>Muricoccus</i>	0,00	1,88	<i>Roseomonas</i> sp. strain FW305-C-119 (99%) MK402959	Agua subterránea
<i>Caulobacter</i>	0,00	1,82	Clon bacteriano no cultivado HK31-1-39-10 (100%) KX163332	Ecosistemas del subsuelo basáltico
<i>Roseococcus</i>	0,55	0,25	Clon bacteriano no cultivado N3 (100%) HQ697534	Carbón activado biológicamente para el tratamiento de agua potable
IMCC26207	0,36	0,10	Clon bacteriano no cultivado SZB6 (100%) AM176889	Sedimento de manglar
<i>Neorhizobium</i>	0,00	0,80	Rhizobium sp. strain A&R_E177 (97%) KX550303	Chimney Hills Pond, Tulsa
<i>Aminobacter</i>	0,18	0,00	Bacteria no cultivable (100%) LR654214	Sistema de tratamiento de las aguas residuales
oc32	0,15	0,29	Betaproteobacteria bacterium 5-B6 (98%) LC523959	Raíz de planta acuática

<i>Bauldia</i>	0,11	0,00	Clon bacteriano no cultivable MPB2-18 (99%) AB630694	Microbiota de musgo acuático en un lago de agua dulce, Antártida Oriental
<i>Sphingomonas</i>	0,09	0,00	<i>Sphingomonas</i> sp. cepa SM1-b (100%) MT279454	Bacterias productoras de exopolisacáridos del agua de la laguna de Ghadikola.
<i>Pseudonocardia</i>	0,07	0,00	<i>Pseudonocardia</i> sp. cepa IB2014P10-1 (100%) MH978626	Actinobacterias asociadas con aguas profundas del lago Baikal
<i>Nocardioide</i>	0,07	0,00	<i>Nocardioide kribbensis</i> cepa P86 (100%) MT487642	Organismos microbianos asociados a naves espaciales de las misiones Mars odyssey y Pathfinder
<i>Sphingopyxis</i>	0,04	0,08	<i>Sphingopyxis</i> sp. cepa T93 9100%) MT611302	Bacterias aisladas del suelo de cultivo de cebada de las tierras altas en el Tíbet
<i>Lacibacter</i>	0,06	0,00	Procariota no cultivable OTU029 (99%) KF680692	Biofilms de agua potable
<i>Leifsonia</i>	0,05	0,00	Microbacteriaceae Clon bacteriano no cultivable UVmen1_31 (99%) JQ701147	Agua de mesocosmos oligotróficos experimentales a largo plazo en Cuatro Ciénegas.
alpha_cluster	0,05	0,00	Clon bacteriano no cultivable Espejo_1_17_12 (98%) KM184952	Agua Lago Espejo, Argentina
<i>Paludibaculum</i>	0,03	0,06	Clon bacteriano no cultivable FL_03_167 (100%) KC666531	Bacterias asociadas a las colonias de <i>Microcystis</i> .
<i>Novosphingobium</i>	0	0,14	Clon bacteriano no cultivable LNH_9_9_11 (99%) KM124853	Agua del lago Nahuel Huapi, Argentina
<i>Stenotrophomonas</i>	0	0,14	No hay alineamiento	-
<i>Pseudoxanthobacter</i>	0,04	0,00	Clon bacteriano no cultivable EF_bacC09 (100%) JX564275	Sedimento de columnas de filtración lenta en arena (desechos de agua)

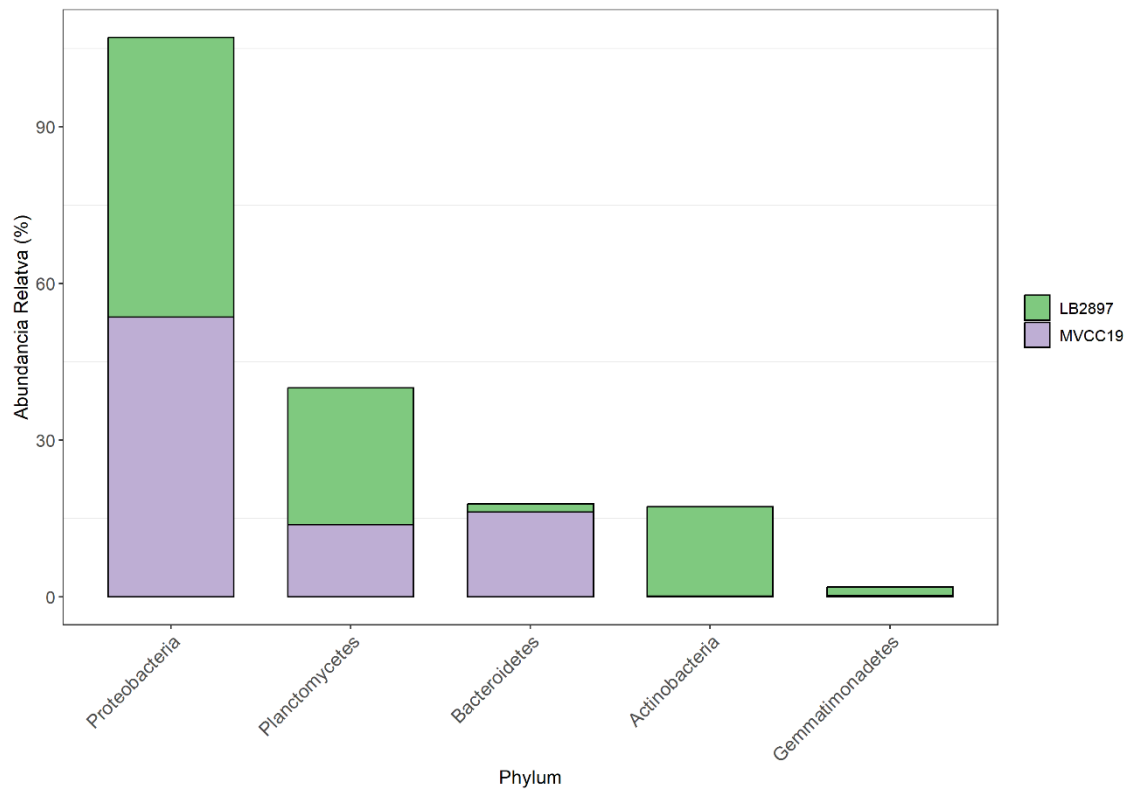


Figura 3.1 Abundancia relativa de los diferentes filos presentes en el microbioma de MVCC19, ecotipo productor de STX, y LB2897, ecotipo no productor de STX.

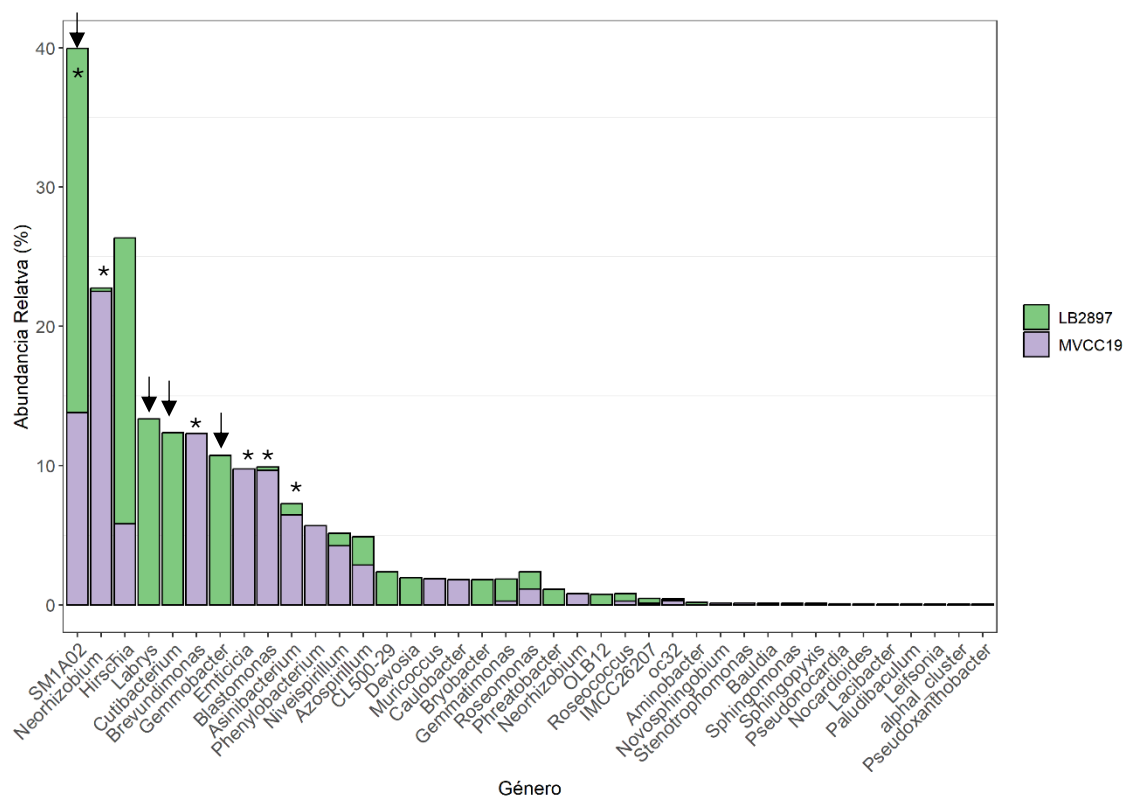


Figura 3.2 Abundancia de géneros bacterianos en el microbioma de MVCC19 y LB2897. Los asteriscos y las flechas indican los géneros que representan más del 50% de la comunidad en el ecotipo tóxico (MVCC19) y ecotipo no tóxico (LB2897) respectivamente.

3.5.2 Composición taxonómica del microbioma definida mediante la aproximación metatranscriptoma. Secuenciación metatranscriptómica global:

En la tabla 3.3 se muestra la cantidad de *reads* obtenidos en cada muestra luego de remover los adaptadores y las secuencias de baja calidad. Además, se indica el porcentaje de *reads* mapeados contra el genoma de *R. raciborskii* MVCC19 y el porcentaje de *reads* que no mapearon y que corresponden a el microbioma asociado.

Tabla 3.3. Número de *reads* mapeados y no mapeados contra el genoma de *R. raciborskii* MVCC19.

Muestra	No. de lecturas		% (no Mapeados)	Mapeadas	% (Mapeados)
	Total	No-mapeadas			
1	28.614.032	10.538.056	36,83	18.075.976	63,17
2	30.212.182	4.517.420	14,95	25.694.762	85,05
3	26.544.858	3.096.331	11,66	23.448.527	88,34
4	33.199.570	2.441.903	7,36	30.757.667	92,64
5	30.646.930	4.476.270	14,61	26.170.660	85,39
6	31.291.438	3.529.185	11,28	27.762.253	88,72
7	32.108.726	8.730.393	27,19	23.378.333	72,81
8	8.809.042	4.078.135	14,16	24.730.907	85,84

La composición taxonómica de la comunidad bacteriana activa para *R. raciborskii* MVCC19 determinada con la aproximación metatranscriptómica es similar a lo encontrado a partir la secuenciación del amplicón del ARNr 16S, sin embargo, encontramos una mayor proporción bacterias heterótrofas en los datos obtenidos a partir del metatranscriptoma. En este caso, la riqueza (147 géneros) y el índice de Shannon (3,4) estimado fue mayor (Abundancia total apéndice 2, Figura 2.1).

Nuevamente, el filo más representado fue Proteobacteria y dentro de este la clase Alphaproteobacteria (Figura 3.3). El taxón más abundante también pertenece al género *Rhizobium* (familia Rhizobiaceae, clase Alphaproteobacteria), con una abundancia relativa promedio de transcritos de 20.65% ($\pm 4.75\%$), seguido por el género *Gemmatimonas*, de la familia Gemmatimonadaceae, ($6.52 \pm 3,64 \%$), y *Blastomonas* de

la familia Sphingomonadaceae, clase Alphaproteobacteria ($4.33 \pm 1,83$ %) (Figura 3.4, Abundancia total apéndice 2, Figura 2.1).

En ambas aproximaciones, además de ser el género más abundante, el género *Rhizobium* representó el 20 % del total de los taxones identificados (Secuenciación del amplicón del rRNA 16S 22.5% vs Metatranscriptoma 20.65%) (Tabla 3.4).

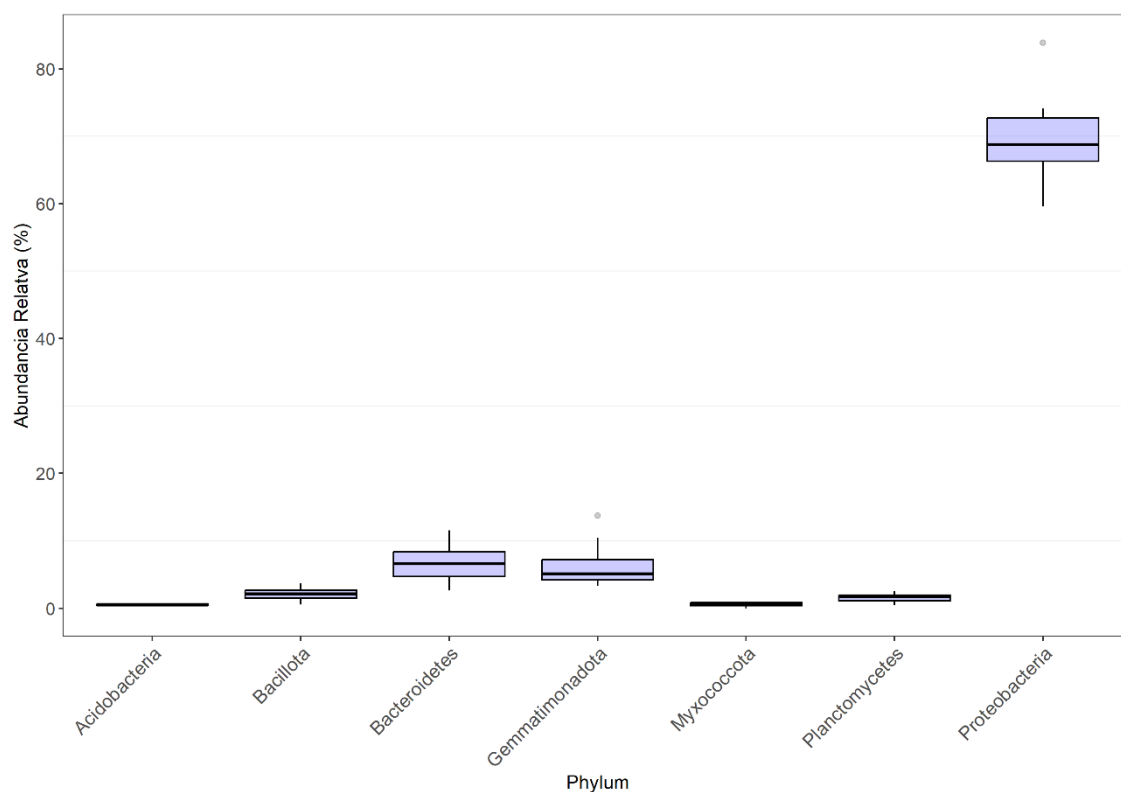


Figura 3.3 Abundancia relativa de diferentes filos en el microbioma de *R. raciborskii* MVCC19 identificados a partir de la aproximación metatranscriptómica.

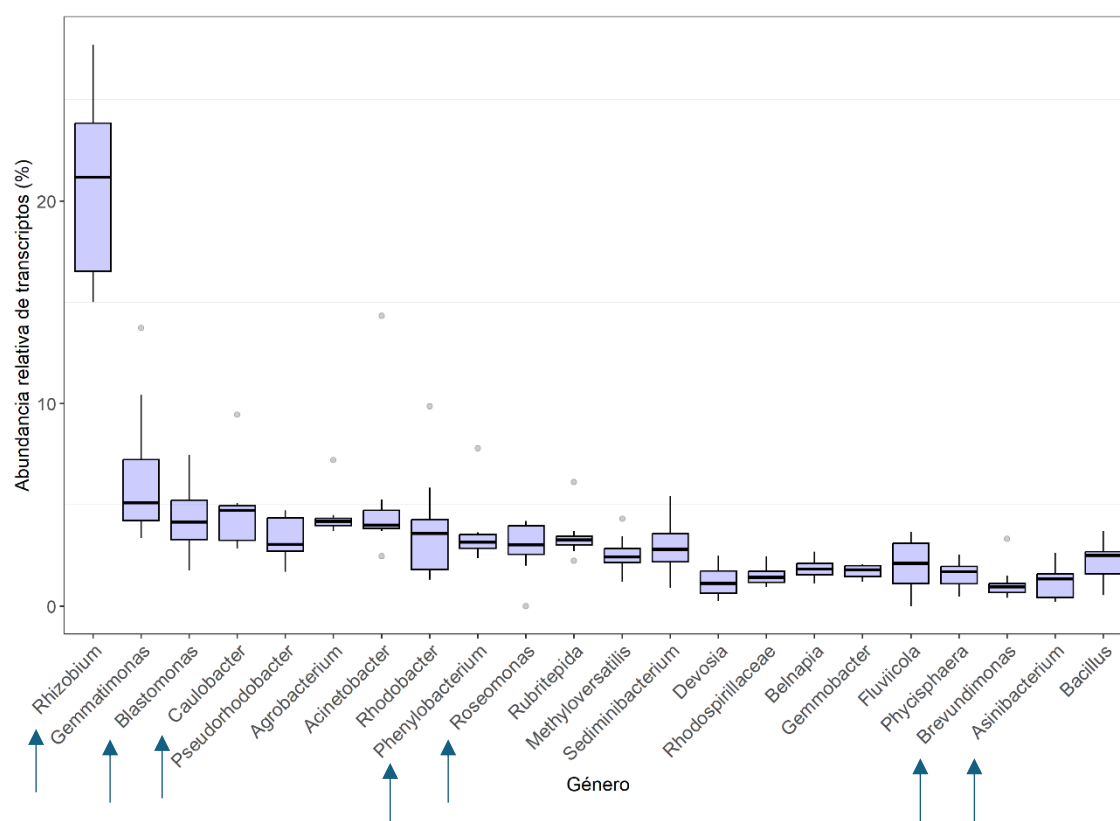


Figura 3.4 Abundancia de géneros bacterianos en el microbioma de MVCC19 de *R. raciborskii* a partir del metatranscriptoma. Las flechas indican los géneros que fueron encontrados con la secuenciación del amplicón del gen del ARN ribosomal 16S. Se muestran los primeros 22 géneros de los 147 encontrados (Abundancia total apéndice 2, Figura 2.1).

Tabla 3.4. Comparación del microbioma asociado a MVCC19 en relación con la abundancia relativa de transcritos y las ASV mayormente representados

Género	Metatranscriptoma % reads	16S % reads
<i>Rhizobium</i>	20,63	22,51
<i>Gemmatimonas</i>	6,52	0,25
<i>Blastomonas</i>	4,33	9,64
<i>Caulobacter</i>	4,74	1,82
<i>Phenyllobacterium</i>	3,65	5,68
<i>Roseomonas</i>	2,87	1,14
<i>Brevundimonas</i>	1,18	12,3
<i>Asinibacterium</i>	1,20	6,67
<i>Azospirillum</i>	0,71	2,86

3.5.3 Composición taxonómica en relación con otros ecotipos descritos en la literatura

Con el objetivo de investigar el microbioma de otras cepas de *R. raciborskii* se hizo una búsqueda bibliográfica en la base de datos *Sequence Read Archive* (SRA). Los *raw reads* del estudio del transcriptoma de *R. raciborskii* FACHB 1096 (cepa de origen Chino no productora de PSP, Shi et al., 2022) fueron sometidos al mismo *pipeline* (Westreich et al., 2018) utilizado para *R. raciborskii* MVCC19. A partir de dicho análisis se encontró una riqueza de 170 géneros (índice de Shannon de 3.4). El filo más representado fue Proteobacteria y entre estos, la clase Alphaproteobacteria. La bacteria más abundante encontrada en FACHB 1096 fue *Rhodobacter sp*, con una abundancia relativa de 21.63% seguido de *Pseudorhodobacter* y *Gemmobacter* con una abundancia relativa de 15.5 y 10.6% respectivamente. En cuarto lugar, aparece el género *Rhizobium* con un 4.10% (orden *Hypomicrobiales*, familia Rhizobiaceae).

4.3 Análisis funcional del microbioma de MVCC19

Las funciones metabólicas (nivel de subsistema 2) compartidas entre *R. raciborskii* y su microbiota se asignaron principalmente al metabolismo de los carbohidratos (fijación de carbono, ciclo de Calvin); biosíntesis de aminoácidos, nucleótidos y ácidos grasos; y biosíntesis de cofactores y vitaminas.

Dentro de las funciones metabólicas presentes en *R. raciborskii* se encontró que la mayor proporción de transcritos están relacionados con la fotosíntesis, cofactores, vitaminas, grupos prostéticos, pigmentos y metabolismo del carbono (Figura 4.5). Las funciones metabólicas asociadas a la fotosíntesis son las mayoritarias y representan el 42.3% ($\pm 5.45\%$) del total de los transcritos (Figura 4.5). En ella se incluyen las vías metabólicas del fotosistema I y fotosistema II, ficobilisoma y proteínas captadoras de luz. En segundo y tercer lugar se encontraron las funciones metabólicas asociadas a cofactores, vitaminas, grupos prostéticos pigmentos ($12.4 \pm 4.5\%$) y el metabolismo de carbohidratos ($11.8 \pm 2.01\%$). Si bien *R. raciborskii* fue cultivada en ausencia de nitrógeno y se detectó presencia de heterocisto (Figura 4.1) (célula especializada en la fijación de nitrógeno) el porcentaje de transcritos relacionados al metabolismo del nitrógeno (fijación de nitrógeno) fue del 1.68 % ($\pm 0.91\%$) En menor proporción, se encontraron transcritos relacionados con transportadores tipo ABC (bicarbonato, aminoácidos, hierro, nickel, nitrate, azufre) y biosíntesis de peptidoglicano. No se encontró degradación y síntesis de vitamina B12 en *R. raciborskii*.

Por otro lado, las funciones metabólicas asociadas al microbioma se asignaron principalmente al metabolismo de carbohidratos, luego a cofactores, vitaminas, grupos

prostéticos, pigmentos y en tercer lugar al metabolismo del nitrógeno (Figura 4.5). Las funciones metabólicas asociadas al metabolismo de carbohidratos son las mayoritarias y representan el 23% ($\pm 3,02\%$) del total de los transcritos. En ella se incluyen transcritos asociados a la degradación y transporte del carbono. En segundo y tercer lugar se encontraron las funciones metabólicas asociadas a cofactores, vitaminas, grupos prostéticos pigmentos ($19,9 \pm 5,03\%$) y metabolismo del nitrógeno ($16,36 \pm 2,03\%$).

Dentro del microbioma, las vías metabólicas asociadas a la función de los carbohidratos tienen que ver con la degradación del carbono orgánico y su transporte. Las vías metabólicas asociadas al metabolismo de los carbohidratos se muestran en la figura 4.6 donde se destaca la vía Entner-Doudoroff encargada de la degradación de moléculas de glucosa a piruvato (módulo M00008 de KEGG), (Kanehisa and Goto, 2000).

Dentro de la función metabólica nitrógeno (subsistema 2), las vías metabólicas (subsistema 3) mayormente representadas se muestran en la figura 3.7. El porcentaje de transcritos asociados a la fijación de nitrógeno son mayoritarios en el microbioma ($76,34 \pm 6,70 \%$). Dentro del microbioma, en el género mayoritario (*Rhizobium*) mostró el porcentaje de abundancia relativa de transcritos mayormente asociado con el nitrógeno y proteínas de transporte (Figura 3.8). En el segundo género más activo (*Gemmatimonas*) se destacan transcritos asociados a transportadores, fotosíntesis y metabolismo de los carbohidratos. En el caso de las *Blastomonas*, género que también fue detectado por 16S, mostró un alto porcentaje de transcritos relacionados con proteínas de transporte, metabolismo del carbono (degradación) y fotosíntesis. Si bien el género *Rhizobium* es el que tiene mayor cantidad de transcritos asociados al metabolismo del nitrógeno, el resto de los géneros presentes en el microbioma y encontrados en ambas aproximaciones (16S y metatranscriptoma) están involucrados en el ciclo del nitrógeno (*Blastomonas*, *Gemmatimonas*, *Caulobacter*, *Phenylobacterium*, *Brevundimonas*, *Roseomonas*) (Figura 3.8).

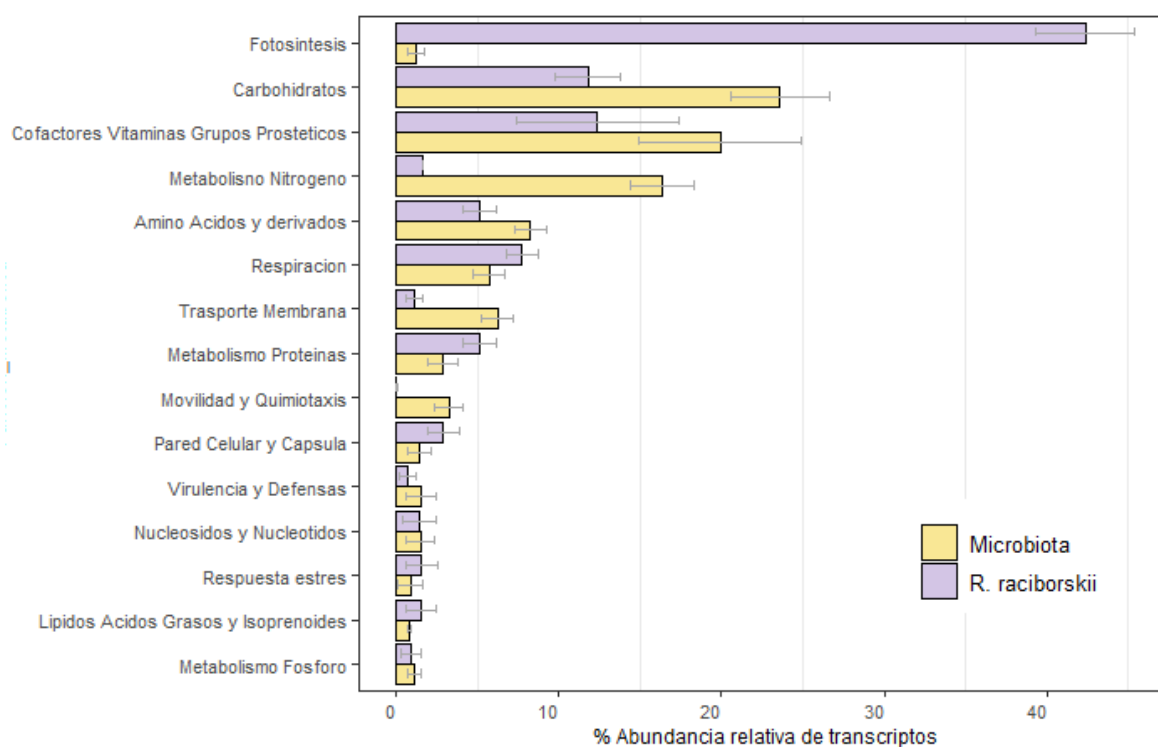


Figura 3.5. Abundancia relativa de transcritos de *R. raciborskii* MVCC19 y su microbioma asociada. Se representan las funciones metabólicas por agrupación jerárquica de anotaciones funcionales (SEED, Overbeek et al., 2014) cuya abundancia relativa de *reads* fue mayor al 1 % en uno de los dos grupos en estudio, microbiota o cianobacteria.

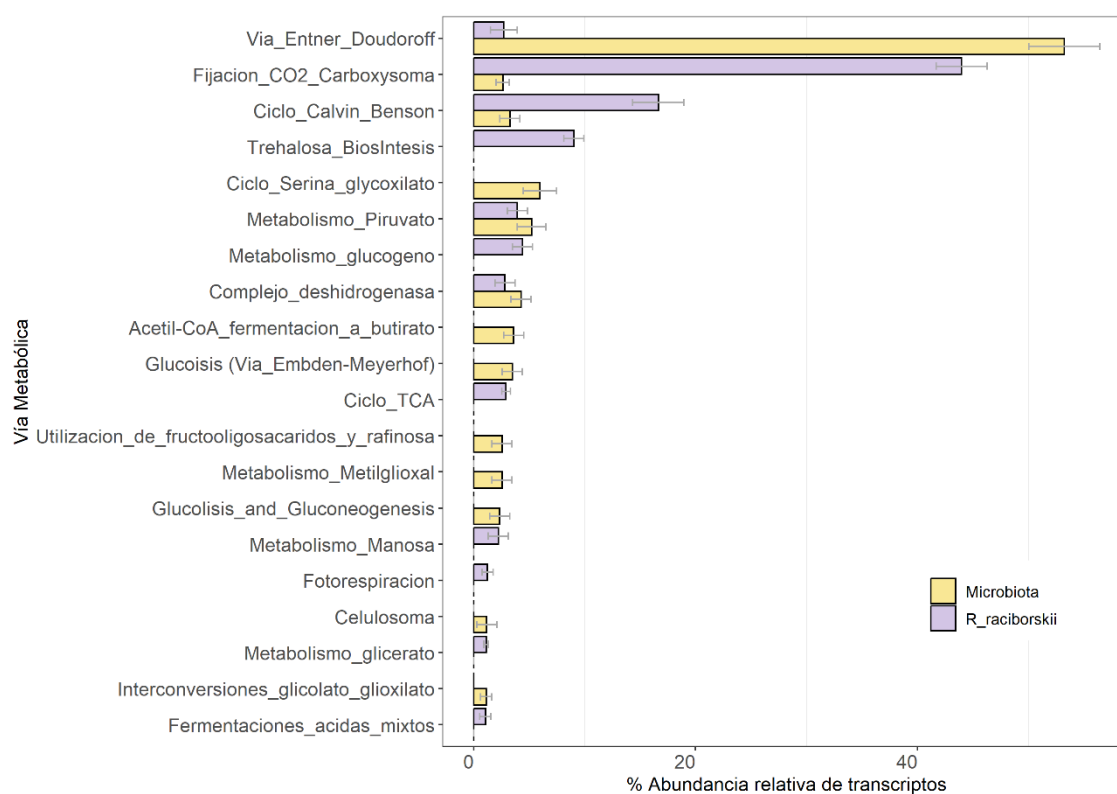


Figura 3.6. Abundancia relativa de transcritos asociados a vías metabólicas del metabolismo de los carbohidratos por anotación jerárquica funcionales (SEED, Overbeek et al., 2014) entre *R. raciborskii* MVCC19 y su Microbiota.

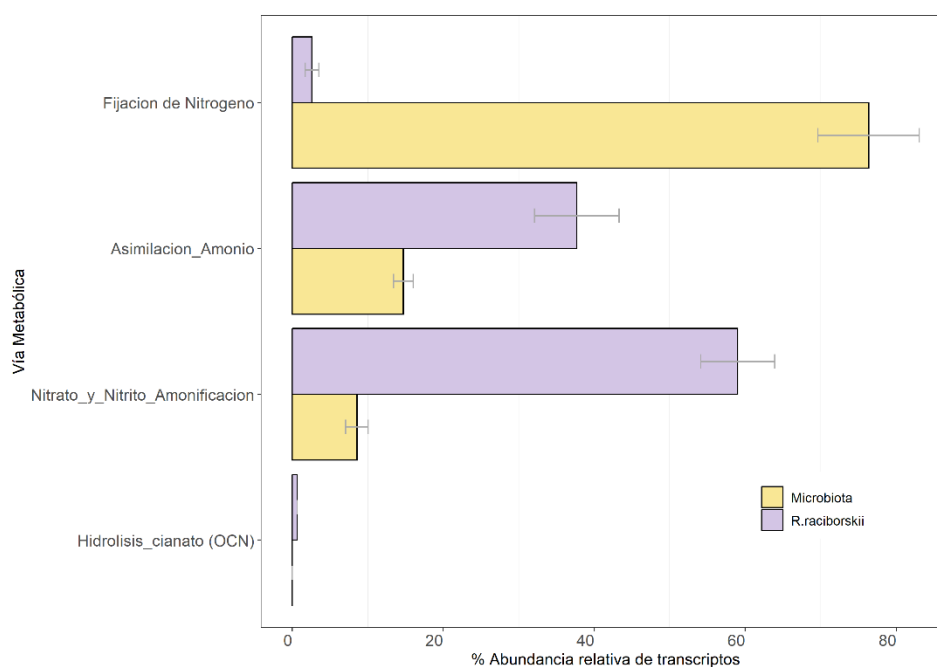


Figura 3.7. Abundancia relativa de transcritos de las vías metabólicas asociados al metabolismo de nitrógeno por anotación jerárquica funcionales (SEED, Overbeek et al., 2014) para *R. raciborskii* MVCC19 y para su microbiota asociada.

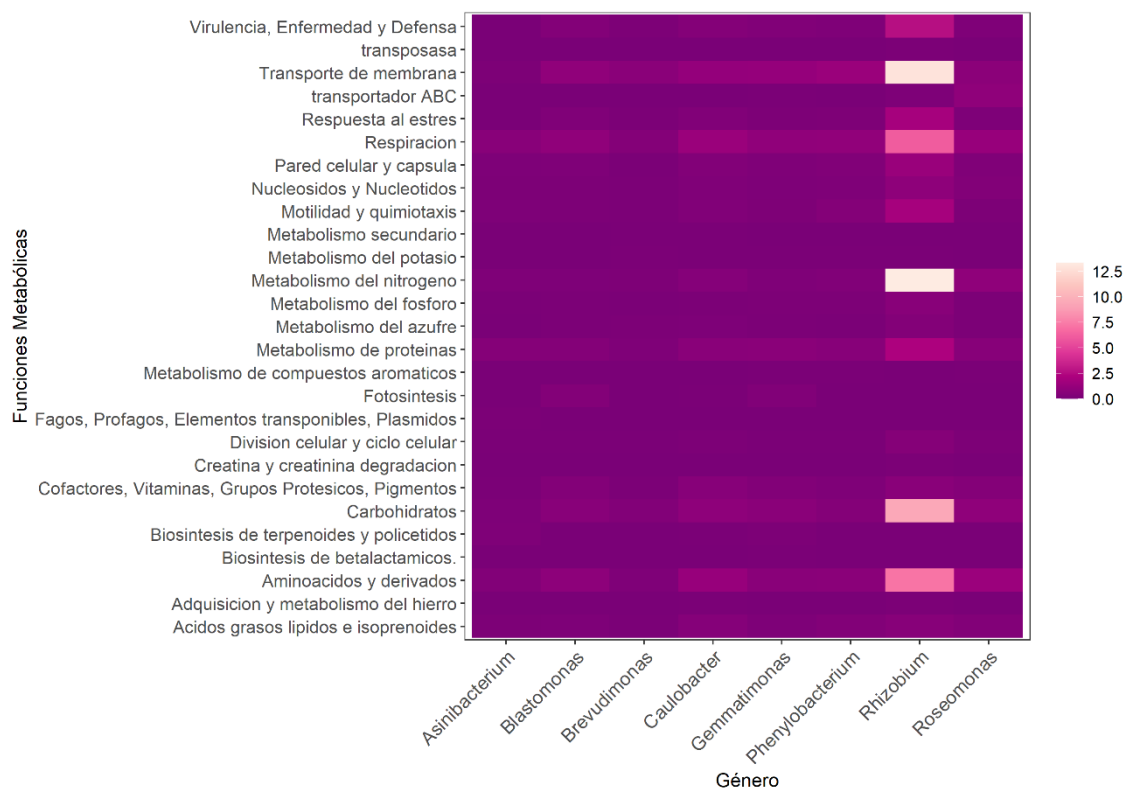


Figura 3.8. Heatmap con las funciones metabólicas por agrupación jerárquica de anotaciones funcionales (SEED, Overbeek et al., 2014) del microbioma presente en *R. raciborskii*. Se muestran sólo los géneros presentes en el microbioma que fueron encontrados por 16S y por metatranscriptómica. Se destaca en el género *Rhizobium* un porcentaje mayor de *reads* asociados al metabolismo del nitrógeno.

3.6- Discusión

3.6.1 - Composición taxonómica y funcional del microbioma de *R. raciborskii*

La composición de la comunidad bacteriana que habita el EPS de las dos cepas de *R. raciborskii* encontrada a través de la secuenciación del 16S es diferente, principalmente a nivel de dominancia de géneros.

Para el caso de la cepa no productora de PSP, LB2897, las secuencias de ARNr 16S de los taxones más abundantes tienen alta identidad con las bacterias involucradas en tratamientos de aguas residuales y sedimentos (Tabla 4.1). Dichas bacterias se caracterizan por ser muy eficientes en la eliminación de nutrientes (Villaverde, 2004) como es el caso del género *SM1A02*. Este género es el dominante en el microbioma de LB2897 y también está presente en la ficosfera de MVCC19. El género *SM1A02* ha sido propuesto como bacterias oxidantes anaerobias del amoníaco (anammox) (Tian et al., 2017) se encuentran en lodos activados con alto rendimiento nitrificante (G. Chen et al., 2019) *SM1A02* está presente en la ficosfera de las microalgas marinas como las *Gambierdiscus* que están en diversos lugares (Océano Pacífico, Océano Atlántico, Mar Caribe) pudiendo además estar asociadas a los dinoflagelados marinos (Rambo et al., 2020). La oxidación anaeróbica del amonio a nitrógeno gaseoso parece ser una vía metabólica presente en prácticamente cualquier ambiente anóxico donde se encuentra el nitrógeno fijado (amonio, nitrato, nitrito). Por lo tanto, para poder habitar en el mucílago de *R. raciborskii*, la bacteria anammox *SM1A02* debería estar en los nichos anaeróbicos generados por degradación del propio mucílago.

Hasta el momento existe un solo estudio que involucra el transcriptoma de una *R. raciborskii* (Shi et al., 2022) donde se analiza una cepa no productora, FACHB 1096, aislada en China y cultivada en un medio con nitrógeno (Shi et al., 2022). Los *raw reads* de dicho estudio fueron sometidos al mismo *pipeline* (Westreich et al., 2018) utilizado para el análisis de *R. raciborskii* MVCC19. En este caso, los resultados mostraron una riqueza de 170 géneros (índice de Shannon de 3.4). El análisis taxonómico de FACHAB_1096 no productora de STX mostró alta abundancia relativa de transcritos asociados a bacterias del género *Rhodobacter*. Este género si bien han sido aislado principalmente de hábitats de agua dulce (Ramana et al., 2008) está también fuertemente involucrada en tratamientos de aguas residuales y sedimentos (Li et al., 2016; Suresh et al., 2019 (Chen et al., 2020). Las bacterias del género *Rhodobacter* realizan fotosíntesis anoxigénica y también son fijadores de nitrógeno (Lisa Demtröder, 2019; Suresh et al., 2019).

En cuanto al microbioma de MVCC19, las bacterias pertenecientes al género *Neorhizobium* (que está ausente en LB2897), fueron las más abundantes (Tabla 4.2). La evaluación taxonómica a partir del análisis metatranscriptómico también muestra al género *Rhizobium* como la bacteria con mayor porcentaje de abundancia relativa de transcritos en este ecotipo. Las bacterias de la familia *Rhizobiaceae* son conocidas como organismos simbióticos fijadores de nitrógeno que viven en estrecha asociación con las plantas. Al detectar la presencia del heterocisto en *R. raciborskii*, se esperaría encontrar también transcritos asociados a la fijación de nitrógeno que indique que esta función es compartida o complementaria entre ambos (cianobacteria y microbiota). Sin embargo, el porcentaje de abundancia relativa de transcritos asociados al metabolismo del nitrógeno en *R. raciborskii* corresponden mayoritariamente al transporte y asimilación (amonificación) del nitrógeno y en menor medida fijación (figura 3.7), indicando que este proceso podría ser llevado a cabo mayoritariamente por el microbioma. Esta fijación de nitrógeno aparentemente redundante encontrada en la cepa productora de PSP podría estar relacionada con el hecho de que la molécula de saxitoxina es rica en átomos de nitrógeno. Es posible que para la síntesis de STX (producida en el medio BG11 privado de nitrógeno) probablemente sea un requerimiento tener una alta concentración de este nutriente. El género *Rhizobium* ya ha sido detectado en cepas de dinoflagelados marinos *Alexandrium tamarense* también productores de STX (Wiese, 2012) donde ya ha sido propuesto que algunos de estas asociaciones bacterianas jueguen un papel crucial para la aptitud de las cepas de *Alexandrium* como ser *Hoefla alexandrii*, un rizobio aislado de *Alexandrium minutum* (Palacios et al., 2006). Se observó además que el resto de los géneros más abundantes presentes en la microbiota de *R. raciborskii* (*Blastomonas*, *Gemmatimonas*, *Caulobacter*, *Phenylobacterium*, *Brevundimonas*, *Roseomonas*) también están vinculados con el metabolismo del nitrógeno (Hu et al., 2021; Rilling et al., 2018; Thamizhseran and Shendye, 2022; Yang et al., 2017; Zilius et al., 2020) sugiriendo que *R. raciborskii* recluta bacterias con estas características.

Debido a la alta sensibilidad de la nitrogenasa al oxígeno, la presión parcial de oxígeno ambiental regula la fijación de nitrógeno. Por tanto, es un proceso que requiere condiciones anaeróbicas o microaeróbicas. En el caso de los rizobios, la estrategia más común es la simbiosis finamente ajustada con una planta la cual genera un nódulo radicular que evita las altas concentraciones de oxígeno generadas durante la fotosíntesis (Ledermann et al., 2021). Por lo tanto, es posible que los rizobios se encuentren en una zona de difícil acceso del oxígeno dentro del mucílago. Sin embargo, al ser éste el primer trabajo donde se describe la importancia de este género en el

microbioma de *R. raciborskii*, no está claro aún dónde se localizan los rizobios (dentro de las células, en el heterocisto o unido a la superficie alrededor de las células). Tampoco está claro cuál es la naturaleza de estas asociaciones. Como se describió en el capítulo 1, los *clusters* involucrados en la síntesis de PSP fueron adquiridos por *R. raciborskii* a través de la transferencia horizontal y se ha podido trazar el origen de cada gen a su ancestro bacteriano original (Moustafa et al., 2014). En este contexto y teniendo en cuenta la información obtenida en esta tesis, es posible que dichos genes hayan sido incorporados al genoma de *R. raciborskii* a partir de bacterias que forman parte de su microbioma siendo el microbioma un actor relevante en el posible origen de los genes implicados en procesos importantes como la síntesis de saxitoxina (Stüken et al 2011).

Por otro lado, otros grupos bacterianos abundantes asociados a MVCC19 se han encontrado en ambientes contaminados con hidrocarburos aromáticos policíclicos (Yang et al., 2018). La presencia de bacterias muy abundantes (del 5 al 9%) con la capacidad de metabolizar compuestos complejos podría estar asociado con el uso de la STX y análogos como fuente de carbono y nutrientes. Además, entre los organismos relacionados con el ciclo del nitrógeno, también encontramos taxones que se encuentran comúnmente en el agua o en los sedimentos, floraciones de cianobacterias y asociadas a microorganismos eucariotas, estos últimos con un estilo de vida simbiótico (Tabla 4.2).

Por su parte, mediante la aproximación metatranscriptómica se detectó el género *Gemmatimonas* (que no fue detectado con el análisis de 16S) que también está asociada a ambientes acuáticos, como aguas dulces, plantas de tratamiento de aguas residuales, biofilms y sedimentos (Mujakíć et al., 2022). Este género que fue el segundo más abundante detectado en el metatranscriptoma, también ha sido asociado con la cianobacteria *Microcystis* sp. (Shia et al., 2010) y se ha propuesto que miembros del phylum Gemmatimonadota podrían beneficiarse de tal co-ocurrencia al obtener carbono orgánico y a cambio proporcionar nutrientes inorgánicos (Mujakíć et al., 2022). *Pseudorhodobacter* (bacteria anaerobia facultativa) también asociada a ambientes acuáticos y formación de biofilms en reactores, también fue detectada a través de los análisis metatranscriptómicos y se sabe que participa en procesos de eliminación de nitrógeno y fósforo (Papale et al., 2022).

3.6.2 Metabolismo del carbono entre *R. raciborskii* MVCC19 y su microbiota

La degradación del carbono es la fuente de energía para el metabolismo energético y procesos biosintéticos para la mayoría de los organismos (Chen et al., 2016). *R. raciborskii* obtiene su carbono a partir de la fijación del dióxido de carbono y de

compuestos orgánicos. A través del análisis del metatranscriptoma se identificaron genes para rutas metabólicas centrales como son el ciclo de Calvin Benson (CB), el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP o glucólisis) y la vía de las pentosas fosfato (PP). Estas vías metabólicas juegan un papel esencial en la generación de ATP, NAD(P)H y precursores de aminoácidos, nucleótidos y ácidos grasos biosintéticos (Chen et al., 2016).

El análisis metatranscripcional mostró que en *R. raciborskii* están la mayoría de los genes necesarios para la fijación y el transporte del carbono. Las cianobacterias utilizan un mecanismo de concentración de CO₂ (Burnap et al., 2015) donde la mayor parte del carbono inorgánico absorbido por las células se convierte primero en bicarbonato y luego se transporta a compartimentos celulares llamados carboxisomas. Allí el bicarbonato se convierte nuevamente en CO₂ y la enzima RuBisCO lo fija en carbono orgánico (Ji et al., 2020). En el microbioma las bacterias podrían potencialmente estar contribuyendo al reciclaje del carbono ya que muchas de las vías encontradas en las bacterias están relacionadas con la descomposición de los carbohidratos. La materia orgánica puede ser liberada por lisis de células cianobacterianas, por ejemplo, debido al ataque viral por cianófagos (Puxty et al., 2018). Por ejemplo, algunos Bacteroidetes han demostrado que se alimentan de restos de células cianobacterianas muertas (Ben Hania et al., 2017) y aunque el phylum mayoritario fueron las Proteobacterias, no se descarta que pueda estar ocurriendo lo mismo. En el microbioma además está presente la familia de enzimas *glycoside hydrolase*. Estas enzimas se expresan altamente en respuesta a la disponibilidad de polisacáridos, sugiriendo que las bacterias podrían tener la capacidad de utilizar glicopolímeros de la pared celular de las cianobacterias como fuente de carbono (De Philippis et al., 1998; Spring et al., 2016; Wegner et al., 2013). A cambio, las heterótrofas pueden beneficiar a la cianobacteria remineralizando la materia orgánica disuelta que muchas veces está en forma de biopolímeros. Las bacterias heterótrofas remineralizan los biopolímeros con enzimas extracelulares, reciclando elementos esenciales contenidos en estas moléculas para ser utilizados. Por ejemplo, las bacterias asociadas con el fitoplancton utilizan como fuente de carbono el glicolato de fitoplancton (Paver and Kent, 2010). Una de las enzimas relacionada con este proceso es la glicolato deshidrogenasa la cual fue detectada en el microbioma. Esta familia de enzimas libera monosacáridos claves para el crecimiento microbiano. Sin embargo, no todos los microorganismos están directamente involucrados en la degradación de los polisacáridos.

Por otro lado, en el microbioma también se identificaron las proteínas implicadas en la vía de Entner-Doudoroff. La vía de Entner-Doudoroff sirve como vía metabólica

alternativa a la vía EMP para la degradación de moléculas de glucosa a piruvato. Estudios recientes también han demostrado una distribución más amplia de la vía Entner-Doudoroff, con evidencia genómica que respalda la presencia de estas vías también en cianobacterias (Chen et al 2016). Esto es congruente con lo encontrado en esta tesis ya que se detectó la presencia de esta vía en *R. raciborskii*.

Según nuestros análisis, *R. raciborskii* y su microbioma pueden utilizar fuentes de carbono de varias vías metabólicas como EMP, PP, y vías de Entner-Doudoroff. En ese sentido, algunos estudios han demostrado que la activación de las diferentes vías metabólicas puede producir diferencias a niveles fenotípicos, como la activación de factores de virulencia en algunas bacterias (Jyoti et al., 2020; Paver and Kent, 2010). Dado que la biosíntesis de saxitoxina en *R. raciborskii* también depende de precursores como la arginina y el acetil-CoA del metabolismo del carbono, podría haber también una asociación entre las vías metabólicas del carbono y la biosíntesis de saxitoxinas.

3.6.3. Metabolismo del nitrógeno entre *R. raciborskii* MVCC19 y su microbioma

En relación con el metabolismo del nitrógeno cuatro tipos homólogos de proteínas transportadoras de nitrógeno (nitrato, nitrito, amoníaco y urea) se identificaron tanto en el microbioma como en *R. raciborskii*. En *R. raciborskii*, las funciones relacionadas con la asimilación de amoníaco fueron mayoritarias, lo que indicaría una alta adquisición de amoníaco. Por otro lado, los transcritos relacionados a la fijación de nitrógeno y la mayoría de los genes *Nif* relacionados a la fijación, fueron detectados mayoritariamente en el género *Rhizobium* (Figura 4.7). Teniendo en cuenta que *R. raciborskii* es un diazotrofo que se encontraba en privación de nitrógeno, es posible que el nitrógeno fijado por la cianobacteria no sea suficiente y que necesite de otras bacterias para cumplir sus requerimientos. Las vías metabólicas anaeróbicas involucradas en la fijación del nitrógeno, se detectaron también en el microbioma asociado a la cianobacteria no fijadora de nitrógeno *M. aeruginosa* (Cook et al., 2020). Se ha observado que la fijación ocurre en condiciones aeróbicas cuando las rizobacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre forman biofilms (Wang et al., 2017), es decir cuando forman parte del mucílago que las recubre. En relación con esto, experimentos con cultivos también han demostrado que la fijación se ve favorecida cuando *M. aeruginosa* se encuentra en forma colonial (L. Shi et al., 2022)

El microbioma que habita la ficosfera de *R. raciborskii* cultivada bajo condiciones libres de nitrógeno, mostró una combinación de grupos funcionales involucrados en ciclo del nitrógeno, degradación de compuestos orgánicos complejos y presencia de organismos simbióticos. Este acoplamiento funcional que tiene lugar en la ficosfera de

R. raciborskii podría estar relacionado con el reducido tamaño del genoma (Stucken et al. 2010). Esta reducción del genoma genera una disminución de los costos energéticos relacionados con la replicación y puede beneficiarse con productos metabólicos de la comunidad (Cook et al. 2020). De esta manera, cambios en el microbioma puede ayudar a las bacterias a amoldarse a las condiciones ambientales cambiantes de forma más rápida que a través de cambios a nivel del genoma por mutación y selección, bajo este escenario toda la comunidad representaría una unidad de selección natural (Rosenberg et al. 2007).

Además, algunos de los taxones, que explican la mayor riqueza bacteriana observada en el microbioma de la cepa no productora de PSP, mostró abundancias relativas que van desde 0,1 a 12,4% y están asociadas a bacterias descritas como simbioses de organismos eucariotas (plantas acuáticas y musgos, ciliados, anfípodos) (Tabla 4.2). La ausencia de estas bacterias en el microbioma en la cepa productora de STX probablemente refleja no solo las diferencias en la producción de toxinas, sino también las diferentes características ambientales de los lagos de los que fueron aislados (Tabla 3.1) y sugiere un acoplamiento más estrecho entre la cianobacteria no productora y sus socios heterótrofos. Dado que los ecotipos bacterianos se caracterizan por tener diferentes nichos específicos y respuestas al medio ambiente (Cohan, 2019), nuestros resultados sugieren que los mecanismos involucrados en el ensamblaje de la comunidad de microbiomas son cepa- dependiente (ecotipo-dependientes). Esto implica que, para comprender y predecir la aparición y el predominio de bacterias en diferentes condiciones ambientales, sería necesario estudiarlas como una comunidad de organismos. La visión actual de la evolución de los organismos está incorporando cada vez más el concepto de holobionte que reconoce justamente la aparición generalizada de microbiomas asociados al hospedero y hace énfasis en la naturaleza multiespecífica del ensamblaje hospedero-microbioma (Bordenstein and Theis, 2015). Asimismo, si pensamos en la ecología y la evolución microbioma-hospedero en términos del hologenoma (concepto que sostiene que la fisiología de cualquier organismo deriva de las actividades integradas de su propio genoma y de todos los genomas de su microbioma) es posible inferir que el microbioma es parcialmente heredable, y que la evolución puede operar tanto en el huésped o en su microbioma (o en ambos) porque los cambios en cualquiera de ellos (o en ambos) podrán afectar la función del holobionte (Bordenstein and Theis, 2015; Rosenberg and Zilber-Rosenberg, 2018, 2013; Theis et al., 2016). Debido a que los holobiontes están compuestos de muchos organismos y sus respectivos genomas, el concepto de hologenoma plantea que todos los componentes del holobionte (el hospedero individual, el microbioma y la multitud de genes presentes

en el hologenoma) son potenciales objetivos sobre el cual opera la selección natural (Bordenstein and Theis, 2015; Theis et al., 2016).

Al momento existen muy pocos estudios en cianobacterias que evalúen de forma global la respuesta transcripcional. Recientemente se ha publicado para *R. raciborskii* un estudio que analiza su respuesta transcripcional global frente a cambios en la disponibilidad del fósforo (Shi et al., 2022), sin embargo, en dicho análisis no se tiene en cuenta la posible respuesta generada en el microbioma asociada. Los resultados obtenidos a partir de la secuenciación de amplicones del gen ARNr 16S mostraron la importancia de considerar la contraparte heterótrofa en el estudio de las cianobacterias. En ese sentido, como ya se mencionó, los ecotipos bacterianos se caracterizan por tener diferentes nichos específicos con diferentes respuestas al ambiente (Cohan 2019) y por lo tanto es posible que para estudiarlas sea necesario considerar a la comunidad cianobacteria microbiota como un organismo multicelular. La utilización de una aproximación metatranscriptómica en el estudio de estos organismos permite considerar ambas partes y determinar cuáles procesos metabólicos son llevados a cabo por cada integrante del holobionte, así como también la correlación entre las funciones metabólicas encontradas y las especies identificadas. De esta forma se pudo determinar que el género más abundante también es el género más activo.

3.7 Conclusiones

En este capítulo se encontró que el género bacteriano dominante tanto en los microbiomas productores como en los no productores de STX corresponden a bacteria involucradas en el metabolismo del nitrógeno. El género SM1A02 fue el más abundante en el ecotipo no productor de STX pero también mostró una alta abundancia relativa en el ecotipo productor de STX. Este género se ha descrito con capacidad de oxidar el amonio de manera anaeróbica (anammox), convirtiendo el amonio y el nitrito en nitrógeno gaseoso. Por otro lado, las bacterias más abundantes en el ecotipo productor de STX fueron rizobios (fijadores de nitrógeno), siendo *Neorhizobium* el género que fue identificado a través de las bases de datos de ARNr 16S. Los análisis de metatranscriptómica mostraron que las principales funciones llevadas a cabo por la cianobacteria en el holobionte son la fotosíntesis y la fijación del carbono, mientras que el microbioma dominado por rizobios tiene una fuerte inversión en la fijación de nitrógeno. Teniendo en cuenta que *R. raciborskii* también es capaz de fijar nitrógeno, una hipótesis posible para explicar la dominancia de una bacteria capaz de fijar nitrógeno en su microbioma sería la alta demanda de este elemento para sintetizar

saxitoxina y análogos, ya que son moléculas ricas en Nitrógeno (7 átomos por molécula). En este contexto, los ecotipos tóxicos necesitarían un suministro extra de nitrógeno para mantener su *fitness*, lo que sugiere que el holobionte cianobacteria-microbiota funciona como un organismo multicelular con división de tareas entre sus componentes.

4. Consideraciones finales

Actualmente la mayoría de los estudios se han centrado en comprender las condiciones fisicoquímicas bajo las cuales se desencadena la producción de PSP en *R. raciborskii*. Sin embargo, se necesita un enfoque integral y holístico para comenzar a comprender cómo la compleja combinación de condiciones ambientales, la utilización de recursos, fisiología celular y el microbioma asociado interactúan entre sí para fomentar la toxicidad y estimular la producción de toxinas. A pesar de que los mecanismos por los cuales las bacterias son capaces de transformar o interactuar con las PSP se desconocen, es posible que puedan influir en la disponibilidad de nutrientes (por ej. el nitrógeno) afectando el metabolismo de la cianobacteria y su producción de toxinas ricas en este elemento. Las interacciones entre la cianobacteria y su microbiota son una fuente de evolución a través de procesos como la transferencia horizontal de genes (Cavanaugh, 1994; Margulis, 1991; Sapp, 1994). Este proceso puede ser un posible origen para los genes pertenecientes al *cluster sxt* (Moustafa et al 2009, Stüken et al 2011) adquirido una vez colonizado el continente americano. El microbioma asociado le pudo haber otorgado a *R. raciborskii* la capacidad de producir STX para luego utilizarla como un mecanismo de comunicación con la propia cianobacteria y así mantenerse en su mucílago. Entonces, la cianobacteria a través de la expresión de distintas PSP puede reclutar a el microbioma y mantenerla en la ficosfera donde permanecen los géneros principalmente fijadores de nitrógeno como el género *Rhizobium*. Por otro lado, la cianobacteria le otorga todo el carbono fijado por ella misma. De esta forma cianobacteria y microbioma funciona como un organismo multicelular donde ambos se benefician de esta asociación (Figura 4.1).

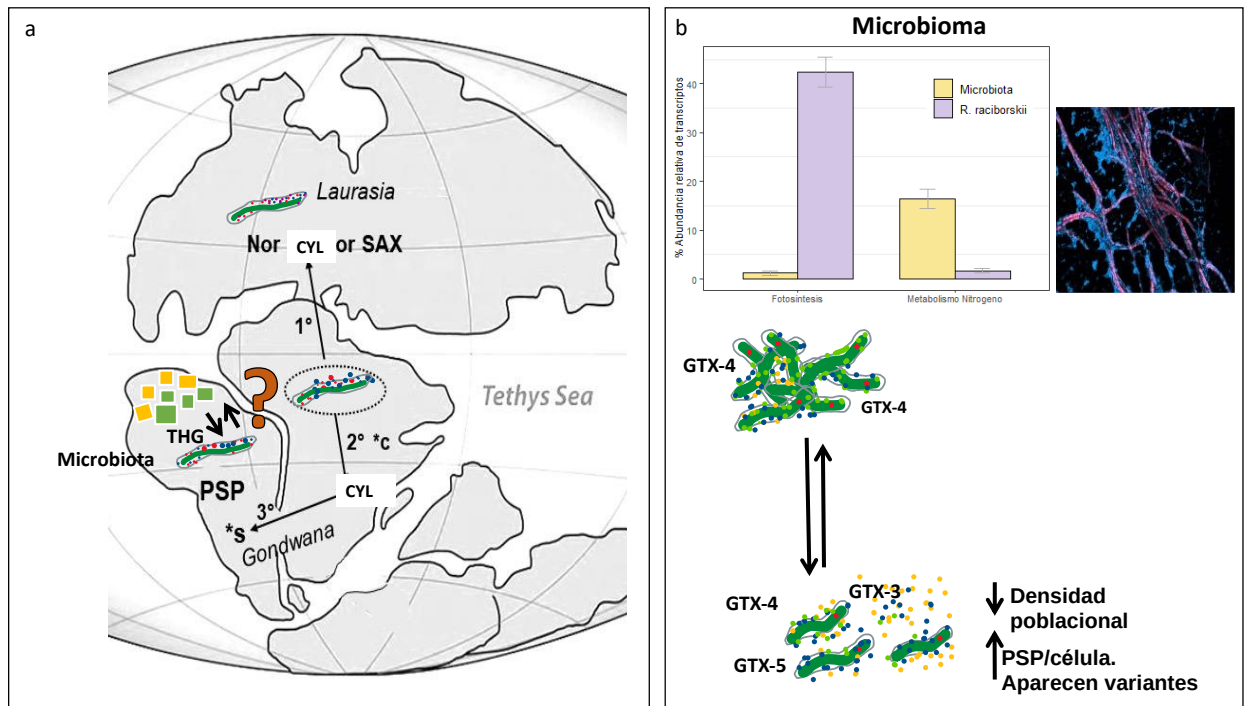


Figura 4.1. Diagrama final que resume la tesis.

5. Perspectivas

Este trabajo genera nuevas preguntas enfocadas al estudio del holobionte cianobacteria-microbiota. Una de las interrogantes que surge tiene que ver con explorar la naturaleza de la asociación entre *R. raciborskii* y el género *Rhizobium* fijador de nitrógeno. Para poder estudiar esta asociación sería interesante poder identificar y aislar el tipo de rizobios que habitan el mucilago, secuenciar su genoma y obtener una filogenia que nos permita identificar relaciones de parentesco. Además, sería conveniente diseñar una sonda para poder localizar el lugar del mucilago donde se encuentran los rizobios.



Data Paper

Metagenomic analysis of *Raphidiopsis raciborskii* microbiome: beyond the individual

Paula Vico[‡], Andrés Iriarte[§], Sylvia Bonilla[|], Claudia Piccini[‡]

[‡] Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay

[§] Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, UDELAR, Montevideo, Uruguay

[|] Sección Limnología, Facultad de Ciencias, UDELAR, Montevideo, Uruguay

Corresponding author: Claudia Piccini (cpiccini@iibce.edu.uy)

Academic editor: Chloe Robinson

Received: 02 Aug 2021 | Accepted: 05 Oct 2021 | Published: 21 Oct 2021

Citation: Vico P, Iriarte A, Bonilla S, Piccini C (2021) Metagenomic analysis of *Raphidiopsis raciborskii* microbiome: beyond the individual. Biodiversity Data Journal 9: e72514. <https://doi.org/10.3897/BDJ.9.e72514>

Abstract

Raphidiopsis raciborskii is a toxic, invasive bacteria with a defined biogeographic pattern attributed to the generation of ecotypes subjected to local environmental filters and to phenotypic plasticity. The interactions taking place between the cyanobacterium and the other bacteria inhabiting the external polysaccharide-rich matrix surrounding the cells, or phycosphere, may be ecotype-specific and would have different influence on the carbon and nutrient cycling in the ecosystem. Here, we describe the bacterial community or microbiome (assessed by 16S rRNA metagenomics) associated to two *R. raciborskii* strains that have been described as different ecotypes: the saxitoxin-producer MVCC19 and the non-toxic LB2897. Our results showed that both ecotypes share 50% of their microbiomes and differ in their dominant taxa. The taxon having the highest abundance in the microbiome of MVCC19 was *Neorhizobium* (22.5% relative abundance), while the dominant taxon in LB2897 was the Planctomycetes *SM1A02* (26.2% relative abundance). These groups exhibit different metabolic capabilities regarding nitrogen acquisition (symbiotic nitrogen-fixing in *Neorhizobium* vs. anammox in *SM1A02*), suggesting the existence of ecotype-specific microbiomes that play a relevant role in cyanobacterial niche-adaptation. In addition, as saxitoxin and analogues are nitrogen-rich (7 atoms per molecule), we hypothesise that saxitoxin-producing *R. raciborskii* benefits from external sources of nitrogen provided by the microbiome bacteria. Based on these findings, we

propose that the mechanisms involved in the assembly of the cyanobacterial microbiome community are ecotype-dependent.

Keywords

Raphidiopsis raciborskii, microbiome, 16S rRNA metagenomics, phycosphere

Introduction

Cyanobacteria have a polysaccharide-rich microzone outside the cell wall that surrounds the cells, filaments or colonies, which are colonised with heterotrophic bacteria. Despite the recognised role of heterotrophic bacteria in carbon and nutrient recycling of aquatic ecosystems, little is known about the composition and the interaction of these bacteria with the bacteria. In this microzone, called the phycosphere (Bell and Mitchel 1972), the metabolites are readily exchanged before their diffusion to the water and represent a central meeting place for bacteria and bacteria (Seymour et al. 2017). The interactions occurring between individual organisms within this phycosphere have an ecosystem-level effect on several processes, for example, carbon and nutrient cycling, toxin biosynthesis etc. The incorporation of bacteria into the phycosphere likely occurs through chemotaxis, random contacts and vertical transmission (Seymour et al. 2017).

The close association between bacteria and bacteria that occurs in the phycosphere may be a strategy to achieve a higher number of genes and functions to cope and thrive through a range of environmental conditions (Humbert et al. 2013). These interactions translate into a selective advantage for both partners, which widen the spectrum of “goods” that they can obtain. The concept of the “common good” proposes that natural selection would keep those functions available in the whole community (Morris et al. 2011). By sharing these metabolites that are extracellularly available, the ability to synthesise them by themselves would no longer be necessary (Pande and Kost 2017). Thus, the bacterial species that are able to co-evolve in synergy and interaction would constitute the microbiome of a community or the “interactome” (Cook et al. 2019). This has been addressed in the cyanobacterium *Microcystis* sp., where a metagenomics-based study of blooms from twelve lakes showed that their microbiomes share a large number of functional genes despite the fact that bacteria were taxonomically distinct at the 16S rRNA level (Jankowiak and Gobler 2020). As a consequence, changes at the taxonomic level would be functionally equivalent and guarantee the permanence of essential metabolic functions.

The synthesis of the external polysaccharide-rich (EPS) matrix that surrounds the cyanobacterial cells is thought to be a physiological response to fluctuations in environmental conditions, allowing bacteria to maintain their fitness and also the associated microbiota (Rossi and De Philippis 2015). The chemical characteristics of EPS and its abundance depend on the species and strain of bacteria and the culture or environmental conditions. Under oligotrophic conditions, EPS is the source of available

organic carbon for heterotrophs, while during blooms, the relative abundance of bacteria living in the EPS varies depending on the biomass of the bacteria and its EPS composition (Woodhouse et al. 2018). It is then possible that bacteria having different metabolic functions are selected and that structural and functional differences in the community are influenced by the available organic matter and nutrients in the EPS (Louati et al. 2015).

In some toxic bacteria, such as *Microcystis* spp., the bacteria present in the phycosphere were shown to differ markedly from free-living planktonic ones (Wu et al. 2019) and allow the bacteria the access to specific compounds, such as vitamins and some components of the outer membrane lipopolysaccharide, while providing bacteria with highly bioavailable carbon. For example, *Microcystis* spp. do not have the ability to fix nitrogen and appeared to benefit from the nitrogen released from the *Rhizobiales* present in their microbiome and to the enrichment of N₂-fixation genes (Jankowiak and Gobler 2020).

Raphidiopsis (*Cylindrospermopsis*) *raciborskii* (Order Nostocales) is a cyanobacterium that forms toxic blooms that has attracted worldwide interest due to its increasing expansion from warm latitudes to temperate zones. This species is capable of alternately producing saxitoxins (STX) or cylindrospermopsin (CYN) or being non-toxic. However, strains capable of synthesising both STX and CYN at the same time have not yet been described (Vico et al. 2020, Soares et al. 2012, Burford et al. 2018, Antunes et al. 2015, Neilan et al. 2002, Briand et al. 2004, Moreira et al. 2014, Wood et al. 2014, Dokulil 2015, Aguilera et al. 2019).

Although it is proposed that the success of this species in tolerating, colonising and adapting to different environmental conditions (temperature, light and nutrients) is due to a strategy combining phenotypic plasticity (Bonilla et al. 2016, Bonilla et al. 2012, Willis et al. 2018, Soares et al. 2012) and the existence of different ecotypes (Piccini et al. 2011), it is unknown how these environmental changes affect the structure of the microbiota. The increasing incidence of toxic blooms of saxitoxin-producing (SxP) *R. raciborskii* in South America raises concern, since this alkaloid has a very serious neurological effect in humans and animals. Therefore, knowing the composition of its microbiome is relevant, not only to understand its role in *R. raciborskii* growth and population dynamics, but also as a means of discovering bacterial taxa able to degrade saxitoxins to use as a water treatment strategy.

This is the first description of the heterotrophic bacterial community associated with *R. raciborskii* strains described as different ecotypes of the species (Vico et al. 2020, Piccini et al. 2011). We used 16S rRNA gene metagenomics to assess the bacterial microbiomes associated with the phycosphere of two *R. raciborskii* strains, one SxP isolated from South America (MVCC19) and one non-producer (NoP) (LB2897) isolated from North America. The dataset describes the amplicon sequence variants (ASVs) associated with each strain and their taxonomic affiliations.

Methods

Cyanobacterial strains, culturing conditions and samples

We analysed the microbiome of two strains of *R. raciborskii* from the Americas, one isolated from a lake located at the northernmost latitude where the species was detected and the other from a lake at the southernmost latitude where the species can be found. The LB2897 strain, originally isolated from Lemon Lake (USA, 39.2568, -86.3929) was obtained from the UTEX culture collection (see Yilmaz and Philips 2011 for further description) and the MVCC19 strain was isolated in 2007 from Javier Lake (Uruguay, -34.8640, -56.0409) (Vidal and Kruk 2008, Piccini et al. 2011) (Table 1).

Static cultures of both strains were grown in a nitrogen-free BG11 medium (Stanier et al. 1971) at 26°C and PAR light intensity of 80 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ with a 16:8 h light:dark photoperiod. Under these conditions, the morphology of the two strains was analysed and compared, measuring 30 cells and 50 filaments under the microscope (400 x and 1000 x magnifications). The biovolume was calculated following Hillebrand et al. 1999. The genome of both strains and their phylogenetic and ecological characteristics have been previously published (Vico et al. 2020). The MVCC19 and LB2897 whole-genome shotgun project has been deposited at DDBJ/ENA/GenBank under the accession VIRO00000000 and VOIM00000000, respectively (Vico et al. 2020). After 7 days of incubation in the above-mentioned conditions, 5 ml of each strain culture were sampled and subjected to DNA extraction.

Table 1.

Morphology, toxicity and biogeographic characteristics of *R. raciborskii* MVCC19 and *R. raciborskii* LB2897. K, conductivity. SD, standard deviation. STX, saxitoxin and analogues. CYN, cylindrospermopsin. Number of data is indicated within brackets. ^aBonilla et al. 2016, ^bClark and Jones 2006,2011,2013, ^cSoma et al., pers comm., ^dPiccini et al. 2011, ^eVico et al. 2020.

	MVCC19	LB2897
Lake where strain was isolated, coordinates	Lago Javier ^a (lat, lon). -34.8640, -56.0409	Lemon Lake ^b (lat, lon) 39.2568, -86.3929
Origin/water use^a	Eutrophic artificial lake/ recreation ^a	Artificial lake/recreation ^b
Climate	Subtropical ^a	Tempered ^b
Area (km²)	0.235 ^a	6677 ^b
Max depth (m)	10 ^a	6.1 ^b
K (mScm⁻¹) $\pm$ SD surface/bottom	0.48 $\pm$ 0.02 (6) / 0.55 $\pm$ 0.02 (6) ^c	0.154 $\pm$ 27.54 (18) / 0.156 $\pm$ 33.1 (18) ^b
pH $\pm$ SD	8.4 $\pm$ 0.08 (53) ^a	8.08 $\pm$ 1.01 (21) ^b
Temperature (°C) winter/summer	11/25.8 ^a	-5.0/30.0 ^b
Total phosphorus (mg l⁻¹) $\pm$ SD	0.083 $\pm$ 0.008 (54) ^a	0.077 $\pm$ 0.03 (30) ^b

	MVCC19	LB2897
Morphology		
Filament morphology	Straight and separate	Straight and slightly curved, bonded
Filament length (μm) $\pm$ SD	130.3 $\pm$ 55 (50)	162 $\pm$ 84 (50)
Filament width (μm) $\pm$ SD	2.57 $\pm$ 0.4 (50)	2.09 $\pm$ 0.26 (50)
Cell length (μm) $\pm$ SD	8.3 $\pm$ 0.4 (30)	8.5 $\pm$ 0.6 (30)
Filament volume (μm^3)	590.2 (50)	556.11 (50)
Heterocyte position	Terminal	Terminal
STX production (STX/GTX2/GTX3)	Yes ^{d,e}	No ^{d,e}
CYN production	No ^d	No ^d
Biogeographic characteristics	South American clade ^e	Ancestral to South American clade and related to Northern Africa strains ^e

DNA extraction and 16S RNA gene sequencing

To harvest the cells, samples were filtered on to 2 μm pore size polycarbonate hydrophilic membranes. The DNA extraction was performed as described in Martínez de la Escalera et al. 2014 using the filters containing the biomass as starting material. Briefly, the lysis was achieved by incubating the filters in extraction buffer containing 1% CTAB, EDTA and proteinase K at 37°C during 30 min on a shaker. Then, SDS was added and the mix was incubated at 65°C for 2 h. The resulting lysate was separated from the proteinaceous phase by centrifugation using 24:1 chloroform:isoamylalcohol (three times). After collecting the aqueous upper phase, DNA was precipitated with 0.1 vol. sodium acetate, pH 5.2 and 0.6 vol. isopropanol for 1 h at room temperature. Precipitated DNA was pelleted by centrifugation at 12,000 $\times$ g, 45 min, washed with 70% (v/v) cold ethanol (same centrifugation procedure) and suspended in 1 $\times$ TE overnight at 4°C. After extraction, the concentration and purity of DNA were spectrophotometrically determined at 260 and 280 nm (NanoDrop).

The 16S rRNA gene was amplified (three pooled technical replicates) and sequencing at the MacroGen Sequencing Service (South Korea). Sequencing libraries were prepared according to the Illumina 16S Metagenomic Sequencing Library protocols to amplify the V3-V4. Primer sequences used for the first amplifications were as follows: 341F/805R(V3-V4, 341F: CCTACGGGNGGCWGCAG, 805R: GACTACHVGGGTATCTAATCC) (Herlemann et al. 2011). The final purified product was then quantified using qPCR according to the qPCR Quantification Protocol Guide (KAPA Library Quantification Kits for Illumina Sequencing platforms) and qualified using the TapeStation DNA screentape (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Then, the paired-end (2 $\times$ 300 bp) sequencing was performed by the MacroGen Sequencing Service, using the MiSeqTM platform.

Data processing

Bioinformatic analyses of the microbiome were performed in R (version 4.1.0) using the DADA2 package (Callahan et al. 2016). Quality profiles of the forward and reverse reads were inspected by the recommended parameters of DADA2. Sequences were then quality filtered, denoised, merged and the chimera were removed using the DADA2 and amplicon sequence variants (ASVs) of the V3-V4 region of 16S rRNA gene were defined and taxonomically classified using version 132 of Silva Database as a reference (Quast et al. 2012, Glöckner et al. 2017). For multiple alignments, the Decipher package was used (Wright 2015) and the phylogeny tree was constructed with Phangorn (Schliep 2010) with the parameters recommended by Callahan et al. 2016 (see Suppl. material 1)

The composition of bacterial microbiomes at different taxonomic levels was analysed with the Phyloseq package (McMurdie and Holmes 2013) and plots were generated using the package Ggplot2 (Gómez-Rubio 2017). The sample rarefaction analyses were conducted using the library Ranacapa (Kandlikar et al. 2018) (Suppl. material 2). Alpha-diversity was assessed as the Shannon Diversity Index and beta-diversity as the Bray–Curtis distance. ASVs abundances were normalised by proportion (counts in each sample/column were scaled by the sample/column's sum).

Biodiversity scope

This study was focused on the microbiome of the bloom-forming cyanobacterium *Raphidiopsis raciborskii*, analysing the differences between the microbiome community composition of a saxitoxin-producing strain and a non-toxic one.

Target

16S ribosomal ARN gene.

Taxonomic range

Bacterial domain.

Data Resources

Sequence data from this study have been deposited to NCBI SRA database. Resource identifiers are PRJNA737279 for the taxa obtained from *R. raciborskii* MVCC19 microbiome and PRJNA737280 for those obtained from *R. raciborskii* LB2897.

Resource 1

Download URL

<https://dataview.ncbi.nlm.nih.gov/object/PRJNA737279?reviewer=gr4u4mm26jjn5dc8i2905sua91>

Resource identifier

PRJNA737279

Data format

FASTQ

Resource 2

Download URL

<https://dataview.ncbi.nlm.nih.gov/object/PRJNA737280?reviewer=ol123kf225qsavt057ma5epclk>

Resource identifier

PRJNA737280

Data format

FASTQ

Taxonomic composition of the microbiome

After filtering by quality, denoising, merging and removing the chimeras, a total of 50,753 and 35,908 reads were obtained for the microbiome of LB2897 and MVCC19, respectively. They were clustered into amplicon sequence variants (ASVs) with 100% sequence identity. Taxa richness was 31 and 22 and Shannon Diversity was 2.2 and 2.4 for LB2897 and MVCC19, respectively. Bray–Curtis Distance Index between both microbiomes was 0.26. The most represented phylum was Proteobacteria. Amongst these, the Alpha-proteobacteria were dominant (Table 2, Fig. 1).

In both microbiomes, few bacterial genera accounted for more than 50% of the community. In the case of the SxP (*R. raciborskii* MVCC19), the most abundant bacteria belonged to the *Rhizobium–Allorhizobium–Agrobacterium* clade (or *Neorhizobium*) (Mousavi et al. 2014) (Rhizobiaceae family, Alphaproteobacteria class), with a relative abundance of 22.5%, followed by 13.8% *SM1A02* (Phycisphaeraceae family, Planctomycetes), 12.3%

Brevundimonas (Caulobacteraceae family, Alphaproteobacteria class) and 9.8% *Emticicia* (family Cytophagaceae, phylum Bacteroidetes).

Table 2.				
GenBank retrieved sequences having more than 97% identity with the ASVs obtained in this study.				
Genus	Relative abundances (%)		Closer relative (% identity ≥ 97) and GeneBank accession number	Environmental source
	LB2897	MVCC19		
<i>SM1A02</i>	26.17	13.79	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene (99%) LR643748	Wastewater treatment system
<i>Hirschia</i>	20.54	5.80	Uncultured Hyphomonadaceae bacterium clone 1d_33690 (100%) MG805085	Sewage sludge of the completely autotrophic nitrogen removal over nitrite process with a submerged aerated biological filter and the effect of inorganic carbon on nitrogen removal and microbial activity.
<i>Labrys</i>	13.35	0.00	Uncultured alpha proteobacterium clone cafs1349 (100%) MF438647.1	Floodplain lake water
<i>Cutibacterium</i>	12.36	0	More than 100 sequences having 100% identity, including <i>C. acnes</i> (MT242489) and environmental clones associated with <i>P aramecium</i> (MH556018)	Oral microbiome. Isolation and Characterization of Predominant Microorganisms during decomposition of Waste Materials in a Field-Scale Composter
<i>Gemmobacter</i>	10.74	0	<i>Gemmobacter aquaticus</i> strain 05SS-25 (100%) MG780340	Freshwater sediment
<i>Neorhizobium</i>	0.23	22.51	<i>Rhizobium</i> sp. TH167 (100%) KT826347	Cyanobacterial aggregates
<i>Brevundimonas</i>	0	12.30	<i>Brevundimonas lenta</i> strain P4-2 (100%) M N181016 , MH348813 , MG642117	Water. Constructed wetlands. Ice
<i>Blastomonas</i>	0.24	9.64	<i>Blastomonas</i> sp. strain MPSM-12 (100%) M G494710	Daphnia is a reservoir for mercury-tolerant bacteria in the environment
<i>Azospirillum</i>	2.03	2.86	Uncultured bacterium clone SIP21-RS-6 (99%) FR774694	Rice rhizospheric soil
<i>Asinibacterium</i>	0.80	6.47	<i>Sediminibacterium</i> sp. strain FW305-C-49 (99%) MK402932	Groundwater

Genus	Relative abundances (%)		Closer relative (% identity $\geq$ 97) and GeneBank accession number	Environmental source
	LB2897	MVCC19		
<i>CL500-29_marine_group</i>	2.36	0	Uncultured bacterium clone Wat111 (100%) KC189789	Bacterial Community Structure on <i>Hydrilla verticillata</i> and <i>Vallisneria americana</i> in a Freshwater Spring
<i>Niveispirillum</i>	0.91	4.23	LT628527.1	Eutrophic lake. associated with cyano-bloom
<i>Phenylobacterium</i>	0	5.68	Uncultured bacterium clone SPN0-300day-93 (99%) MF085152	PAHs contaminated soil
<i>Bryobacter</i>	1.81	0	Uncultured bacterium clone (100%) LC336249	Down-flow Hanging Sponge (DHS) reactor treating toluene gas as carbon source
<i>Devosia</i>	1.94	0	Uncultured bacterium clone (100%) LR640062	Wastewater treatment system
<i>Emticicia</i>	0.00	9.76	Uncultured bacterium clone PIExp_89 (97%) KJ818846	Impact of manufactured TiO nanoparticles on planktonic and sessile bacterial communities (Moselle river)
<i>Gemmatimonas</i>	1.60	0.25	Uncultured <i>Aquabacterium</i> sp. clone bac21-T3-T2 (100%) KY606809	Hot water biofilm after heat shock treatment
<i>Roseomonas</i>	1.23	1.14	<i>Roseomonas</i> sp. strain FW305-C-119 (100%) MK402959	Groundwater
<i>Phreatobacter</i>	1.12	0	Uncultured <i>Rhizobiales</i> bacterium clone 1d_92826 (100%) MG803495	Sewage sludge of the completely autotrophic nitrogen removal over nitrite process with a submerged aerated biological filter and the effect of inorganic carbon on nitrogen removal and microbial activity.
<i>OLB12</i>	0.75	0	Uncultured bacterium clone F5K2Q4C04I6QGN (99%) GU911896	Activated sludge
<i>Muricoccus</i>	0	1.88	<i>Roseomonas</i> sp. strain FW305-C-119 (99%) MK402959	Groundwater
<i>Caulobacter</i>	0	1.82	Uncultured bacterium clone HK31-1-39-10 (100%) KX163332	Basaltic subsurface ecosystems

Genus	Relative abundances (%)		Closer relative (% identity $\geq$ 97) and GeneBank accession number	Environmental source
	LB2897	MVCC19		
<i>Roseococcus</i>	0.55	0.25	Uncultured bacterium clone N3 (100%) HQ697534	Biologically activated carbon for drinking water treatment
<i>IMCC26207</i>	0.36	0.10	Uncultured bacterium clone SZB6 (100%) A176889	Mangrove sediment
<i>Neorhizobium</i>	0	0.80	<i>Rhizobium</i> sp. strain A&R_E177 (97%) KX550303	Chimney Hills Pond, Tulsa
<i>Aminobacter</i>	0.18	0.00	Uncultured bacterium (100%) LR654214	Wastewater treatment system
<i>oc32</i>	0.15	0.29	Betaproteobacteria bacterium 5-B6 (98%) L523959	Root of aquatic plant
<i>Bauldia</i>	0.11	0	Uncultured bacterium clone MPB2-18 (99%) AB630694	Microflorae of aquatic moss pillars in a freshwater lake, East Antarctica
<i>Sphingomonas</i>	0.09	0	<i>Sphingomonas</i> sp. strain SM1-b (100%) MT279454	Exopolysaccharide-producing bacteria from the Ghadikola lagoon water.
<i>Pseudonocardia</i>	0.07	0	<i>Pseudonocardia</i> sp. strain IB2014P10-1 (100%) MH978626	Actinobacteria associated with deep-water endemic amphipods of Lake Baikal
<i>Nocardioides</i>	0.07	0	<i>Nocardioides kribbensis</i> strain P86 (100%) MT487642	Spacecraft associated microbial organisms from the Mars odyssey and Pathfinder missions
<i>Sphingopyxis</i>	0.04	0.08	<i>Sphingopyxis</i> sp. strain T93 9100%) MT611302	Bacteria isolated from highland barley cultivation soil in Tibet
<i>Lacibacter</i>	0.06	0	Uncultured prokaryote clone OTU029 (99%) KF680692	Drinking water biofilm
<i>Leifsonia</i>	0.05	0	Uncultured Microbacteriaceae bacterium clone UVmen1_31 (99%) JQ701147	Water from long-term experimental oligotrophic mesocosms in Cuatro Ciénegas"
<i>alpha_cluster</i>	0.05	0	Uncultured bacterium clone Espejo_1_17_12_Water.240996 (98%) KM184952	Water from Espejo lake, Argentina

Genus	Relative abundances (%)		Closer relative (% identity $\geq$ 97) and GeneBank accession number	Environmental source
	LB2897	MVCC19		
<i>Paludibaculum</i>	0.03	0.06	Uncultured bacterium clone FL_03_167 (100%) KC666531	Bacterial communities associated to <i>Microcystis</i> colonies
<i>Novosphingobium</i>	0	0.14	Uncultured bacterium clone LNH_9_9_11_Pumice.207741 (99%) KM124853	Water from Nahuel Huapi lake, Argentina
<i>Stenotrophomonas</i>	0	0.14	No match	-
<i>Pseudoxanthobacter</i>	0.04	0	Uncultured bacterium clone EF_bacC09 (100%) JX564275	Sediment from slow sand filtration columns (wastewater)

In the NoP (*R. raciborskii* LB2897), *SM1A02* was the most abundant genus (26.2% of the total), followed by 20.5% *Hirschia* (Hyphomonadaceae family, Alphaproteobacteria class), 13.3% *Labrys* (Xanthobacteraceae family, Alphaproteobacteria class) and 12.36% *Cutibacterium* (Propionibacteriaceae family, Actinobacteria class) (Fig. 2).

Discussion

The data, presented in this work, show that the composition of the bacterial community inhabiting the EPS of two strains of *R. raciborskii* is different, mainly due to the dominant genera. In the case of the NoP ecotype, the 16S rRNA sequences of the most abundant taxa share high identity with bacteria from wastewater treatments and sediment (Table 2). Wastewater bacteria are characterised by being very efficient in nutrient removal (Villaverde 2004). This seems to be the case of the *SM1A02* genus, dominant in NoP microbiome, but also abundant in the phycosphere of SxP. It has been proposed as a novel anammox (anaerobic ammonia oxidiser) bacterium (Tian et al. 2017) found in many activated sludges with good nitrifying performance (Chen et al. 2019). It has been also found in the phycosphere of the marine microalgae *Gambierdiscus* from different locations (Pacific Ocean, Atlantic Ocean, Caribbean Sea), suggesting that it may be broadly associated with this dinoflagellate (Rambo et al. 2019). The anaerobic oxidation of ammonium to nitrogen gas appears to be a metabolic pathway present in virtually any anoxic environment where fixed nitrogen (ammonium, nitrate, nitrite) is found. Therefore, in order to thrive in the EPS layer of *R. raciborskii*, the *SM1A02* anammox bacteria should be located in the anaerobic niches generated by degradation of the mucilage.

In the SxP ecotype, a genus affiliated to *Neorhizobium* (absent in NoP), was the most abundant taxon (Table 2). Bacteria from the Rhizobiaceae family are well known as symbiotic, nitrogen-fixing organisms that live in close association with plants. This nitrogen-fixing redundancy found in the toxic strain could reflect the fact that the saxitoxin molecule is nitrogen-rich, probably requiring high concentration of this nutrient to be produced under the nitrogen-deprived conditions of the BG11 medium. Due to the extreme oxygen

sensitivity of nitrogenase, the environmental oxygen partial pressure regulates the nitrogen fixation activity. Thus, it is a process that requires anaerobic or microaerobic conditions. In the case of rhizobia, a finely-tuned symbiosis with a plant is the most common strategy, which leads to a root nodule that avoids the high oxygen concentrations generated during photosynthesis (Ledermann et al. 2021). However, as our data do not provide functional information, more work involving, for example, RNA sequencing should be performed in order to determine the spatial location of active *Neorhizobium* inside the EPS of a cyanobacterium, as well as the actual role of this highly abundant microorganism in *R. raciborskii* EPS.

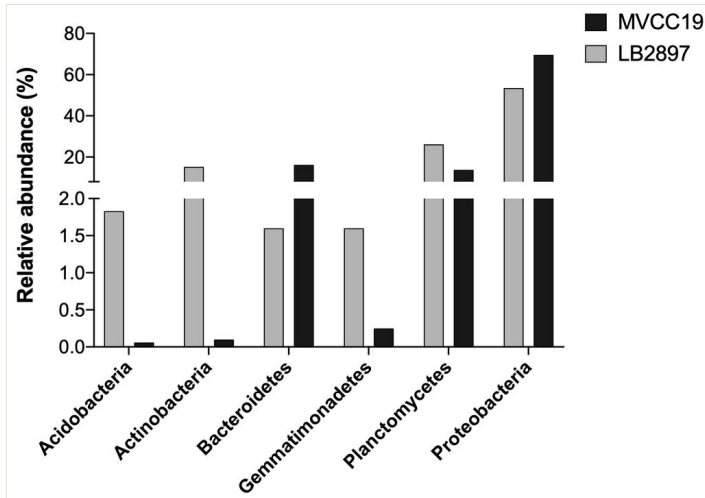


Figure 1. [doi](#)

Relative abundance of bacterial phyla found in *R. raciborskii* microbiome from the SxP ecotype (MVCC19, black bars) and NoP ecotype (LB2897, grey bars).

Other abundant bacterial groups associated to the SxP strain have been found in environments contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (Yang et al. 2018) or nanoparticles (Jomini et al. 2015). The presence of highly abundant bacteria (from 5 to 9%) with the ability to cope with complex compounds could be associated with the use of saxitoxin and analogues as carbon and nutrient source. In addition to organisms related to the nitrogen cycle, we also found taxa commonly found in water or sediment, cyanobacterial blooms and associated to eukaryotic microorganisms, these latter having a symbiotic lifestyle (Table 2).

Hence, the microbiome community, inhabiting the phycosphere of *R. raciborskii* grown under nitrogen-free conditions, showed a combination of functional groups involved in nitrogen cycling, degradation of complex organic compounds and the presence of symbiotic organisms. This functional coupling taking place in the phycosphere of *R. raciborskii* could be related to its small genome content (Stucken et al. 2010). This genome reduction decreases the replication-related energy costs and can be overcome by obtaining metabolic products from the community (Cook et al. 2019). In this way, shifts in

the microbiome may help the bacteria to cope with changing environmental conditions faster than by mutation and selection, implying that the whole community represents the unit of natural selection (Rosenberg et al. 2007).

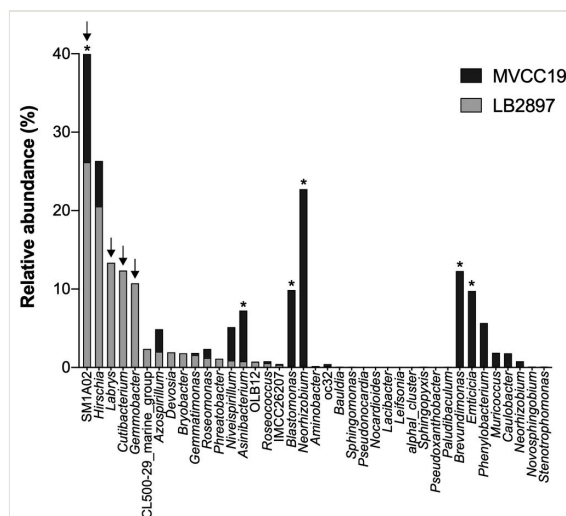


Figure 2. [doi](#)

Abundance of the bacterial genera found in the microbiome of SxP (toxic MVCC19) and NoP (non-toxic LB2897) ecotypes of *R. raciborskii*. Asterisks indicate those genera accounting for more than 50% of the community in the SxP ecotype (MVCC19, black bars) and NoP ecotype (LB2897, grey bars), respectively.

Moreover, some of the taxa, accounting for the higher bacterial richness observed in the NoP microbiome, showed relative abundances ranging from 0.1 to 12.4% and were affiliated to bacteria described as symbionts of eukaryotic organisms (aquatic plants and mosses, ciliates, amphipods) (Table 2). The absence of these bacteria in the microbiome of the SxP ecotype probably reflects not only the differences in toxin production, but also the different environmental characteristics of the lakes from where they were isolated (Table 1) and suggests a tighter coupling between the non-toxic cyanobacterium and its heterotrophic partners. Since bacterial ecotypes are characterised by having different specific niches and responses to the environment (Cohan 2019), our results suggest that the mechanisms involved in the assembly of the microbiome community are ecotype-dependent. This implies that, to understand and predict the appearance and dominance of bacteria in different environmental conditions, it would be necessary to study them as a community of organisms.

Conclusions

We found that the dominant bacterial genus in SxP and NoP microbiomes is involved in nitrogen metabolism. Interestingly, while the *SM1A02* genus reached its highest abundance in NoP, it also showed a high relative abundance in SxP. On the other hand,

the most abundant genus in SxP (*Neorhizobium*) was in extremely low abundance in NoP. *SM1A02* has been described as anaerobic ammonia oxidisers (anammox) that convert ammonium and nitrite to nitrogen gas and *Neorhizobium* (22.5%) is a nitrogen-fixing Alphaproteobacteria. As saxitoxin and analogues are nitrogen-rich molecules (7 atoms per molecule), toxic ecotypes would need more nitrogen supply than non-toxics to maintain fitness. We hypothesise that saxitoxin-producing *R. raciborskii* benefits from external sources of nitrogen provided by the anammox and nitrogen-fixers partners.

Caveats and Limitations

The cultures of both strains were performed without added nitrogen, which implies that nitrogen fixation is the main way of obtaining the needed reduced nitrogen to growth. Further studies involving different nitrogen concentrations in the culture medium should be performed in order to determine if the dominant members of the microbiome are still those related to nitrogen cycling.

Usage Rights

Sequence data from this study will be publicly available at NCBI.

Acknowledgements

This work was supported by PEDECIBA and CSIC-Universidad de la República and was carried out in partial fulfilment of the requirements of P.V. for the Doctoral degree from PEDECIBA. P.V. was the recipient of a fellowship from ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación, Uruguay).

Author contributions

Paula Vico - laboratory work, bioinformatic analysis, writing.

Andrés Iriarte - bioinformatic analysis, supervision, writing, revision.

Sylvia Bonilla - laboratory work (supervision of strains growth), revision.

Claudia Piccini - laboratory work, supervision, writing, revision.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest

References

- Aguilera A, Gómez EB, Kaštovský J, Echenique R, Salerno G (2019) The polyphasic analysis of two native *Raphidiopsis* isolates supports the unification of the genera *Raphidiopsis* and *Cylindrospermopsis* (Nostocales, Cyanobacteria). *Phycologia* 57 (2): 130-146. <https://doi.org/10.2216/17-2.1>
- Antunes J, Leão P, Vasconcelos V (2015) *Cylindrospermopsis raciborskii*: review of the distribution, phylogeography, and ecophysiology of a global invasive species. *Frontiers in Microbiology* 6 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00473>
- Bell W, Mitchel R (1972) Chemotactic and growth responses of marine bacteria to algal extracellular products. *The Biological Bulletin* 143 (2): 265-277. <https://doi.org/10.2307/1540052>
- Bonilla S, Aubriot L, Soares M, González-Piana M, Fabre A, Huszar VM, Lüring M, Antoniadis D, Padisák J, Kruk C (2012) What drives the distribution of the bloom-forming bacteria *Planktothrix agardhii* and *Cylindrospermopsis raciborskii*? *FEMS Microbiology Ecology* 79 (3): 594-607. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01242.x>
- Bonilla S, González-Piana M, Soares MS, Huszar VM, Becker V, Somma A, Marinho M, Kokociński M, Dokulil M, Antoniadis D, Aubriot L (2016) The success of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in freshwaters is enhanced by the combined effects of light intensity and temperature. *Journal of Limnology* <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2016.1479>
- Briand J, Leboulanger C, Humbert J, Bernard C, Dufour P (2004) *Cylindrospermopsis raciborskii* (bacteria) invasion at mid-latitudes: selection, wide physiological tolerance, or global warming? *Journal of Phycology* 40 (2): 231-238. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2004.03118.x>
- Burford M, Willis A, Chuang A, Man X, Orr P (2018) Recent insights into physiological responses to nutrients by the cylindrospermopsin producing cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Journal of Oceanology and Limnology* 36 (4): 1032-1039. <https://doi.org/10.1007/s00343-018-7179-5>
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP (2016) DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* 13 (7): 581-583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Chen Y, Wang C, Dong S, Jiang L, Shi Y, Li X, Zou W, Tan Z (2019) Microbial community assembly in detergent wastewater treatment bioreactors: Influent rather than inoculum source plays a more important role. *Bioresource Technology* 287 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121467>
- Clark M, Jones W (2006,2011,2013) Lake Lemon annual monitoring report, prepared for the Lake Lemon Conservancy District, Unionville, IN. School of Public and Environmental Affairs, Indiana University, Bloomington, Indiana.
- Cohan F (2019) Transmission in the Origins of Bacterial Diversity, From Ecotypes to Phyla. *Microbial Transmission* 311-343. <https://doi.org/10.1128/9781555819743.ch18>
- Cook KV, Li C, Cai H, Krumholz LR, Hambricht KD, Paerl HW, Steffen MM, Wilson AE, Burford MA, Grossart H, Hamilton DP, Jiang H, Sukenik A, Latour D, Meyer EI, Padisák J, Qin B, Zamor RM, Zhu G (2019) The global Microcystis interactome. *Limnology and Oceanography* 65 (Suppl 1): S194-S207. <https://doi.org/10.1002/lno.11361>

- Dokulil M (2015) Vegetative survival of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) at low temperature and low light. *Hydrobiologia* 764 (1): 241-247. <https://doi.org/10.1007/s10750-015-2228-y>
- Glöckner FO, Yilmaz P, Quast C, Gerken J, Beccati A, Ciuprina A, Bruns G, Yarza P, Peplies J, Westram R, Ludwig W (2017) 25 years of serving the community with ribosomal RNA gene reference databases and tools. *Journal of Biotechnology* 261: 169-176. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.06.1198>
- Gómez-Rubio V (2017) ggplot2 - Elegant graphics for data analysis (2nd Edition). *Journal of Statistical Software* 77 <https://doi.org/10.18637/jss.v077.b02>
- Herlemann DP, Labrenz M, Jürgens K, Bertilsson S, Waniek JJ, Andersson AF (2011) Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *The ISME Journal* 5 (10): 1571-1579. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.41>
- Hillebrand H, Dürselen C, Kirschtel D, Pollinger U, Zohary T (1999) Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology* 35 (2): 403-424. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1999.3520403.x>
- Humbert J, Barbe V, Latifi A, Gugger M, Calteau A, Coursin T, Lajus A, Castelli V, Oztas S, Samson G, Longin C, Medigue C, de Marsac NT (2013) A tribute to disorder in the genome of the bloom-forming freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *PLOS One* 8 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070747>
- Jankowiak J, Gobler C (2020) The composition and function of microbiomes within *Microcystis* colonies are significantly different than native bacterial assemblages in two North American lakes. *Frontiers in Microbiology* 11 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01016>
- Jomini S, Clivot H, Bauda P, Pagnout C (2015) Impact of manufactured TiO₂ nanoparticles on planktonic and sessile bacterial communities. *Environmental Pollution* 202: 196-204. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.03.022>
- Kandlikar G, Gold Z, Cowen M, Meyer R, Freise A, Kraft NB, Moberg-Parker J, Sprague J, Kushner D, Curd E (2018) ranacapa: An R package and shiny web app to explore environmental DNA data with exploratory statistics and interactive visualizations. *F1000Research* 7 <https://doi.org/10.12688/f1000research.16680.1>
- Ledermann R, Schulte CM, Poole P (2021) How *Rhizobia* adapt to the nodule environment. *Journal of Bacteriology* 203 (12). <https://doi.org/10.1128/jb.00539-20>
- Louati I, Pascault N, Debroas D, Bernard C, Humbert J, Leloup J (2015) Structural diversity of bacterial communities associated with bloom-forming freshwater bacteria differs according to the cyanobacterial genus. *PLOS One* 10 (11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140614>
- Martínez de la Escalera G, Antoniadis D, Bonilla S, Piccini C (2014) Application of ancient DNA to the reconstruction of past microbial assemblages and for the detection of toxic bacteria in subtropical freshwater ecosystems. *Molecular Ecology* 23 (23): 5791-802. <https://doi.org/10.1111/mec.12979>
- McMurdie P, Holmes S (2013) Phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLOS One* 8 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Moreira C, Fathalli A, Vasconcelos V, Antunes A (2014) Phylogeny and biogeography of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Archives of Microbiology* 197 (1): 47-52. <https://doi.org/10.1007/s00203-014-1052-5>

- Morris JJ, Johnson Z, Szul M, Keller M, Zinser E (2011) Dependence of the cyanobacterium *Prochlorococcus* on hydrogen peroxide scavenging microbes for growth at the ocean's surface. PLOS One 6 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016805>
- Mousavi SA, Österman J, Wahlberg N, Nesme X, Lavire C, Vial L, Paulin L, de Lajudie P, Lindström K (2014) Phylogeny of the Rhizobium–Allorhizobium–Agrobacterium clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen. nov. Systematic and Applied Microbiology 37 (3): 208-215. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.12.007>
- Neilan BA, Saker ML, Fastner J, Törökne A, Burns BP (2002) Phylogeography of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. Molecular Ecology 12 (1): 133-140. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2003.01709.x>
- Pande S, Kost C (2017) Bacterial unculturability and the formation of intercellular metabolic networks. Trends in Microbiology 25 (5): 349-361. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.02.015>
- Piccini C, Aubriot L, Fabre A, Amaral V, González-Piana M, Giani A, Figueredo C, Vidal L, Kruk C, Bonilla S (2011) Genetic and eco-physiological differences of South American *Cylindrospermopsis raciborskii* isolates support the hypothesis of multiple ecotypes. Harmful Algae 10 (6): 644-653. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.04.016>
- Quast C, Priesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO (2012) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. Nucleic Acids Research 41 <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Rambo I, Dombrowski N, Constant L, Erdner D, Baker B (2019) Metabolic relationships of uncultured bacteria associated with the microalgae Gambierdiscus. Environmental Microbiology 22 (5): 1764-1783. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14878>
- Rosenberg E, Koren O, Reshef L, Efrony R, Zilber-Rosenberg I (2007) The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. Nature Reviews Microbiology 5 (5): 355-362. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1635>
- Rossi F, De Philippis R (2015) Role of cyanobacterial exopolysaccharides in phototrophic biofilms and in complex microbial mats. Life 5 (2): 1218-1238. <https://doi.org/10.3390/life5021218>
- Schliep KP (2010) Phangorn: phylogenetic analysis in R. Bioinformatics 27 (4): 592-593. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq706>
- Seymour J, Amin S, Raina J, Stocker R (2017) Zooming in on the phycosphere: the ecological interface for phytoplankton–bacteria relationships. Nature Microbiology 2 (7). <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.65>
- Soares M, Lüring M, Huszar VM (2012) Growth and temperature-related phenotypic plasticity in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. Phycological Research 61 (1): 61-67. <https://doi.org/10.1111/pre.12001>
- Stanier RY, Kunisawa R, Mandel M, Cohen-Bazire G (1971) Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). Bacteriological Reviews 35 (2): 171-205. <https://doi.org/10.1128/br.35.2.171-205.1971>
- Stucken K, John U, Cembella A, Murillo AA, Soto-Liebe K, Fuentes-Valdés JJ, Friedel M, Plominsky AM, Vásquez M, Glöckner G (2010) The smallest known genomes of multicellular and toxic bacteria: comparison, minimal gene sets for linked traits and the evolutionary implications. PLOS One 5 (2): e9235. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009235>

- Tian S, Tian Z, Yang H, Yang M, Zhang Y (2017) Detection of viable bacteria during sludge ozonation by the combination of ATP assay with PMA-Miseq sequencing. *Water* 9 (3). <https://doi.org/10.3390/w9030166>
- 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. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 148 <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2020.106824>
- Vidal L, Kruk C (2008) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) extends its distribution to Latitude 34°53'S: taxonomical and ecological features in Uruguayan eutrophic lakes. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*.
- Villaverde S (2004) Recent developments on biological nutrient removal processes for wastewater treatment. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 3 (2): 171-183. <https://doi.org/10.1007/s11157-004-4565-6>
- Willis A, Woodhouse J, Ongley S, Jex A, Burford M, Neilan B (2018) Genome variation in nine co-occurring toxic *Cylindrospermopsis raciborskii* strains. *Harmful Algae* 73: 157-166. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.03.001>
- Woodhouse J, Ziegler J, Grossart H, Neilan B (2018) Cyanobacterial community composition and bacteria–bacteria interactions promote the stable occurrence of particle-associated bacteria. *Frontiers in Microbiology* 9 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00777>
- Wood S, Pochon X, Luttringer-Plu L, Vant B, Hamilton D (2014) Recent invader or indicator of environmental change? A phylogenetic and ecological study of *Cylindrospermopsis raciborskii* in New Zealand. *Harmful Algae* 39: 64-74. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.06.013>
- Wright E (2015) Decipher: harnessing local sequence context to improve protein multiple sequence alignment. *BMC Bioinformatics* 16 (1). <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0749-z>
- 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* 53 (3): 465-481. <https://doi.org/10.1007/s10452-019-09702-7>
- Yang S, Gou Y, Song Y, Li P (2018) Enhanced anoxic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a highly contaminated aged soil using nitrate and soil microbes. *Environmental Earth Sciences* 77 (12). <https://doi.org/10.1007/s12665-018-7629-6>
- Yilmaz M, Philips E (2011) Diversity of and selection acting on cylindrospermopsin *cyrB* gene adenylation domain sequences in Florida. *Applied and Environmental Microbiology* 77 (7): 2502-2507. <https://doi.org/10.1128/aem.02252-10>

Supplementary materials

Suppl. material 1: Sequence ASV table [doi](#)

Authors: Paula Vico, Andrés Iriarte, Claudia Piccini

Data type: Phylogenetic

Brief description: The representative sequence of each identified ASV and their taxonomic identity according to SILVA database are shown.

[Download file](#) (48.00 kb)

Suppl. material 2: Rarefaction curves [doi](#)

Authors: Paula Vico, Andrés Iriarte, Sylvia Bonilla, Claudia Piccini

Data type: image

Brief description: Rarefaction curves obtained from the 16S rRNA gene sequencing for each *R. raciborskii* strain

[Download file](#) (604.37 kb)

Bibliografía

- Abreu, V.A.C., Popin, R. V., Alvarenga, D.O., Schaker, P.D.C., Hoff-Risseti, C., Varani, A.M., Fiore, M.F., 2018. Genomic and genotypic characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii*: Toward an intraspecific phylogenetic evaluation by comparative genomics. *Front. Microbiol.* 9, 309215. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.00306/BIBTEX>
- Aguilera, A., Almanza, V., Haakonsson, S., Palacio, H., Rodas, G.A.B., Barros, M.U.G., Capelo-Neto, J., Urrutia, R., Aubriot, L., Bonilla, S., 2023. Cyanobacterial bloom monitoring and assessment in Latin America. *Harmful Algae* 125, 1568–9883. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2023.102429>
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Amaral, V., Bonilla, S., Aubriot, L., 2014. Growth optimization of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in response to phosphate fluctuations. *Eur. J. Phycol.* 49, 134–141. <https://doi.org/10.1080/09670262.2014.897760>
- Ammar, M., Comte, K., Chi Tran, T. Du, Bour, M. El, 2014. Initial growth phases of two bloom-forming cyanobacteria (*Cylindrospermopsis raciborskii* and *Planktothrix agardhii*) in monocultures and mixed cultures depending on light and nutrient conditions. *Ann. Limnol. - Int. J. Limnol.* 50, 231–240. <https://doi.org/10.1051/LIMN/2014096>
- Andrinolo, D., Iglesias, V., García, C., Lagos, N., 2002. Toxicokinetics and toxicodynamics of gonyautoxins after an oral toxin dose in cats. *Toxicon* 40, 699–709. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(01\)00263-x](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(01)00263-x)
- Antunes, J.T., Leão, P.N., Vasconcelos, V.M., 2015. *Cylindrospermopsis raciborskii*: Review of the distribution, phylogeography, and ecophysiology of a global invasive species. *Front. Microbiol.* 6, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00473>
- Aubriot, L., Bonilla, S., 2018. Regulation of phosphate uptake reveals cyanobacterial bloom resilience to shifting N:P ratios. *Freshw. Biol.* 63, 318–329. <https://doi.org/10.1111/FWB.13066>
- Aziz, R.K., Bartels, D., Best, A.A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R.A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E.M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G.J., Olson, R., Osterman, A.L., Overbeek, R.A., McNeil, L.K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G.D., Reich, C., Stevens, R., Vassieva, O., Vonstein, V., Wilke, A., Zagnitko, O., 2008. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics* 9, 75. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>
- Bagnéris, C., Naylor, C.E., McCusker, E.C., Wallace, B.A., 2015. Structural model of the open-closed-inactivated cycle of prokaryotic voltage-gated sodium channels. *J. Gen. Physiol.* 145, 5–16. <https://doi.org/10.1085/jgp.201411242>
- Banerjee, S., Maity, S., Guchhait, R., Chatterjee, A., Biswas, C., Adhikari, M., Pramanick, K., 2021. Toxic effects of cyanotoxins in teleost fish: A comprehensive review. *Aquat. Toxicol.* 240. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2021.105971>
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V.M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Pribelski, A.D., Pyshkin, A. V, Sirotkin, A. V, Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M.A., Pevzner, P.A., 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol. a J. Comput. Mol. cell Biol.* 19, 455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Baron-Sola, A., Ouahid, Y., del Campo, F.F., 2012. Detection of potentially producing cylindrospermopsin and microcystin strains in mixed populations of cyanobacteria by simultaneous amplification of cylindrospermopsin and microcystin gene regions. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 75, 102–108.
- Beamud, G., Vico, P., Haakonsson, S., de la Escalera, G.M., Piccini, C., Brena, B.M.,

- Pirez, M., Bonilla, S., 2016. Influence of UV-B radiation on the fitness and toxin expression of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Hydrobiologia* 763, 161–172. <https://doi.org/10.1007/s10750-015-2370-6>
- Bell, W., Mitchell, R., 1972. Chemotactic and growth responses of marine bacteria to algal extracellular products. *Biol. Bull.* 143, 265–277.
- Belykh, O.I., Tikhonova, I. V., Kuzmin, A. V., Sorokovikova, E.G., Fedorova, G.A., Khanaev, I. V., Sherbakova, T.A., Timoshkin, O.A., 2016. First detection of benthic cyanobacteria in Lake Baikal producing paralytic shellfish toxins. *Toxicon* 121, 36–40. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2016.08.015>
- Ben Hania, W., Joseph, M., Bunk, B., Spröer, C., Klenk, H.-P., Fardeau, M.-L., Spring, S., 2017. Characterization of the first cultured representative of a Bacteroidetes clade specialized on the scavenging of cyanobacteria. *Environ. Microbiol.* 19, 1134–1148. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1462-2920.13639>
- Bernard, C., Harvey, M., Briand, J.F., Biré, R., Krys, S., Fontaine, J.J., 2003. Toxicological comparison of diverse *Cylindrospermopsis raciborskii* strains: Evidence of liver damage caused by a French *C. raciborskii* strain. *Environ. Toxicol.* 18, 176–186. <https://doi.org/10.1002/tox.10112>
- Bonilla, S., 2009. Cianobacterias Planctónicas del Uruguay Manual para la identificación y medidas de gestión.
- Bonilla, S., Aubriot, L., Soares, M.C.S., Gonzalez-Piana, M., Fabre, A., Huszar, V.L.M., Lürling, M., Antoniades, D., Padisák, J., Kruk, C., 2012a. What drives the distribution of the bloom-forming cyanobacteria *Planktothrix agardhii* and *Cylindrospermopsis raciborskii*? *FEMS Microbiol. Ecol.* 79, 594–607.
- Bonilla, S., Aubriot, L., Soares, M.C.S., González-Piana, M., Fabre, A., Huszar, V.L.M., Lürling, M., Antoniades, D., Padisák, J., Kruk, C., 2012b. What drives the distribution of the bloom-forming cyanobacteria *Planktothrix agardhii* and *Cylindrospermopsis raciborskii*? *FEMS Microbiol. Ecol.* 79, 594–607. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01242.x>
- Bonilla, S., Gonzalez-Piana, M., Soares, M.C.S., Huszar, V.L.M., Becker, V., Somma, A., Marinho, M.M., Kokociński, M., Dokulil, M., Antoniades, D., 2016. The success of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in freshwaters is enhanced by the combined effects of light intensity and temperature. *J. Limnol.* 75.
- Bonilla, S., Haakonsson, S., Somma, A., Gravier, A., Britos, A., Vidal, L., León, L. De, Brena, B., Pérez, M., Piccini, C., Escalera, G.M. de la, Chalar, G., González-Piana, M., Martigani, F., Aubriot, L., 2015. Cianobacterias y cianotoxinas en ecosistemas límnicos de Uruguay. *INNOTECH* 0, 9–22. <https://doi.org/10.26461/10.01>
- Bordenstein, S.R., Theis, K.R., 2015. Host biology in light of the microbiome: Ten principles of holobionts and hologenomes. *PLoS Biol.* 13. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.1002226>
- Braun, E., Bachofen, R., 2004. Homoserine-lactones and microcystin in cyanobacterial assemblages in Swiss lakes. *Hydrobiol.* 2004 5221 522, 271–280. <https://doi.org/10.1023/B:HYDR.0000029968.70297.C3>
- Brentano, D.M., Giehl, E.L.H., Petrucio, M.M., 2016. Abiotic variables affect STX concentration in a meso-oligotrophic subtropical coastal lake dominated by *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae). *Harmful Algae* 56, 22–28. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.03.017>
- Briand, J.F., Lebouranger, C., Humbert, J.F., Bernard, C., Dufour, P., 2004. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) invasion at mid-latitudes: Selection, wide physiological tolerance, or global warming? *J. Phycol.* 40, 231–238. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2004.03118.x>
- Buchfink, B., Xie, C., Huson, D.H., 2014. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nat. Methods* 2014 121 12, 59–60. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3176>
- Buratti, F.M., Manganelli, M., Vichi, S., Stefanelli, M., Scardala, S., Testai, E., Funari, E., 2017. Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. *Arch. Toxicol.* 91, 1049–

1130. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1913-6>
- Burford, M.A., Beardall, J., Willis, A., Orr, P.T., Magalhaes, V.F., Rangel, L.M., Azevedo, S.M.F.O.E., Neilan, B.A., 2016. Understanding the winning strategies used by the bloom-forming cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Harmful Algae* 54, 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.10.012>
- Burford, M.A., Davis, T.W., Orr, P.T., Sinha, R., Willis, A., Neilan, B.A., 2014. Nutrient-related changes in the toxicity of field blooms of the cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 89, 135–148. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12341>
- Burford, M.A., Mcneale, K.L., McKenzie-Smith, F.J., 2006. The role of nitrogen in promoting the toxic cyanophyte *Cylindrospermopsis raciborskii* in a subtropical water reservoir. *Freshw. Biol.* 51, 2143–2153. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2427.2006.01630.X>
- Burford, M.A., Willis, A., Chuang, A., Man, X., Orr, P.T., 2018. Recent insights into physiological responses to nutrients by the cylindrospermopsin producing cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*. *J. Oceanol. Limnol.* 36, 1032–1039.
- Burnap, R.L., Hagemann, M., Kaplan, A., 2015. Regulation of CO₂ Concentrating Mechanism in Cyanobacteria. *Life (Basel, Switzerland)* 5, 348–371. <https://doi.org/10.3390/life5010348>
- 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>
- Carmichael, W.W., Azevedo, S.M., An, J.S., Molica, R.J., Jochimsen, E.M., Lau, S., Rinehart, K.L., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K., 2001. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environ. Health Perspect.* 109, 663–668.
- Carneiro, R.L., Alípio, A.C.N., Bisch, P.M., de Oliveira Azevedo, S.M.F., Pacheco, A.B.F., 2011. The inhibitory effect of calcium on *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) metabolism. *Brazilian J. Microbiol.* [publication Brazilian Soc. Microbiol. 42, 1547–1559. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220110004000042>
- Carneiro, R.L., Pacheco, A.B.F., De Oliveira E Azevedo, S.M.F., 2013. Growth and saxitoxin production by *cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) correlate with water hardness. *Mar. Drugs* 11, 2949–2963. <https://doi.org/10.3390/md11082949>
- CARP, 1989. Estudio para la evaluación de la contaminación en el Río de la Plata. Informe de Avance., Comisión Administradora del Río de la Plata.
- Cartmell, C., Evans, D.M., Elwood, J.M.L., Fituri, H.S., Murphy, P.J., Caspari, T., Poniedziałek, B., Rzymiski, P., 2017. Synthetic analogues of cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin and their toxicological activity. *Toxicol. In Vitro* 44, 172–181. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.07.007>
- Castro, D., 2004. The effect of temperature on growth and production of paralytic shellfish poisoning toxins by the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* C10.
- Cestèle, S., Catterall, W.A., 2000. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie* 82, 883–92.
- Chen, G., Li, J., Lv, H., Wang, S., Zuo, J., Zhu, L., 2019. Mesoporous coxs(1 - x)o₂ as an efficient oxygen evolution catalyst support for spe water electrolyzer. *R. Soc. Open Sci.* 6. <https://doi.org/10.6084/M9.FIGSHARE>
- Chen, S., Yan, M., Huang, T., Zhang, H., Liu, K., Huang, X., Li, N., Miao, Y., Sekar, R., 2020. Disentangling the drivers of *Microcystis* decomposition: Metabolic profile and co-occurrence of bacterial community. *Sci. Total Environ.* 739, 140062. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.140062>
- Chen, X., Schreiber, K., Appel, J., Makowka, A., Fähnrich, B., Roettger, M., Hajirezaei, M.R., Sönnichsen, F.D., Schönheit, P., Martin, W.F., Gutekunst, K., 2016. The

- Entner–Doudoroff pathway is an overlooked glycolytic route in cyanobacteria and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 5441–5446.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1521916113>
- Chen, Y., Wang, C., Dong, S., Jiang, L., Shi, Y., Li, X., Zou, W., Tan, Z., 2019. Microbial community assembly in detergent wastewater treatment bioreactors: Influent rather than inoculum source plays a more important role. *Bioresour. Technol.* 287, 121467.
- Chislock, M.F., Sharp, K.L., Wilson, A.E., 2014. *Cylindrospermopsis raciborskii* dominates under very low and high nitrogen-to-phosphorus ratios. *Water Res.* 49, 207–214. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2013.11.022>
- Chonudomkul, D., Yongmanitchai, W., Theeragool, G., Kawachi, M., Kasai, F., Kaya, K., Watanabe, M.M., 2004. Morphology, genetic diversity, temperature tolerance and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) strains from Thailand and Japan. *FEMS Microbiol. Ecol.* 48, 345–355.
<https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.02.014>
- Chorus, I., 2012. Current approaches to Cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries.
- Chorus, I., Welker, M., 2021. Toxic Cyanobacteria in Water. Toxic Cyanobacteria in Water. <https://doi.org/10.1201/9781003081449/TOXIC-CYANOBACTERIA-WATER-INGRID-CHORUS-MARTIN-WELKER>
- Clark, M.A.L., Jones, W.W., 2006. Lake Lemon Monitoring Program, 2005 Results, Lake Lemon Conservancy District. Bloomington, Indiana.
- Cohan, F.M., 2019. Transmission in the Origins of Bacterial Diversity, From Ecotypes to Phyla, in: *Microbial Transmission*. pp. 311–343.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1128/9781555819743.ch18>
- Conde, D., Hein, V., Bonilla, S., 2009. Floraciones de cianobacterias en lagunas costeras. *Cianobacterias planctónicas del Uruguay. Man. para la identificación y medidas Monit.* 79–80.
- Contreras-Moreira, B., Vinuesa, P., 2013. GET_HOMOLOGUES, a Versatile Software Package for Scalable and Robust Microbial Pangenome Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 7696–7701. <https://doi.org/10.1128/AEM.02411-13>
- 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>
- Cremella, B., 2017. Puesta a punto y validación de un método basado en la fluorescencia in vivo de pigmentos como indicador de biomasa de fitoplancton y cianobacterias en cuerpos de agua de Uruguay.
- Cremella, B., 2014. Factores involucrados en la expansión de la cianobacteria *Cylindrospermopsis raciborskii* en el continente americano.
- Cullen, A., D'Agostino, P.M., Mazmouz, R., Pickford, R., Wood, S., Neilan, B.A., 2018. Insertions within the Saxitoxin Biosynthetic Gene Cluster Result in Differential Toxin Profiles. *ACS Chem. Biol.* 13, 3107–3114.
<https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b00608>
- De Leon, L., Yunes, J.S., 2001. First report of a Microcystin-containing bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in the La Plata River, South America. *Environ. Toxicol.* 16, 110–112. [https://doi.org/10.1002/1522-7278\(2001\)16:1<110::AID-TOX1012>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/1522-7278(2001)16:1<110::AID-TOX1012>3.0.CO;2-Z)
- De Philippis, R., Margheri, M.C., Materassi, R., Vincenzini, M., 1998. Potential of unicellular cyanobacteria from saline environments as exopolysaccharide producers. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1130–1132.
<https://doi.org/10.1128/AEM.64.3.1130-1132.1998>
- DeCaen, P.G., Takahashi, Y., Krulwich, T.A., Ito, M., Clapham, D.E., 2014. Ionic selectivity and thermal adaptations within the voltage-gated sodium channel family

- of alkaliphilic *Bacillus*. *Elife* 3, e04387. <https://doi.org/10.7554/eLife.04387>
- Dicke, M., Sabelis, M.W., 1988. Infochemical Terminology: Based on Cost-Benefit Analysis Rather than Origin of Compounds? *Funct. Ecol.* 2, 131–139. <https://doi.org/10.2307/2389687>
- Dietz, R., Holden, J., 1970. Reconstruction of Pangaea. Breakup and dispersion of continents, Permian to present. *J Geophys Res* 75, 4939–4956. <https://doi.org/10.1029/JB075I026P04939>
- Dittmann, E., Fewer, D.P., Neilan, B.A., 2013. Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and evolutionary roots. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 23–43. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2012.12000.X>
- Dokulil, M.T., 2016. Vegetative survival of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) at low temperature and low light. *Hydrobiologia* 764, 241–247. <https://doi.org/10.1007/s10750-015-2228-y>
- Dokulil, M.T., Teubner, K., 2000. Cyanobacterial dominance in lakes. *Hydrobiologia* 438, 1–12. <https://doi.org/10.1023/A:1004155810302>
- Durán-Riveroll, L.M., Cembella, A.D., 2017. Guanidinium Toxins and Their Interactions with Voltage-Gated Sodium Ion Channels. *Mar. Drugs* 15. <https://doi.org/10.3390/md15100303>
- Duval, C., Thomazeau, S., Drelin, Y., Yéprémian, C., Bouvy, M., Couloux, A., Troussellier, M., Rousseau, F., Bernard, C., 2018. Phylogeny and salt-tolerance of freshwater Nostocales strains: Contribution to their systematics and evolution. *Harmful Algae* 73, 58–71. <https://doi.org/10.1016/J.HAL.2018.01.008>
- Dziallas, C., Grossart, H.P., 2011a. Temperature and biotic factors influence bacterial communities associated with the cyanobacterium *Microcystis* sp. *Environ. Microbiol.* 13, 1632–1641. <https://doi.org/10.1111/J.1462-2920.2011.02479.X>
- Dziallas, C., Grossart, H.P., 2011b. Increasing oxygen radicals and water temperature select for toxic *microcystis* sp. *PLoS One* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025569>
- Eiler, A., Microbiology, S.B.-E., 2004, undefined, 2004. Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish lakes. *Wiley Online Libr.* 6, 1228–1243. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00657.x>
- Fabre, A., Carballo, C., Hernández, E., Piriz, P., Bergamino, L., Mello, L., González, S., Pérez, G., León, J.G., Aubriot, L., Bonilla, S., Kruk, C., 2010. El nitrógeno y la relación zona eufótica / zona de mezcla explican la presencia de cianobacterias en pequeños lagos subtropicales , artificiales de Uruguay. *Panam. J. Aquat. Sci.* 5, 112–125.
- Fabre, A., Lacerot, G., de Paiva, R.R., Soares, M.C.S., de Magalhães, V.F., Bonilla, S., 2017. South American PSP toxin-producing *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) decreases clearance rates of cladocerans more than copepods. *Hydrobiologia* 785, 61–69. <https://doi.org/10.1007/s10750-016-2903-7>
- Falconer, I.R., Humpage, A.R., 2001. Preliminary evidence for in vivo tumour initiation by oral administration of extracts of the blue-green alga *cylindrospermopsis raciborskii* containing the toxin cylindrospermopsin. *Environ. Toxicol.* 16, 192–195. <https://doi.org/10.1002/TOX.1024>
- Fastner, J., Heinze, R., Humpage, A.R., Mischke, U., Eaglesham, G.K., Chorus, I., 2003. Cylindrospermopsin occurrence in two German lakes and preliminary assessment of toxicity and toxin production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates. *Toxicon* 42, 313–21.
- Fujinami, S., Sato, T., Trimmer, J.S., Spiller, B.W., Clapham, D.E., Krulwich, T.A., Kawagishi, I., Ito, M., 2007. The voltage-gated Na⁺ channel NaVBP co-localizes with methyl-accepting chemotaxis protein at cell poles of alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4. *Microbiology* 153, 4027–4038. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/012070-0>
- Gallacher, S., Smith, E.A., 1999. Bacteria and Paralytic Shellfish Toxins. *Protist* 150,

- 245–255. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1434-4610\(99\)70027-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1434-4610(99)70027-1)
- Giovannoni, S.J., Thrash, J.C., Temperton, B., 2014. Implications of streamlining theory for microbial ecology. *ISME J.* 8, 1553–1565.
- Gómez-Rubio, V., 2017. ggplot2 - Elegant Graphics for Data Analysis (2nd Edition). *J. Stat. Softw.* 77. <https://doi.org/DOI: http://hdl.handle.net/10.>
- González-Madina, L., Levrini, P., de Tezanos Pinto, P., Burwood, M., Crisci, C., Cardozo, A., Lagomarsino, J.J., Pacheco, J.P., Fosalba, C., Méndez, G., Garrido, L., Mazzeo, N., 2021a. Blooms of toxic *Raphidiopsis raciborskii* in Laguna del Sauce (Uruguay): environmental drivers and impacts. *Hydrobiol.* 2021 1–18. <https://doi.org/10.1007/S10750-021-04783-8>
- González-Madina, L., Levrini, P., de Tezanos Pinto, P., Burwood, M., Crisci, C., Cardozo, A., Lagomarsino, J.J., Pacheco, J.P., Fosalba, C., Méndez, G., Garrido, L., Mazzeo, N., 2021b. Blooms of toxic *Raphidiopsis raciborskii* in Laguna del Sauce (Uruguay): environmental drivers and impacts. *Hydrobiologia.* <https://doi.org/10.1007/S10750-021-04783-8>
- Goyenola, G., Kruk, C., Mazzeo, N., Nario, A., Perdomo, C., Piccini, C., Meerhoff, M., 2021. Producción, nutrientes, eutrofización y cianobacterias en Uruguay armando el rompecabezas. *INNOTEC* 22. <https://doi.org/10.26461/22.02>
- Griffiths, D.J., Saker, M.L., 2003. The Palm Island mystery disease 20 years on: A review of research on the cyanotoxin cylindrospermopsin. *Environ. Toxicol.* 18, 78–93. <https://doi.org/10.1002/tox.10103>
- Gugger, M., Molica, R., Le Berre, B., Dufour, P., Bernard, C., Humbert, J.-F., 2005. Genetic diversity of *Cylindrospermopsis* strains (cyanobacteria) isolated from four continents. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1097–1100. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.1097-1100.2005>
- Guy, L., Kultima, J.R., Andersson, S.G.E., 2010. genoPlotR: comparative gene and genome visualization in R. *Bioinformatics* 26, 2334–5. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq413>
- Haakonsson, S., Rodríguez-Gallego, L., Somma, A., Bonilla, S., 2017. Temperature and precipitation shape the distribution of harmful cyanobacteria in subtropical lotic and lentic ecosystems. *Sci. Total Environ.* 609, 1132–1139. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2017.07.067>
- Haande, S., Rohrlack, T., Ballot, A., Røberg, K., Skulberg, R., Beck, M., Wiedner, C., 2008. Genetic characterisation of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) isolates from Africa and Europe. *Harmful Algae* 7, 692–701. <https://doi.org/10.1016/J.HAL.2008.02.010>
- Havens, K.E., 2008. Cyanobacteria blooms: effects on aquatic ecosystems. *Adv. Exp. Med. Biol.* 619, 733–747. https://doi.org/10.1007/978-0-387-75865-7_33
- Hawkins, P.R., Chandrasena, N.R., Jones, G.J., Humpage, A.R., Falconer, I.R., 1997. Isolation and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* from an ornamental lake. *Toxicon* 35, 341–6.
- Herrera, N., Echeverri, F., 2021. Evidence of quorum sensing in cyanobacteria by homoserine lactones: The origin of blooms. *Water (Switzerland)* 13. <https://doi.org/10.3390/W13131831>
- Hillebrand, H., Dürselen, C.D., Kirschtel, D., Pollingher, U., Zohary, T., 1999. BIOVOLUME CALCULATION FOR PELAGIC AND BENTHIC MICROALGAE. *J. Phycol.* 35, 403–424. <https://doi.org/10.1046/J.1529-8817.1999.3520403.X>
- Hoff-Rissetti, C., Dörr, F.A., Schaker, P.D.C., Pinto, E., Werner, V.R., Fiore, M.F., 2013. *Cylindrospermopsis* and Saxitoxin Synthetase Genes in *Cylindrospermopsis raciborskii* Strains from Brazilian Freshwater. *PLoS One* 8, 35–39. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074238>
- Hoffmann, L., Ramos, R.J.T., Guedes, I.A., Costa, P.F., Miguel, C.R.D., Silva, R., 2017. Draft Genome Sequences of Two Brazilian Cyanobacterial Strains of *Cylindrospermopsis raciborskii*: Differences in Membrane Transporters, Saxitoxin Production, and Antioxidant Activities. *Genome Announc.* 5, e00879-17.

- Holland, A., Kinnear, S., 2013. Interpreting the Possible Ecological Role(s) of Cyanotoxins: Compounds for Competitive Advantage and/or Physiological Aide? *Mar. Drugs* 11, 2239–2258. <https://doi.org/10.3390/md11072239>
- Hu, H.-Y., Li, H., Hao, M.-M., Ren, Y.-N., Zhang, M.-K., Liu, R.-Y., Zhang, Y., Li, G., Chen, J.-S., Ning, T.-Y., Kuzyakov, Y., 2021. Nitrogen fixation and crop productivity enhancements co-driven by intercrop root exudates and key rhizosphere bacteria. *J. Appl. Ecol.* 58, 2243–2255. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1365-2664.13964>
- Huisman, J., Matthijs, H.C.P., Visser, P.M. (Petra M., 2005. Harmful cyanobacteria 241.
- Humbert, J.-F., Barbe, V., Latifi, A., Gugger, M., Calteau, A., Coursin, T., Lajus, A., Castelli, V., Oztas, S., Samson, G., 2013. A tribute to disorder in the genome of the bloom-forming freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *PLoS One* 8, e70747.
- Irie, K., Kitagawa, K., Nagura, H., Imai, T., Shimomura, T., Fujiyoshi, Y., 2010. Comparative Study of the Gating Motif and C-type Inactivation in Prokaryotic Voltage-gated Sodium Channels. *J. Biol. Chem.* 285, 3685. <https://doi.org/10.1074/JBC.M109.057455>
- Ito, M., Xu, H., Guffanti, A.A., Wei, Y., Zvi, L., Clapham, D.E., Krulwich, T.A., 2004. The voltage-gated Na⁺ channel NaVBP has a role in motility, chemotaxis, and pH homeostasis of an alkaliphilic *Bacillus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 10566–10571. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402692101>
- 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>
- Ji, X., Verspagen, J.M.H., Van de Waal, D.B., Rost, B., Huisman, J., 2020. Phenotypic plasticity of carbon fixation stimulates cyanobacterial blooms at elevated CO₂. *Sci. Adv.* 6, eaax2926. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax2926>
- Jiang, Y., Shao, J., Wu, X., Xu, Y., Li, R., 2011. Active and silent members in the *mlr* gene cluster of a microcystin-degrading bacterium isolated from Lake Taihu, China. *FEMS Microbiol. Lett.* 322, 108–114. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2011.02337.X>
- Jyoti, P., Shree, M., Joshi, C., Prakash, T., Ray, S.K., Satapathy, S.S., Masakapalli, S.K., 2020. The Entner-Doudoroff and Nonoxidative Pentose Phosphate Pathways Bypass Glycolysis and the Oxidative Pentose Phosphate Pathway in *Ralstonia solanacearum*. *mSystems* 5. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00091-20>
- Kaebernick, M., Dittmann, E., Börner, T., Neilan, B.A., 2002. Multiple alternate transcripts direct the biosynthesis of microcystin, a cyanobacterial nonribosomal peptide. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 449–455. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.2.449-455.2002>
- Kandlikar, G.S., Gold, Z.J., Cowen, M.C., Meyer, R.S., Freise, A.C., Kraft, N.J.B., Moberg-Parker, J., Sprague, J., Kushner, D.J., Curd, E.E., 2018. ranacapa: An R package and Shiny web app to explore environmental DNA data with exploratory statistics and interactive visualizations [version 1; referees: 1 approved, 2 approved with reservations]. <https://doi.org/10.12688/f1000research.16680.1>
- Kanehisa, M., Goto, S., 2000. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* 28, 27–30. <https://doi.org/10.1093/NAR/28.1.27>
- Kaplan, A., Harel, M., Kaplan-Levy, R.N., Hadas, O., Sukenik, A., Dittmann, E., 2012. The languages spoken in the water body (or the biological role of cyanobacterial toxins). *Front. Microbiol.* 3, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00138>
- Kellmann, R., Mihali, T.K., Young, J.J., Pickford, R., Pomati, F., Neilan, B.A., 2008. Biosynthetic intermediate analysis and functional homology reveal a saxitoxin gene cluster in cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4044–4053.

- <https://doi.org/10.1128/AEM.00353-08>
- Klawonn, I., Bonaglia, S., Brüchert, V., Journal, H.P.-T.I., 2015, U., 2015. Aerobic and anaerobic nitrogen transformation processes in N₂-fixing cyanobacterial aggregates. *nature.com*.
- Koishi, R., Xu, H., Ren, D., Navarro, B., Spiller, B.W., Shi, Q., Clapham, D.E., 2004. A superfamily of voltage-gated sodium channels in bacteria. *J. Biol. Chem.* 279, 9532–9538. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313100200>
- Kolmonen, E., Sivonen, K., Ecology, J.R.-A. microbial, 2004, U., 2004. Diversity of cyanobacteria and heterotrophic bacteria in cyanobacterial blooms in Lake Joutikas, Finland. *int-res.com*.
- Kopylova, E., Noé, L., Touzet, H., 2012. SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics* 28, 3211–3217. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTS611>
- Kruk, C., Martínez, A., Escalera, G.M. de la, Trinchin, R., Manta, G., Segura, Á.M., Piccini, C., Brena, B., Fabiano, G., Pérez, M., Gabito, L., Alcántara, I., Yannicelli, B., 2019. Floración excepcional de cianobacterias tóxicas en la costa de Uruguay, verano 2019. *INNOTECH* 0, 36–68. <https://doi.org/10.26461/18.06>
- 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.* 29, 1774–1790. <https://doi.org/10.1111/GCB.16587>
- Krulwich, T.A., Ito, M., Guffanti, A.A., 2001. The Na(+)-dependence of alkaliphily in *Bacillus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1505, 158–168. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(00\)00285-1](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(00)00285-1)
- Kurmayer, R., Christiansen, G., 2009. The genetic basis of toxin production in cyanobacteria. *Freshw. Rev.* 2, 31–50.
- Lagos, N., Onodera, H., Zagatto, P.A., Andrinolo, D., Azevedo, S.M., Oshima, Y., 1999. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the fresh water cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon* 37, 1359–73.
- Lagos, Néstor, Onodera, H., Zagatto, P.A., Andrinolo, D., Azevedo, S.M.F.Q., Oshima, Y., 1999. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon* 37, 1359–1373.
- Lampert, W., Sommer, U., 2007. *Limnoecology: the ecology of lakes and streams*. Oxford university press.
- Ledermann, R., Schulte, C.C.M., Poole, P.S., 2021. How rhizobia adapt to the nodule environment. *J. Bacteriol.* 203, 539–559. https://doi.org/10.1128/JB.00539-20/SUPPL_FILE/JB.00539-20-S0001.PDF
- Lee, J., Zhang, L., 2015. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell* 6, 26–41. <https://doi.org/10.1007/S13238-014-0100-X>
- Lee, S., Goodchild, S.J., Ahern, C.A., 2012. Local anesthetic inhibition of a bacterial sodium channel. *J. Gen. Physiol.* 139, 507–516. <https://doi.org/10.1085/jgp.201210779>
- Lengeler, J.W., Drews, G., Schlegel, H.G., 1999. *Biology of the prokaryotes*.
- Lezcano, M.Á., Quesada, A., El-Shehawey, R., 2018. Seasonal dynamics of microcystin-degrading bacteria and toxic cyanobacterial blooms: Interaction and influence of abiotic factors. *Harmful Algae* 71, 19–28. <https://doi.org/10.1016/J.HAL.2017.11.002>
- Li, Heng, Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., 1000 Genome Project Data Processing Subgroup, 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078–

2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- Li, X., Peng, W., Jia, Y., Lu, L., Fan, W., 2016. Bioremediation of lead contaminated soil with *Rhodobacter sphaeroides*. *Chemosphere* 156, 228–235. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2016.04.098>
- Liao, Y., Smyth, G.K., Shi, W., 2014. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30, 923–930. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTT656>
- Liao, Y., Smyth, G.K., Shi, W., 2013. The Subread aligner: fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote. *Nucleic Acids Res.* 41, e108. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKT214>
- Lisa Demtröder, Y.P.S.S.J.E.B., B.M., 2019. NifA is the master regulator of both nitrogenase systems in *Rhodobacter capsulatus*. *Microbiol. Open*. <https://doi.org/10.1002/mbo3.921>
- Llewellyn, L.E., 2006. Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors. *Nat. Prod. Rep.* 23, 200–222. <https://doi.org/10.1039/b501296c>
- Long, B.M., Jones, G.J., Orr, P.T., 2001. Cellular microcystin content in N-limited *Microcystis aeruginosa* can be predicted from growth rate. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 278–283. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.278-283.2001/ASSET/C1C2BB22-CA29-46F0-AAEE-F1E5A9E6AD52/ASSETS/GRAPHIC/AM0110884005.JPEG>
- Louati, I., Pascault, N., Debroas, D., Bernard, C., Humbert, J.-F., Leloup, J., 2015. Structural diversity of bacterial communities associated with bloom-forming freshwater cyanobacteria differs according to the cyanobacterial genus. *PLoS One* 10, e0140614.
- Lukowski, A.L., Denomme, N., Hinze, M.E., Hall, S., Isom, L.L., Narayan, A.R.H., 2019. Biocatalytic Detoxification of Paralytic Shellfish Toxins. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.9b00123>
- Lyck, S., 2004. Simultaneous changes in cell quotas of microcystin, chlorophyll a, protein and carbohydrate during different growth phases of a batch culture experiment with *Microcystis aeruginosa*. *J. Plankton Res.* 26, 727–736. <https://doi.org/10.1093/PLANKT/FBH071>
- Mangwani, N., Dash, H.R., Chauhan, A., Das, S., 2012. Bacterial quorum sensing: functional features and potential applications in biotechnology. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 22, 215–227. <https://doi.org/10.1159/000341847>
- Martínez De La Escalera, G., 2020. Dinámica y condicionantes ambientales de genotipos tóxicos del complejo *Microcystis aeruginosa* en el río Uruguay y Río de la Plata.
- 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. *Mol. Ecol.* 23, 5791–5802. <https://doi.org/10.1111/MEC.12979>
- McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One* 8, e61217.
- Mihali, T.K., Carmichael, W.W., Neilan, B.A., 2011. A putative gene cluster from a *Lyngbya wollei* bloom that encodes paralytic shellfish toxin biosynthesis. *PLoS One* 6, e14657. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014657>
- Mihali, T.K., Kellmann, R., Muenchhoff, J., Barrow, K.D., Neilan, B.A., 2008. Characterization of the gene cluster responsible for cylindrospermopsin biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 716–722. <https://doi.org/10.1128/AEM.01988-07>
- Mihali, T.K., Kellmann, R., Neilan, B.A., 2009. Characterisation of the paralytic shellfish toxin biosynthesis gene clusters in *Anabaena circinalis* AWQC131C and *Aphanizomenon* sp. NH-5. *BMC Biochem.* 10, 8. <https://doi.org/10.1186/1471-2091-10-8>

- Mohamed Nor, N.H., Te, S.H., Mowe, M.A.D., Gin, K.Y.-H., 2019. Environmental factors influence cylindrospermopsin production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (CR12). *J. Plankton Res.* 41, 114–126. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbz006>
- Moisander, P.H., McClinton, E., Paerl, H.W., 2002. Salinity effects on growth, photosynthetic parameters, and nitrogenase activity in estuarine planktonic cyanobacteria. *Microb. Ecol.* 43, 432–442. <https://doi.org/10.1007/S00248-001-1044-2>
- Moreira, C., Fathalli, A., Vasconcelos, V., Antunes, A., 2015. Phylogeny and biogeography of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Arch. Microbiol.* 197, 47–52. <https://doi.org/10.1007/s00203-014-1052-5>
- Morris, J.J., Johnson, Z.I., Szul, M.J., Keller, M., Zinser, E.R., 2011. Dependence of the cyanobacterium *Prochlorococcus* on hydrogen peroxide scavenging microbes for growth at the ocean's surface. *PLoS One* 6, e16805.
- Moustafa, A., Loram, J.E., Hackett, J.D., Anderson, D.M., Plumley, F.G., Bhattacharya, D., 2009. Origin of saxitoxin biosynthetic genes in cyanobacteria. *PLoS One* 4. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005758>
- Mowe, M.A.D., Mitrovic, S.M., Lim, R.P., Furey, A., Yeo, D.C.J., 2014. Tropical cyanobacterial blooms: a review of prevalence, problem taxa, toxins and influencing environmental factors. *J. Limnol.* 73. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2014.1005>
- Mujakí'c, I.M., Piwosz, K., Koblížek, M., 2022. microorganisms Phylum Gemmatimonadota and Its Role in the Environment. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010151>
- Murray, S.A., Mihali, T.K., Neilan, B.A., 2011. Extraordinary Conservation, Gene Loss, and Positive Selection in the Evolution of an Ancient Neurotoxin. *Mol. Biol. Evol.* 28, 1173–1182. <https://doi.org/10.1093/molbev/msq295>
- Neilan, B.A., Jacobs, D., Del Dot, T., Blackall, L.L., Hawkins, P.R., Cox, P.T., Goodman, A.E., 1997. rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 693–697. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-3-693>
- Omid, A., Esterhuizen-Londt, M., Pflugmacher, S., 2017. Still challenging: the ecological function of the cyanobacterial toxin microcystin – What we know so far. <https://doi.org/10.1080/15569543.2017.1326059> 37, 87–105.
- Ongley, S.E., Pengelly, J.J.L., Neilan, B.A., 2016. Elevated Na⁺ and pH influence the production and transport of saxitoxin in the cyanobacteria *Anabaena circinalis* AWQC131C and *Cylindrospermopsis raciborskii* T3. *Environ. Microbiol.* 18, 427–438. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13048>
- Orr, R.J.S., Stüken, A., Murray, S.A., Jakobsen, K.S., 2013. Evolution and distribution of saxitoxin biosynthesis in dinoflagellates. *Mar. Drugs* 11, 2814–28. <https://doi.org/10.3390/md11082814>
- Oshima, Y., 1995. Chemical and enzymatic transformation of paralytic shellfish toxins in marine organisms. *Harmful Mar. algal* 475–480.
- Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G.D., Olsen, G.J., Davis, J.J., Disz, T., Edwards, R.A., Gerdes, S., Parrello, B., Shukla, M., Vonstein, V., Wattam, A.R., Xia, F., Stevens, R., 2014. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Res.* 42. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKT1226>
- Padisák, J., 1997. *Cylindro que es. Padisak-Cylindrospermopsis1997.pdf*. *Arch. für Hydrobiol. Suppl. Monogr. beitrage*.
- Paerl, H.W., Fulton, R.S., Moisander, P.H., Dyble, J., 2001. Harmful freshwater algal blooms, with an emphasis on cyanobacteria. *ScientificWorldJournal.* 1, 76–113. <https://doi.org/10.1100/tsw.2001.16>
- Paerl, H.W., Gardner, W.S., Havens, K.E., Joyner, A.R., McCarthy, M.J., Newell, S.E., Qin, B., Scott, J.T., 2016. Mitigating cyanobacterial harmful algal blooms in

- aquatic ecosystems impacted by climate change and anthropogenic nutrients. *Harmful Algae* 54, 213–222. <https://doi.org/10.1016/J.HAL.2015.09.009>
- 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/10.1111/J.1758-2229.2008.00004.X>
- Pande, S., Kost, C., 2017. Bacterial unculturability and the formation of intercellular metabolic networks. *Trends Microbiol.* 25, 349–361.
- Panou, M., Zervou, S.K., Kaloudis, T., Hiskia, A., Gkelis, S., 2018. A Greek *Cylindrospermopsis raciborskii* strain: Missing link in tropic invader's phylogeography tale. *Harmful Algae* 80, 96–106. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.10.002>
- Papale, M., Rizzo, C., Giannarelli, S., Caruso, G., Amalfitano, S., Aspholm, P.E., Maimone, G., Miserocchi, S., Rappazzo, A.C., Lo Giudice, A., Azzaro, M., 2022. Benthic Microbial Communities in a Seasonally Ice-Covered Sub-Arctic River (Pasvik River, Norway) Are Shaped by Site-Specific Environmental Conditions. *Microorganisms*. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10051022>
- Paver, S.F., Kent, A.D., 2010. Temporal Patterns in Glycolate-Utilizing Bacterial Community Composition Correlate with Phytoplankton Population Dynamics in Humic Lakes. *Microb. Ecol.* 60, 406–418.
- Payandeh, J., Minor, D.L.J., 2015. Bacterial voltage-gated sodium channels (BacNa(V)s) from the soil, sea, and salt lakes enlighten molecular mechanisms of electrical signaling and pharmacology in the brain and heart. *J. Mol. Biol.* 427, 3–30. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.08.010>
- Pearson, L., Mihali, T., Moffitt, M., Kellmann, R., Neilan, B., 2010. On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin, *Marine Drugs*. <https://doi.org/10.3390/md8051650>
- Pereira, D.A., Giani, A., 2014. Cell density-dependent oligopeptide production in cyanobacterial strains. *FEMS Microbiol. Ecol.* 88, 175–183. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12281>
- Perez, S., Vale, C., Botana, A.M., Alonso, E., Vieytes, M.R., Botana, L.M., 2011. Determination of toxicity equivalent factors for paralytic shellfish toxins by electrophysiological measurements in cultured neurons. *Chem. Res. Toxicol.* 24, 1153–1157. <https://doi.org/10.1021/TX200173D>
- Piccini, Claudia, Aubriot, L., Fabre, A., Amaral, V., González-Piana, M., Giani, A., Figueredo, C.C., Vidal, L., Kruk, C., Bonilla, S., 2011. Genetic and eco-physiological differences of South American *Cylindrospermopsis raciborskii* isolates support the hypothesis of multiple ecotypes. *Harmful Algae* 10, 644–653. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.04.016>
- Piccini, C., Fabre, A., Lacerot, G., Bonilla, S., 2015. Combining immunolabeling and catalyzed reporter deposition to detect intracellular saxitoxin in a cyanobacterium. *J. Microbiol. Methods* 117, 18–21. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.07.004>
- Piccini, C., Rigamonti, N., D Alessandro, B., Aubriot, L., Bonilla, S., 2011. *cyrA* gene detection in *C. raciborskii* strains that not produce cylindrospermopsin. Unpubl. (Genbank direct submission).
- Pomati, F., Burns, B.P., Neilan, B.A., 2004a. Use of ion-channel modulating agents to study cyanobacterial Na⁺-K⁺ fluxes. *Biol. Proced. Online* 6, 137–143. <https://doi.org/10.1251/bpo82>
- Pomati, F., Rossetti, C., Manarolla, G., Burns, B.P., Neilan, B.A., 2004b. Interactions between intracellular Na⁺ levels and saxitoxin production in *Cylindrospermopsis raciborskii* T3. *Microbiology* 150, 455–461. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26350-0>
- Pomati, F., Sacchi, S., Rossetti, C., Giovannardi, S., Onodera, H., Oshima, Y., Neilan, B.A., 2000. THE FRESHWATER CYANOBACTERIUM *PLANKTOTHRIX* SP. FP1: MOLECULAR IDENTIFICATION AND DETECTION OF PARALYTIC SHELLFISH

- POISONING TOXINS. *J. Phycol.* 36, 553–562. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2000.99181.x>
- Pouria, S., De Andrade, A., Barbosa, J., Cavalcanti, R.L., Barreto, V.T.S., Ward, C.J., Preiser, W., Poon, G.K., Neild, G.H., Codd, G.A., 1998. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *Lancet* 352, 21–26. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)12285-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)12285-1)
- Prosser, J., 2012. Prosser JI.. Ecosystem processes and interactions in a morass of diversity. *FEMS Microbiol Ecol* 81: 507-519. *FEMS Microbiol. Ecol.* 81, 507–519. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01435.x>
- Puxty, R.J., Evans, D.J., Millard, A.D., Scanlan, D.J., 2018. Energy limitation of cyanophage development: implications for marine carbon cycling. *ISME J.* 12, 1273–1286. <https://doi.org/10.1038/s41396-017-0043-3>
- Ramana, V.V., Sasikala, C., Ramana, C. V., 2008. *Rhodobacter maris* sp. nov., a phototrophic alphaproteobacterium isolated from a marine habitat of India. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 1719–1722. <https://doi.org/10.1099/IJS.0.65638-0/CITE/REFWORKS>
- Rambo, I.M., Dombrowski, N., Constant, L., Erdner, D., Baker, B.J., 2020. Metabolic relationships of uncultured bacteria associated with the microalgae *Gambierdiscus*. *Environ. Microbiol.* 22, 1764–1783. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14878>
- Raposo, M., Gomes, M.T., Botelho, M.J., Rudnitskaya, A., 2020. Paralytic shellfish toxins (PST)-transforming enzymes: A review. *Toxins (Basel)*. 12. <https://doi.org/10.3390/toxins12050344>
- Raposo, M.I.C., Gomes, M.T.S.R., Botelho, M.J., Rudnitskaya, A., 2020. Paralytic Shellfish Toxins (PST)-Transforming Enzymes: A Review. *Toxins (Basel)*. 12. <https://doi.org/10.3390/toxins12050344>
- Recknagel, F., Orr, P.T., Cao, H., 2014. Inductive reasoning and forecasting of population dynamics of *Cylindrospermopsis raciborskii* in three sub-tropical reservoirs by evolutionary computation. *Harmful Algae* 31, 26–34. <https://doi.org/10.1016/J.HAL.2013.09.004>
- Ren, D., Navarro, B., Xu, H., Yue, L., Shi, Q., Clapham, D.E., 2001. A prokaryotic voltage-gated sodium channel. *Science* 294, 2372–2375. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1065635>
- Rigamonti, N., Aubriot, L., Martigani, F., Bonilla, S., Piccini, C., 2018. Effect of nutrient availability on cylindrospermopsin gene expression and toxin production in *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Aquat. Microb. Ecol.* 82, 105–110. <https://doi.org/10.3354/ame01877>
- Rilling, J.I., Acuña, J.J., Sadowsky, M.J., Jorquera, M.A., 2018. Putative Nitrogen-Fixing Bacteria Associated With the Rhizosphere and Root Endosphere of Wheat Plants Grown in an Andisol From Southern Chile. *Front. Microbiol.* 9, 2710. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02710>
- Rodriguez-R, L.M., Konstantinidis, K.T., 2016. The enveomics collection: a toolbox for specialized analyses of microbial genomes and metagenomes. <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.1900v1>
- Rosenberg, E., Zilber-Rosenberg, I., 2018. The hologenome concept of evolution after 10 years. *Microbiome* 2018 61 6, 1–14. <https://doi.org/10.1186/S40168-018-0457-9>
- Rosenberg, E., Zilber-Rosenberg, I., 2013. The hologenome concept: Human, animal and plant microbiota. *Hologenome Concept Human, Anim. Plant Microbiota* 1–178. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-04241-1>
- Rossi, F., De Philippis, R., 2015. Role of cyanobacterial exopolysaccharides in phototrophic biofilms and in complex microbial mats. *Life* 5, 1218–1238.
- Rourke, W.A., Murphy, C.J., Pitcher, G., van de Riet, J.M., Burns, B.G., Thomas, K.M., Quilliam, M.A., 2008. Rapid postcolumn methodology for determination of paralytic shellfish toxins in shellfish tissue. *J. AOAC Int.* 91, 589–597.

- Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M.-A., Barrell, B., 2000. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* 16, 944–945. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/16.10.944>
- Rzyski, P., Brygider, A., Kokociński, M., 2017. On the occurrence and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Poland. *Limnol. Rev.* 17, 23–29. <https://doi.org/10.1515/limre-2017-0003>
- Saker, M., Moreira, C., Martins, J., Neilan, B., Vasconcelos, V.M., 2009. DNA profiling of complex bacterial populations: toxic cyanobacterial blooms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 237–252. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2180-8>
- Saker, M.L., 2014. Cyanobacterial blooms in tropical north Queensland water bodies. Ph.D. Thesis James Cook University, Townsville, Australia.
- Saker, M.L., Nogueira, I.C.G., Vasconcelos, V.M., Neilan, B.A., Eaglesham, G.K., Pereira, P., 2003. First report and toxicological assessment of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* from Portuguese freshwaters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 55, 243–250. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(02\)00043-X](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(02)00043-X)
- Sánchez-Baracaldo, P., Ridgwell, A., Raven, J.A., 2014. A neoproterozoic transition in the marine nitrogen cycle. *Curr. Biol.* 24, 652–7. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.01.041>
- Scasso, F., Mazzeo, N., Gorga, J., Kruk, C., Lacerot, G., Clemente, J., Fabin, D., Bonilla, S., 2001. Limnological changes in a sub-tropical shallow hypertrophic lake during its restoration: two years of a whole-lake experiment. *Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.* 11, 31–44. <https://doi.org/10.1002/AQC.420>
- Schliep, K.P., 2011. phangorn: phylogenetic analysis in R. *Bioinforma. Appl. NOTE* 27, 592–593. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq706>
- Schopf, J.W., 1994. Disparate rates, differing fates: tempo and mode of evolution changed from the Precambrian to the Phanerozoic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 6735. <https://doi.org/10.1073/PNAS.91.15.6735>
- 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. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.65>
- Shen, H., Li, Z., Jiang, Y., Pan, X., Wu, J., Cristofori-Armstrong, B., Smith, J.J., Chin, Y.K.Y., Lei, J., Zhou, Q., King, G.F., Yan, N., 2018. Structural basis for the modulation of voltage-gated sodium channels by animal toxins. *Science* 362. <https://doi.org/10.1126/science.aau2596>
- Shi, J. qiong, Ou-yang, T., Yang, S. qi, Zhao, L., Ji, L. lu, Wu, Z. xing, 2022. Transcriptomic responses to phosphorus in an invasive cyanobacterium, *Raphidiopsis raciborskii*: Implications for nutrient management. *Harmful Algae* 111. <https://doi.org/10.1016/J.HAL.2021.102150>
- 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. *Environ. Microbiol.* 24, 4931–4945. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16133>
- Shi, L., Cai, Y., Kong, F., Yu, Y., 2011. Changes in abundance and community structure of bacteria associated with buoyant *Microcystis* colonies during the decline of cyanobacterial bloom (autumn-winter transition). *Ann. Limnol.* 47, 355–362. <https://doi.org/10.1051/LIMN/2011047>
- Shia, L., Cai, Y., Wang, X., Li, P., Yu, Y., Kong, F., 2010. Community structure of bacteria associated with microcystis colonies from cyanobacterial blooms. *J. Freshw. Ecol.* 25, 193–203. <https://doi.org/10.1080/02705060.2010.9665068>
- Shimizu, Y., 2003. Microalgal metabolites. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 236–43.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J.D., Higgins, D.G., 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7. <https://doi.org/10.1038/MSB.2011.75>
- Simpson, J.T., Wong, K., Jackman, S.D., Schein, J.E., Jones, S.J.M., Birol, I., 2009.

- ABYSS: A parallel assembler for short read sequence data. *Genome Res.* 19, 1117–1123. <https://doi.org/10.1101/gr.089532.108>
- Sinha, R., Pearson, L.A., Davis, T.W., Muenchhoff, J., Pratama, R., Jex, A., Burford, M.A., Neilan, B.A., 2014. Comparative genomics of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains with differential toxicities. *BMC Genomics* 15, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-83>
- Smith, E.A., Mackintosh, F.H., Grant, F., 2002. Sodium channel blocking (SCB) activity and transformation of paralytic shellfish toxins (PST) by dinoflagellate-associated bacteria. *Aquat. Microb. Ecol.* 29, 1–9.
- Soares, M.C.S., Lüring, M., Huszar, V.L.M., 2013. Growth and temperature-related phenotypic plasticity in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Phycol. Res.* 61, 61–67. <https://doi.org/10.1111/pre.12001>
- Somma, A., 2014. El papel de la luz y la temperatura en la dinámica de cianobacterias en un lago de uso recreativo. Tesis de grado. Facultad de Ciencias, Limnología.
- Soto-Liebe, K., Méndez, M.A., Fuenzalida, L., Krock, B., Cembella, A., Vásquez, M., 2012. PSP toxin release from the cyanobacterium *Raphidiopsis brookii* D9 (Nostocales) can be induced by sodium and potassium ions. *Toxicon* 60, 1324–1334. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.001>
- Soto-Liebe, K., Murillo, A.A., Krock, B., Stucken, K., Fuentes-Valdés, J.J., Trefault, N., Cembella, A., Vásquez, M., 2010. Reassessment of the toxin profile of *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 and function of putative sulfotransferases in synthesis of sulfated and sulfonated PSP toxins. *Toxicon* 56, 1350–1361. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.07.022>
- Sournia, A., 1978. *Phytoplankton manual*. Unesco, Paris.
- Spring, S., Bunk, B., Spröer, C., Schumann, P., Rohde, M., Tindall, B.J., Klenk, H.-P., 2016. Characterization of the first cultured representative of Verrucomicrobia subdivision 5 indicates the proposal of a novel phylum. *ISME J.* 10, 2801–2816. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.84>
- Stamatakis, A., 2014. RAXML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30, 1312–1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
- Stanier, R.Y., Kunisawa, R., Mandel, M., Cohen-Bazire, G., 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriol. Rev.* 35, 171–205.
- Steenhauer, L.M., Wierenga, J., Carreira, C., Limpens, R.W.A.L., Koster, A.J., Pollard, P.C., Brussaard, C.P.D., 2016. Isolation of cyanophage CrV infecting *Cylindrospermopsis raciborskii* and the influence of temperature and irradiance on CrV proliferation. *Aquat. Microb. Ecol.* 78, 11–23. <https://doi.org/10.3354/AME01800>
- Stucken, K., John, U., Cembella, A., Murillo, A.A., Soto-Liebe, K., Fuentes-Valdés, J.J., Friedel, M., Plominsky, A.M., Vásquez, M., Glöckner, G., 2010. The Smallest Known Genomes of Multicellular and Toxic Cyanobacteria: Comparison, Minimal Gene Sets for Linked Traits and the Evolutionary Implications. *PLoS One* 5, e9235. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009235>
- Stucken, K., John, U., Cembella, A., Soto-Liebe, K., Vásquez, M., 2014a. Impact of nitrogen sources on gene expression and toxin production in the diazotroph *Cylindrospermopsis raciborskii* CS-505 and non-diazotroph *Raphidiopsis brookii* D9. *Toxins (Basel)* 6, 1896–1915. <https://doi.org/10.3390/toxins6061896>
- Stucken, K., John, U., Cembella, A., Soto-Liebe, K., Vásquez, M., Wegener, A., De, U.J., Cembella@awi, A., De (A.C., 2014b. Impact of Nitrogen Sources on Gene Expression and Toxin Production in the Diazotroph *Cylindrospermopsis raciborskii* CS-505 and Non-Diazotroph *Raphidiopsis brookii* D9. *Toxins* 2014, Vol. 6, Pages 1896–1915 6, 1896–1915. <https://doi.org/10.3390/TOXINS6061896>
- Suresh, G., Lodha, T.D., Indu, B., Sasikala, C., Ramana, C. V., 2019. Taxogenomics resolves conflict in the genus *Rhodobacter*: A two and half decades pending

- thought to reclassify the genus *rhodobacter*. *Front. Microbiol.* 10, 2480. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.02480/BIBTEX>
- Tatusova, T., Ciufo, S., Fedorov, B., O'Neill, K., Tolstoy, I., 2014. RefSeq microbial genomes database: new representation and annotation strategy. *Nucleic Acids Res.* 42. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKT1274>
- Thamizhseran, N., Shendye, G. V., 2022. Occurrence of two endophytic associative nitrogen-fixing *Caulobacter* spp., from three non-nodulating endemic legumes based on *nifH* gene analysis. *Biotechnology. J. Appl. Biol.* <https://doi.org/https://doi.org/10.7324/JABB.2023.110123>
- Theis, K.R., Dheilly, N.M., Klassen, J.L., Brucker, R.M., Baines, J.F., Bosch, T.C.G., Cryan, J.F., Gilbert, S.F., Goodnight, C.J., Lloyd, E.A., Sapp, J., Vandenkoornhuysen, P., Zilber-Rosenberg, I., Rosenberg, E., Bordenstein, S.R., 2016. Getting the Hologenome Concept Right: an Eco-Evolutionary Framework for Hosts and Their Microbiomes. *mSystems* 1. <https://doi.org/10.1128/MSYSTEMS.00028-16>
- Tian, S., Tian, Z., Yang, H., Yang, M., Zhang, Y., 2017. Detection of Viable Bacteria during Sludge Ozonation by the Combination of ATP Assay with PMA-Miseq Sequencing. *Water* . <https://doi.org/10.3390/w9030166>
- Tomitani, A., Knoll, A.H., Cavanaugh, C.M., Ohno, T., 2006. The evolutionary diversification of cyanobacteria: molecular-phylogenetic and paleontological perspectives. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 5442–5447. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600999103>
- Valério, E., Pereira, P., Saker, M.L., Franca, S., Tenreiro, R., 2005. Molecular characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains isolated from Portuguese freshwaters. *Harmful Algae* 4, 1044–1052. <https://doi.org/10.1016/J.HAL.2005.03.002>
- van Apeldoorn, M.E., van Egmond, H.P., Speijers, G.J.A., Bakker, G.J.I., 2007. Toxins of cyanobacteria. *Mol. Nutr. Food Res.* 51, 7–60. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200600185>
- Vico, P., Aubriot, L., Martigani, F., Rigamonti, N., Bonilla, S., Piccini, C., 2016. Influence of nitrogen availability on the expression of genes involved in the biosynthesis of saxitoxin and analogs in *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Harmful Algae* 56, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.04.008>
- 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.* 106824.
- Vidal, L., Kruk, C., 2008. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) extends its distribution to Latitude 34° 53' S: taxonomical and ecological features in Uruguayan eutrophic lakes. *Panam. J. Aquat. Sci.*
- Villaverde, S., 2004. Recent developments on biological nutrient removal processes for wastewater treatment. *Re/Views Environ. Sci. Bio/Technology* 3, 171–183.
- Vining, L.C., 1992. Secondary metabolism, inventive evolution and biochemical diversity--a review. *Gene* 115, 135–140. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90551-y](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90551-y)
- Waditee, R., Hibino, T., Tanaka, Y., Nakamura, T., Incharoensakdi, A., Takabe, T., 2001. Halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* contains an Na(+)/H(+) antiporter, homologous to eukaryotic ones, with novel ion specificity affected by C-terminal tail. *J. Biol. Chem.* 276, 36931–36938. <https://doi.org/10.1074/JBC.M103650200>
- Wang, D.-Z., Zhang, S.-F., Zhang, Y., Lin, L., 2016. Paralytic shellfish toxin biosynthesis in cyanobacteria and dinoflagellates: A molecular overview. *J. Proteomics* 135, 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.08.008>
- Waters, C.M., Bassler, B.L., 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 319–346.

- <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.CELLBIO.21.012704.131001>
- Waters, J.M., Craw, D., 2006. Goodbye Gondwana? New Zealand Biogeography, Geology, and the Problem of Circularity. *Syst. Biol.* 55, 351–356. <https://doi.org/10.1080/10635150600681659>
- Wegner, C.-E., Richter-Heitmann, T., Klindworth, A., Klockow, C., Richter, M., Achstetter, T., Glöckner, F.O., Harder, J., 2013. Expression of sulfatases in *Rhodopirellula baltica* and the diversity of sulfatases in the genus *Rhodopirellula*. *Mar. Genomics* 9, 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2012.12.001>
- Westreich, S.T., Treiber, M.L., Mills, D.A., Korf, I., Lemay, D.G., 2018. SAMSA2: A standalone metatranscriptome analysis pipeline. *BMC Bioinformatics* 19, 1–11. <https://doi.org/10.1186/S12859-018-2189-Z/TABLES/2>
- Whitton, B.A., Potts, M., 2000. The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space (reviewed by T. Bailey Watts). *Divers. Distrib.* 7.
- Wiese, M., D'Agostino, P.M., Mihali, T.K., Moffitt, M.C., Neilan, B.A., 2010. Neurotoxic Alkaloids: Saxitoxin and Its Analogs. *Mar. Drugs* 8, 2185–2211. <https://doi.org/10.3390/md8072185>
- Willis, A., Chuang, A.W., Woodhouse, J.N., Neilan, B.A., Burford, M.A., 2016. Intraspecific variation in growth, morphology and toxin quotas for the cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Toxicon* 119, 307–310. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2016.07.005>
- Willis, A., Woodhouse, J.N., Ongley, S.E., Jex, A.R., Burford, M.A., Neilan, B.A., 2018. Genome variation in nine co-occurring toxic *Cylindrospermopsis raciborskii* strains. *Harmful Algae* 73, 157–166.
- Wood, S.A., Dietrich, D.R., Craig Cary, S., Hamilton, D.P., 2012. Increasing microcystis cell density enhances microcystin synthesis: A mesocosm study. *Int. Waters* 2, 17–22. <https://doi.org/10.5268/IW-2.1.424>
- Wood, S.A., Pochon, X., Luttringer-Plu, L., Vant, B.N., Hamilton, D.P., 2014. Recent invader or indicator of environmental change? A phylogenetic and ecological study of *Cylindrospermopsis raciborskii* in New Zealand. *Harmful Algae* 39, 64–74. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.06.013>
- Wright, E.S., 2015. DECIPHER: harnessing local sequence context to improve protein multiple sequence alignment. *BMC Bioinformatics* 16, 322. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0749-z>
- 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. *Aquat. Ecol.* 53, 465–481.
- Xie, M., Ren, M., Yang, C., Yi, H., Li, Z., Li, T., Zhao, J., 2016. Metagenomic analysis reveals symbiotic relationship among bacteria in microcystis-dominated community. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.00056/FULL>
- Yang, S., Gou, Y., Song, Y., Li, P., 2018. Enhanced anoxic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a highly contaminated aged soil using nitrate and soil microbes. *Environ. Earth Sci.* 77, 432. <https://doi.org/10.1007/s12665-018-7629-6>
- Yang, Y., Wang, N., Guo, X., Zhang, Y., Ye, B., 2017. Comparative analysis of bacterial community structure in the rhizosphere of maize by high-throughput pyrosequencing. *PLoS One* 12, e0178425. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178425>
- Yilmaz, M., Philips, E.J., 2011. Diversity of and selection acting on *cylindrospermopsin* *cyrB* gene adenylation domain sequences in Florida. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2502–2507. <https://doi.org/10.1128/AEM.02252-10>
- Yilmaz, M., Philips, E.J., Szabo, N.J., Badylak, S., 2008. A comparative study of Florida strains of *Cylindrospermopsis* and *Aphanizomenon* for *cylindrospermopsin* production. *Toxicon* 51, 130–9. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.08.013>
- Zhai, C., Zhang, P., Shen, F., Zhou, C., Liu, C., 2012. Does *Microcystis aeruginosa*

- have quorum sensing? FEMS Microbiol. Lett. 336, 38–44.
<https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2012.02650.X>
- Zhou, J., Bruns, M.A., Tiedje, J.M., 1996. DNA Recovery from Soils of Diverse Composition, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY.
- Zhou, J., Lyu, Y., Richlen, M.L., Anderson, D.M., Cai, Z., 2016. Quorum Sensing Is a Language of Chemical Signals and Plays an Ecological Role in Algal-Bacterial Interactions. <https://doi.org/10.1080/07352689.2016.1172461> 35, 81–105.
<https://doi.org/10.1080/07352689.2016.1172461>
- Zhu, L., Zuo, J., Song, L., Sciences, N.G.-J. of E., 2016, undefined, 2015. Microcystin-degrading bacteria affect mcyD expression and microcystin synthesis in Microcystis spp. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2015.06.016>
- Zilius, M., Bonaglia, S., Broman, E., Chiozzini, V.G., Samuiloviene, A., Nascimento, F.J.A., Cardini, U., Bartoli, M., 2020. N₂ fixation dominates nitrogen cycling in a mangrove fiddler crab holobiont. Sci. Rep. 10, 13966.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-70834-0>
- Zurawell, R.W., Chen, H., Burke, J.M., Prepas, E.E., 2011. Hepatotoxic Cyanobacteria: A Review of the Biological Importance of Microcystins in Freshwater Environments. <http://dx.doi.org/10.1080/10937400590889412> 8, 1–37.
<https://doi.org/10.1080/10937400590889412>

Apéndice

Apéndice 1:

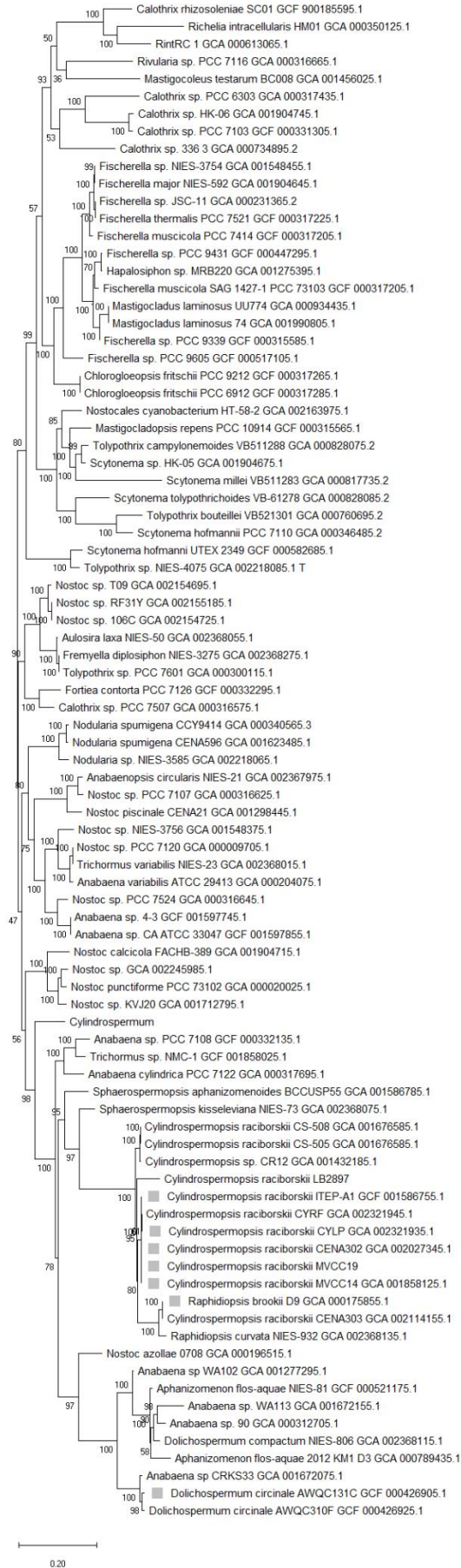


Figura 1.1 Filogenia de cianobacterias pertenecientes al orden Nostocales basada en 24 proteínas ortólogas altamente conservadas. La filogenia se basó en 89 genomas utilizando al menos una especie del orden Nostocales.

Tabla 1.1. Estudio basado en la literatura sobre la toxicidad de *R. raciborskii* en América del Norte y del Sur.

Lago N°	Latitud	Longitud	Cuerpos de agua	País	Tipo de datos	Referencias
1	37.9345	57.7338	Los Padres	Argentina	cualitativo	(Aguilera et al., 2018)
2	34.8833	54.3333	Blanca	Uruguay	cuantitativo	(Vidal and Kruk, 2008; Claudia Piccini et al., 2011; Piccini et al., 2013)
3	34.8472	56.0408	Javier	Uruguay	cuantitativo	(Vidal and Kruk, 2008; Gonzalez et al., 2009; Fabre et al., 2010; Claudia Piccini et al., 2011; Piccini et al., 2013)
4	34.845	57.9569	Los Patos	Argentina	cualitativo	(Aguilera et al., 2018)
5	32.0738	52.1656	Biguas	Brasil	cualitativo	(COLVARA, 2012)
6	30.8206	51.8477	Duro dam (Camaqua)	Brasil	cualitativo	(Yunes et al., 2003)
7	29.9199	51.2432	Rio Cai	Brasil	cualitativo	(Kertész, 1999)
8	29.9199	51.2432	Rio dos Sinos	Brasil	cualitativo	(Kertész, 1999)
9	29.8869	51.1583	ULBRA, lago artificial central	Brasil	cualitativo	(Hoff-Rissetti et al., 2013; splink, 2019) ident: Werner, V.R.; Cabezedo, M.M.; Silva, L.M. da e Neuhaus, E.B., collect: Silva, L.M. & Neuhaus, E.B. 2017-11-30 12:00:59 PM
10	29.7178	57.0777	Arroyo Yatay	Argentina	cualitativo	(Otaño and Bogarín, 2014)
11	29.4655	-51.971	Parque Profesor Theobaldo Dick	Brasil	cualitativo	(Hepp, 2009; Hoff-Rissetti et al., 2013)
12	29.3144	50.6756	Salto-Sao Francisco de Paula	Brasil	cualitativo	(Yunes et al., 2003)
13	29.1912	51.4454	Farroupilha	Brasil	cualitativo	(COLVARA, 2012)
14	28.5197	59.0228	Toro	Argentina	cuantitativo	(Baron-Sola et al., 2012; O'Farrell et al., 2019)
15	27.7321	48.5253	Peri	Brasil	cualitativo	(Extreme morphology of Raphidiopsis raciborskii (Nostocales, Cyanobacteria) in the Lagoa do Peri, a freshwater coastal lagoon, Santa Catarina, Brasil - ScienceBase-Catalog; Grellman, 2006; Silveira, 2013; Tonetta et al., 2013; Fuentes, 2015; Miotto et al., 2017)
16	25.7933	60.5945	Rio Salado	Argentina	cuantitativo	(Otaño, 2009; Otaño et al., 2012; O'Farrell et al., 2019)

17	- 25.4142	- 49.1099	Irai	Brasil	cuantitativo	(VENTURA et al., 2003; splink, 2019) ,ident: Wojciechowski, J., collect: Calado, S.M.
18	- 25.095	- 50.1619	Represa de Alagados	Brasil	cualitativo	(Yunes et al., 2003; Clemente, 2009; Gomes, 2011; splink, 2019) ident: Wojciechowski, J., collect: Calado, S.M.
19	- 25.028	- 50.1024	Pitangui	Brasil	cualitativo	(Yunes et al., 2003)
20	- 23.8447	- 46.6569	Billings	Brasil	cualitativo	(De Souza et al., 1998; Lagos et al., 1999; Dos Anjos et al., 2006; Gemelgo et al., 2009; Moschini-Carlos et al., 2009; Silva-stenico et al., 2011; Bittencourt-Oliveira et al., 2012; Piccin-Santos and do Carmo Bittencourt-Oliveira, 2012; Hoff-Risetti et al., 2013; splink, 2019) ,ident: L.L.Rodrigues & C.L.Sant'Anna, collect: Cetesb, ident: Marisa Sawatani & Andréa Tucci, collect: Cetesb
21	- 23.65	- 46.6167	Lago das Garças	Brasil	cualitativo	(Tucci and Sant'Anna, 2003; Crossetti and Bicudo, 2008; Fonseca and Bicudo, 2008; Silva-stenico et al., 2011; splink, 2019) ident: A. Tucci & C.L.Sant'Anna, collect: A. Tucci & C. L. Sant'Anna
22	- 23.5792	- 46.2751	Taiapuêba	Brasil	cualitativo	(Yunes et al., 2003; splink, 2019) ident: C. L. Sant'Anna, collect: C. L. Sant'Anna
23	- 22.7351	- 46.7809	Private farm Amparo city	Brasil	cualitativo	(Lagos et al., 1999)
24	-22.5	-44.58	Funil	Brasil	cuantitativo	(Soares et al., 2009, 2010; Hoffmann et al., 2017)
25	- 21.9333	- 43.3667	Chapeu D'Uvas	Brasil	semicuantitativo	(Soares et al., 2007)
26	- 20.758	- 42.8743	Univ. Fed. Vicoso lagoon	Brasil	cualitativo	(Silva-stenico et al., 2011)
27	- 20.2736	- 40.4784	Represa Duas Bocas	Brasil	cualitativo	(Fernandes, 2003; Delazari-Barroso, 2007; Delazari-Barroso et al., 2007; Jiang et al., 2014; splink, 2019) ident: Alessandra Delazzari-Barroso, collect: Alessandra Delazzari-Barroso
28	- 20.1367	- 44.2717	Rio Manso (BH)	Brasil	cualitativo	(Jardim et al., 2000)
29	- 19.6333	- 45.8833	Lagoa Santa	Brasil	cuantitativa	(Viana, 2006; Figueredo and Giani, 2009)
30	- 19.6291	- 43.9872	Confin (lagoas urbanas)	Brasil	cualitativo	(Jardim et al., 1999, 2000)
31	- 16.1937	- 41.5282	Medina	Brasil	cualitativo	(Jardim et al., 2000; JARDIM and VIANA, 2003)
32	- 15.9781	- 41.2848	Pedra azul	Brasil	cualitativo	(Jardim et al., 2000)

33	- 15.7875	- 47.8174	Paranoa	Brasil	cualitativo	(Hoffmann et al., 2017)
34	- 15.3101	- 41.9364	Ninheira	Brasil	cualitativo	(JARDIM and VIANA, 2003)
35	- 8.94639	- 36.4925	Mundau	Brasil	cualitativo	(Moura et al., 2007, 2015; Dantas et al., 2008, 2010; Bittencourt-Oliveira, 2011; Piccin-Santos and do Carmo Bittencourt-Oliveira, 2012; Bittencourt-Oliveira et al., 2012; da Silva et al., 2013; BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2014; Lira et al., 2014; Lorenzi et al., 2018; splink, 2019) ident: , collect: N.K.C.V. Aragão; A.N. Moura
36	- 8.61144	- 36.9066	Ingazeira	Brasil	cuantitativa	(Bouvy et al., 1999, 2000; Huszar et al., 2000; BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2014; Lorenzi et al., 2018; splink, 2019) ident: , collect: N.K.C.V. Aragão; A.N. Moura
37	- 8.55778	- 36.9875	Arcoverde	Brasil	cualitativo	(Bouvy et al., 2000; Bortoli, 2011; Dantas et al., 2011; Bittencourt-Oliveira et al., 2012; BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2014; Lorenzi et al., 2018; splink, 2019) , ident: , collect: N.K.C.V. Aragão; A.N. Moura
38	- 8.45886	- 36.776	Alagoinha	Brasil	cuantitativa	(BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2014; Lorenzi et al., 2018; splink, 2019) ident: , collect: N.K.C.V. Aragão; A.N. Moura
39	- 8.05978	- 34.9504	ITEP lagoon	Brasil	cuantitativo	(Bortoli, 2011)
40	- 8.04219	- 35.1963	Tapacurá	Brasil	cuantitativo	(Bouvy et al., 2003; Gunkel et al., 2003; Molica et al., 2005; Andrade et al., 2009; BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2014; Lorenzi et al., 2018; splink, 2019) ident: , collect: N.K.C.V. Aragão; A.N. Moura
41	- 8.0253	- 36.142	Tabocas	Brasil	cualitativo	(Bressan et al., 1999; Carmichael et al., 2001; Molica et al., 2002; Bortoli, 2011)c
42	- 7.96798	- 35.7442	Jucazinho	Brasil	semicuantitativo	(Bouvy et al., 2000; Bortoli, 2011; do Nascimento Moura et al., 2012; BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2014; Oliveira et al., 2015; Lorenzi et al., 2018; splink, 2019) ident: , collect: N.K.C.V. Aragão; A.N. Moura
43	- 7.90417	- 35.3408	Carpina	Brasil	cualitativo	(Aragão et al., 2007; Lira et al., 2011; Moura et al., 2011; Bittencourt-Oliveira et al., 2012; Piccin-Santos and do Carmo Bittencourt-

						Oliveira, 2012; BITTENCOURT- OLIVEIRA et al., 2014; Oliveira et al., 2015; Lorenzi et al., 2018; splink, 2019) ident: , collect: N.K.C.V. Aragão; A.N. Moura
44	- 5.67354	- 36.8868	Armando Ribeiro Gonçalves	Brasil	cuantitativ o	(Panosso et al., 2003; Costa et al., 2006; Câmara et al., 2015; Fonseca et al., 2015)
45	- 3.7709	- 38.9642	Sítios Novos	Brasil	cualitativo	(Lopes et al., 2015)
46	18.4	- 95.0667	Catemaco	Mexico	semicuan titativo	(Vázquez Galicia, 1998; Tavera and Castillo, 2000; Komárková and Tavera, 2003; Berry and Lind, 2010; Berry et al., 2012; Lind et al., 2016)
47	19.44 21	- 103.684	Epazote	Mexico	cualitativo	(Bernard et al., 2003)
48	19.45	- 103.698	Jabali	Mexico	cualitativo	(Bernard et al., 2003)
49	27.12 583	- 80.8464	Lake Okeechobee	USA	cualitativo	(Williams et al., 2001; C. Piccini et al., 2011; Amaral et al., 2014; MADHUSHANKHA et al., 2016)
50	28.01 111	- 82.4931	Egypt Lake	USA	cualitativo	(Williams et al., 2001; Yilmaz, 2007; Yilmaz et al., 2008a)
51	28.05 413	- 82.4864	Lake Carroll	USA	cualitativo	(Yilmaz, 2007; Yilmaz et al., 2008a)
52	28.12 656	- 82.4718	Lake Brant	USA	cualitativo	(Yilmaz, 2007; Yilmaz et al., 2008a)
53	28.13 811	- 82.7249	Lake Tarpon	USA	cualitativo	(Yilmaz et al., 2008a)
54	28.14 532	- 82.4907	Little Lake Wilson (LLW)	USA	cualitativo	(Yilmaz, 2007)
55	28.14 661	- 82.4928	Lake Wilson	USA	cualitativo	(Yilmaz, 2007)
56	28.78 333	- 81.6833	Lake Dora	USA	cualitativo	(Chapman and Schelske, 1997; Williams et al., 2001; Yilmaz, 2007; Yilmaz et al., 2008b)
57	28.84 56	- 81.8472	Lake Griffin	USA	cuantitativ o	(Chapman and Schelske, 1997; Williams et al., 2001; Dobberfuhl, 2003; Yilmaz, 2007; Yilmaz et al., 2008a; USEPA, 2009, 2016)
58	29.00 833	- 81.3833	Saint John River (Deland)	USA	cualitativo	(Williams et al., 2001; Yilmaz, 2007; Yilmaz et al., 2008a)
59	29.30 833	- 81.5333	Lake George	USA	cualitativo	(Williams et al., 2001; Yilmaz, 2007)
60	29.48 333	- 81.5167	Cresce nt Lake	USA	cualitativo	(Williams et al., 2001; Yilmaz, 2007)
61	38.53 841	-88.594	Sam Dale	USA	cualitativo	(Holland et al., 2006)
62	39.25 666	- 86.3729	Lake Lemon	USA	cuantitativ o	(Clark and Jones, 2006; Yilmaz et al., 2008a; USEPA, 2016) NLA2012
63	39.40 815	-89.909	Otter	USA	cualitativo	(Holland et al., 2006)

Tabla 1.2. Genomas de cianobacterias analizados en este estudio.

Strain Name [1]	Accession Code	Closely related to <i>C. raciborskii</i> [2]
<i>Anabaena cylindrica</i> PCC7122	GCA 000317695.1 ASM31769v1	
<i>Anabaena</i> sp.	GCF 001597745.1 ASM159774v1	
<i>Anabaena</i> sp. 90 npb	GCA 000312705.1 ASM31270v1	
<i>Anabaena</i> sp. ATCC 33047	GCF 001597855.1 ASM159785v1	
<i>Anabaena</i> sp. CRKS33	GCA 001672075.1 ASM167207v1	x
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7108	GCF 000332135.1 ASM33213v1	x
<i>Anabaena</i> sp. WA102	GCA 001277295.1 ASM127729v1	x
<i>Anabaena</i> sp. WA113	GCA 001672155.1 ASM167215v1	
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	GCA 000204075.1 ASM20407v1	
<i>Anabaenopsis circularis</i> NIES-21	GCA 002367975.1 ASM236797v1	
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i> KM1 D3	GCA 000789435.1 ASM78943v1	x
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i> NIES-81	GCF 000521175.1 Aflos454contigs1	x
<i>Aulosira laxa</i> NIES-50	GCA 002368055.1 ASM236805v1	
<i>Calothrix rhizosoleniae</i> SC01	GCF 900185595.1 CalSC01 2013	
<i>Calothrix</i> sp. 336 3	GCA 000734895.2 ASM73489v2	
<i>Calothrix</i> sp. HK-06	GCA 001904745.1 ASM190474v1	
<i>Calothrix</i> sp. PCC 6303	GCA 000317435.1 ASM31743v1	
<i>Calothrix</i> sp. PCC 7103	GCF 000331305.1 ASM33130v1	
<i>Calothrix</i> sp. PCC 7507	GCA 000316575.1 ASM31657v1	
<i>Chlorogloeopsis fritschii</i> PCC 6912	GCF 000317285.1 ChlPCC6912 1.0	x
<i>Chlorogloeopsis fritschii</i> PCC 9212	GCF 000317265.1 ChlPCC9212 1.0	x
<i>Raphidiopsis raciborskii</i> CENA302	GCA 002027345.1 ASM202734v1	x
<i>Raphidiopsis raciborskii</i> CENA303	GCA 002114155.1 ASM211415v1	x
<i>Raphidiopsis raciborskii</i> cr2010	GCA 003367075.1 ASM336707v1	x
<i>Raphidiopsis raciborskii</i> CS-505	GCA 001676585.1 ASM167658v1	x
<i>Raphidiopsis raciborskii</i> CS-508	GCA 001858115.1 ASM185811v1	x
<i>Raphidiopsis raciborskii</i> CYLP	GCA 002321935.1 ASM232193v1	x
<i>Raphidiopsis raciborskii</i> CYRF	GCA 002321945.1 ASM232194v1	x
<i>Raphidiopsis raciborskii</i> ITEP-A1	GCF 001586755.1 ASM158675v1	x
<i>Raphidiopsis raciborskii</i> LB2897	This work*	x
<i>Raphidiopsis raciborskii</i> MVCC14	GCA 001858125.1 ASM185812v1	x
<i>Raphidiopsis raciborskii</i> MVCC19	This work*	x

<i>Raphidiopsis</i> sp. CR12	GCA 001432185.1 ASM143218v1	x
<i>Cylindrospermum stagnale</i> PCC 7417	GCA 000317535.1 ASM31753v1	x
<i>Dolichospermum circinale</i>	GCF 000426905.1 Dcir131C	x
<i>Dolichospermum circinale</i>	GCF 000426925.1 Acir310F	x
<i>Dolichospermum compactum</i> NIES-806	GCA 002368115.1 ASM236811v1	X
<i>Fischerella major</i> NIES-592	GCA 001904645.1 ASM190464v1	
<i>Fischerella muscicola</i> PCC 7414	GCF 000317205.1 FisPCC7414 1.0	
<i>Fischerella muscicola</i> PCC 73103	GCF 000317245.1 FisPCC73103 1.0	
<i>Fischerella</i> sp. JSC-11	GCA 000231365.2 ASM23136v1	
<i>Fischerella</i> sp. NIES-3754	GCA 001548455.1 ASM154845v1	
<i>Fischerella</i> sp. PCC 9339	GCF 000315585.1 ASM31558v1	
<i>Fischerella</i> sp. PCC 9431	GCF 000447295.1 ASM44729v1	
<i>Fischerella</i> sp. PCC 9605	GCF 000517105.1 ASM51710v1	
<i>Fischerella thermalis</i> PCC 7521	GCF 000317225.1 FisPCC7521 1.0	
<i>Fortiea contorta</i> PCC 7126	GCF 000332295.1 ASM33229v1	
<i>Fremyella diplosiphon</i> NIES-3275	GCA 002368275.1 ASM236827v1	
<i>Hapalosiphon</i> sp. MRB220	GCA 001275395.1 ASM127539v1	
<i>Tolypothrix</i> sp. PCC 7601	GCA 000300115.1 Fremyella diplos	
<i>Mastigocladopsis repens</i> PCC 10914	GCF 000315565.1 ASM31556v1	
<i>Mastigocladus laminosus</i> 74	GCA 001990805.1 ASM199080v1	
<i>Mastigocladus laminosus</i> UU774	GCA 000934435.1 ASM93443v1	
<i>Mastigocoleus testarum</i> BC008	GCA 001456025.1 ASM145602v1	
<i>Nodularia</i> sp. NIES-3585	GCA 002218065.1 ASM221806v1	
<i>Nodularia spumigena</i> CCY9414	GCA 000340565.3 ASM34056v3	
<i>Nodularia spumigena</i> CENA596	GCA 001623485.1 ASM162348v1	
<i>Nostoc azollae</i> 0708	GCA 000196515.1 ASM19651v1	x
<i>Nostoc calcicola</i> FACHB-389	GCA 001904715.1 ASM190471v1	
<i>Nostoc piscinale</i> CENA21	GCA 001298445.1 ASM129844v1	
<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102	GCA 000020025.1 ASM2002v1	
<i>Nostoc</i> sp. 106C nqp	GCA 002154725.1 ASM215472v1	
<i>Nostoc</i> sp. KVJ20	GCA 001712795.1 ASM171279v1	
<i>Nostoc</i> sp. NIES-3756	GCA 001548375.1 ASM154837v1	
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7107	GCA 000316625.1 ASM31662v1	

<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	GCA 000009705.1 ASM970v1	
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7524	GCA 000316645.1 ASM31664v1	
<i>Nostoc</i> sp. <i>Peltigera membranacea</i> <i>cyanobiont</i> 232	GCA 002245985.1 ASM224598v1	
<i>Nostoc</i> sp. RF31Y	GCA 002155185.1 ASM215518v1	
<i>Nostoc</i> sp. T09	GCA 002154695.1 ASM215469v1	
Nostocales cyanobacterium HT-58-2	GCA 002163975.1 ASM216397v1	
<i>Raphidiopsis brookii</i> D9	GCA 000175855.1 ASM17585v1	x
<i>Raphidiopsis curvata</i> NIES-932	GCA 002368135.1 ASM236813v1	x
<i>Richelia intracellularis</i> HM01	GCA 000350125.1 ASM35012v1	
<i>Richelia intracellularis</i> RC01	GCA 000613065.1 RintRC 1	
<i>Rivularia</i> sp. PCC 7116	GCA 000316665.1 ASM31666v1	
<i>Scytonema hofmanni</i> UTEX 2349	GCF 000582685.1 ASM58268v1	
<i>Scytonema hofmannii</i> PCC 7110	GCA 000346485.2 ASM34648v2	
<i>Scytonema millei</i> VB511283	GCA 000817735.2 ASM81773v2	
<i>Scytonema</i> sp. HK-05	GCA 001904675.1 ASM190467v1	
<i>Scytonema tolypothrichoides</i> VB- 61278	GCA 000828085.2 ASM82808v2	
<i>Sphaerospermopsis</i> <i>aphanizomenoides</i> BCCUSP55	GCA 001586785.1 ASM158678v1	x
<i>Sphaerospermopsis kisseleviana</i> NIES-73	GCA 002368075.1 ASM236807v1	x
<i>Tolypothrix bouteillei</i> VB521301	GCA 000760695.2 ASM76069v2	
<i>Tolypothrix campylonemoides</i> VB511288	GCA 000828075.2 ASM82807v2	
<i>Tolypothrix</i> sp. NIES-4075	GCA 002218085.1 ASM221808v1	
<i>Trichormus</i> sp. NMC-1	GCF 001858025.1 ASM185802v1	x
<i>Trichormus variabilis</i> NIES-23	GCA 002368015.1 ASM236801v1	

[1] Las cepas seleccionadas fueron representativas de la diversidad genética del orden Nostocales. La selección se realizó en función de la identidad de la secuencia.

[2] Lista de genomas identificados como estrechamente relacionados con *R. raciborskii* que se incluyeron en el árbol filogenético que se muestra en la Figura 3. *GenBank aún no ha proporcionado el código de acceso a la asamblea.

Tabla 1.3.Cepas de *Raphidiopsis raciborskii* utilizadas para realizar los análisis filogenéticos basados en el espaciador transcrito intergénico ribosómico (ITS).

GenBank Accession	Strain Name	Country
NZ AP018314.1	<i>Sphaerospermopsis kisseleviana</i> NIES-73*	Japan
AJ582270.1	PMC118.02	Senegal
AJ582271.1	PMC117.02	Senegal
AM502068.1	NIVACYA 506	Uganda
AM502069.1	NIVACYA 507	Uganda
AM502070.1	NIVACYA 508	Uganda
AM502071.1	NIVACYA 509	Uganda
AM502072.1	NIVACYA 510	Uganda
AM502073.1	NIVACYA 511	Uganda
HQ407350.1	MG	Tunisia
KF287107.1	Sidi 8	Tunisia
HQ407351.1	Sidi	Tunisia
EU552055.1	CS505	Australia
AJ582269.1	CYP026J	Australia
EU552056.1	CS506	Australia
EU552057.1	CS507	Australia
AJ582278.1	CYP023	Australia
AJ582277.1	CYP030B	Australia
EU552058.1	CS508	Australia
EU552059.1	CS509	Australia
EU552060.1	CS510	Australia
EU552061.1	CS511	Australia
HQ112348.1	MVCC19	Uruguay
HQ112347.1	MVCC14	Uruguay
LUBZ00000000.1	ITEPA1	Brazil
NZ NBYN00000000.1	CENA 303	Brazil
AJ582283.1	PMC00.01	Brazil
AJ582276.1	ITEP018	Brazil
EU552069.1	D9*	Brazil
AJ582284.1	ITEPA3	Brazil
MH620008.1	LB2897	USA
AJ582282.1	PMC99.06	Mexico
HQ407340.1	LEGE 99043	Portugal
KF287104.1	LMECYA 132	Portugal
HQ407341.1	LEGE 99044	Portugal
HQ407344.1	LMECYA 130	Portugal
HQ407343.1	LEGE 99045	Portugal
KF287105.1	LMECYA 135	Portugal
HQ407345.1	LMECYA 134	Portugal
KF287106.1	LEGE 236	Portugal
HQ407346.1	LEGE 8326	Portugal

HQ407342.1	LEGE 99325	Portugal
AJ582273.1	PMC99.12	France
AJ582279.1	PMC114.02	Francia
AJ582268.1	PMC98.14	France
AJ582280.1	AJ582280.1	Hungary
AJ582281.1	CYLI 53	Germany
AM502075.1	ZIE11CR	Germany
AM502076.1	ZIE13CR	Germany
AM502074.1	ZIE05CR	Germany
NZ PVMC00000000.1	Cr2010	Netherlands
MH620007.1	NIES3583	Japan
MH620006.1	NIES3584	Japan
AP018317.1	NIES932**	Japan

* Fuera del grupo; ** *Raphidiopsis brooki*; *** *Raphidiopsis curvata*

Tabla 1.4 Valores medios de identidad nucleotídica (ANI) entre los genomas disponibles de *Raphidiopsis raciborskii*.

		<i>R. curvata</i> NIES-932	<i>C. raciborskii</i> cr2010	<i>Cylindrospermopsis</i> sp. CR12	<i>C. raciborskii</i> CS-505	<i>C. raciborskii</i> CS-508	<i>C. raciborskii</i> i LB2897	<i>R. brooki</i> D9	<i>C. raciborskii</i> CENA303	<i>C. raciborskii</i> CENA302	<i>C. raciborskii</i> MVCC19	<i>C. raciborskii</i> CYLP	<i>C. raciborskii</i> MVCC14	<i>C. raciborskii</i> CYRF
South America	<i>C. raciborskii</i> ITEP-A1	94.21(2.81)	94.58(2.77)	94.60(2.76)	94.54(2.80)	94.62(2.72)	96.40(1.96)	97.46(2.75)	97.42(2.65)	99.32(1.78)	99.33(1.68)	99.30(1.06)	99.29(1.82)	99.69(0.98)
	<i>C. raciborskii</i> CYRF	94.13(2.89)	94.51(2.84)	94.50(2.83)	94.49(2.84)	94.57(2.71)	96.39(1.96)	97.45(2.49)	97.44(2.51)	99.37(1.15)	99.36(1.17)	99.31(1.16)	99.35(1.20)	
	<i>C. raciborskii</i> MVCC14	94.26(2.67)	94.66(2.60)	94.62(2.65)	94.59(2.65)	94.65(2.58)	96.38(1.85)	97.45(2.83)	97.45(2.70)	99.68(2.22)	99.63(3.07)	99.76(0.96)		
	<i>C. raciborskii</i> CYLP	94.18(2.70)	94.60(2.52)	94.54(2.65)	94.49(2.69)	94.61(2.52)	96.32(1.83)	97.41(2.50)	97.40(2.56)	99.74(1.12)	99.77(0.98)			
	<i>C. raciborskii</i> MVCC19	94.28(2.62)	94.66(2.56)	94.62(2.64)	94.65(2.53)	94.70(2.50)	96.38(1.82)	97.45(2.79)	97.42(2.76)	99.72(2.09)				
	<i>C. raciborskii</i> CENA302	94.28(2.55)	94.70(2.47)	94.66(2.56)	94.61(2.63)	94.67(2.50)	96.43(1.75)	97.46(2.72)	97.40(2.80)					
	<i>C. raciborskii</i> CENA303	94.05(2.83)	94.14(2.93)	94.15(2.87)	94.07(2.96)	94.11(2.94)	96.20(2.25)	99.48(1.40)						
	<i>R. brooki</i> D9	94.12(2.59)	94.22(2.67)	94.21(2.67)	94.17(2.76)	94.17(2.77)	96.12(2.27)							
	<i>C. raciborskii</i> LB2897	94.13(2.76)	94.50(2.66)	94.52(2.62)	94.44(2.68)	94.49(2.62)								
Oceania	<i>C. raciborskii</i> CS-508	96.36(2.54)	98.68(2.14)	98.71(1.88)	99.72(1.51)									
	<i>C. raciborskii</i> CS-505	96.32(2.61)	98.61(2.25)	98.67(2.12)										
	<i>Cylindrospermopsis</i> sp. CR12	96.49(2.67)	99.24(2.39)											
Europe	<i>C. raciborskii</i> cr2010	96.64(2.65)												
Oceania	<i>R. curvata</i> NIES-932													

Tabla 1.5 Genomas nostocales donde se encontraron los genes *sxtY* y *sxtZ* (identidad hasta el 60%). La x indica las cepas en las que se detectó la producción de saxitoxinas (PSP).

Nostocales genomes where <i>sxtY</i> gene has been detected, identity up to 60%	Production of SAX detected	Nostocales genomes where <i>sxtZ</i> gene has been detected, identity up to 60%	Production of SAX detected
Anabaena sp. CRKS33		Anabaena sp. CRKS33	
Anabaena sp. WA113		Anabaena sp. WA113	
Nostoc sp. Peltigera membranacea cyanobiont 232		Nostoc sp. Peltigera membranacea cyanobiont 232	
Anabaenopsis circularis NIES-21		Anabaenopsis circularis NIES-21	
Trichormus variabilis NIES-23		Trichormus variabilis NIES-23	
Aulosira laxa NIES-50		Aulosira laxa NIES-50	
Sphaerospermopsis kisseleviana NIES-73		Sphaerospermopsis kisseleviana NIES-73	
Dolichospermum compactum NIES-806		Dolichospermum compactum NIES-806	
Raphidiopsis curvata NIES-932		Raphidiopsis curvata NIES-932	
Fremyella diplosiphon NIES-3275		Fremyella diplosiphon NIES-3275	
Nostoc sp. PCC 7120		Nostoc sp. PCC 7120	
Nostoc punctiforme PCC 73102		Nostoc punctiforme PCC 73102	
Raphidiopsis brookii D9		Raphidiopsis brookii D9	
Nostoc azollae 0708		Nostoc azollae 0708	
Anabaena variabilis ATCC 29413		Anabaena variabilis ATCC 29413	
Fischerella sp. JSC-11		iphon-2.0.1 Tolypothrix sp. PCC 7601	
iphon-2.0.1 Tolypothrix sp. PCC 7601		Anabaena sp. 90 npb	
Anabaena sp. 90 npb		Calothrix sp. PCC 7507	
Calothrix sp. PCC 7507		Nostoc sp. PCC 7107	
Nostoc sp. PCC 7107		Nostoc sp. PCC 7524	
Nostoc sp. PCC 7524		Cylindrospermum stagnale PCC 7417	
Rivularia sp. PCC 7116		Anabaena cylindrica PCC 7122	
Calothrix sp. PCC 6303		Nodularia spumigena CCY9414	
Cylindrospermum stagnale PCC 7417		Scytonema hofmannii PCC 7110	
Anabaena cylindrica PCC 7122		Aphanizomenon flos-aquae 2012 KM1 D3	
Nodularia spumigena CCY9414		Tolypothrix campylonemoides VB511288	
Scytonema hofmannii PCC 7110		Scytonema tolypothrichoides VB-61278	
Richelia intracellularis HM01		Anabaena sp. WA102	
Richelia intracellularis RC01		Nostoc piscinale CENA21	
Calothrix sp. 336 3		Cylindrospermopsis sp. CR12	
Tolypothrix bouteillei VB521301		Nostoc sp. NIES-3756	
Aphanizomenon flos-aquae 2012 KM1 D3		Nodularia spumigena CENA596	
Tolypothrix campylonemoides VB511288		Cylindrospermopsis raciborskii CS-505	
Scytonema tolypothrichoides VB-61278		Nostoc sp. KVJ20	
Mastigocladus laminosus UU774		Cylindrospermopsis raciborskii CS-508	
Hapalosiphon sp. MRB220		Cylindrospermopsis raciborskii MVCC14	x
Anabaena sp. WA102		Nostoc calcicola FACHB-389	
Cylindrospermopsis sp. CR12		Calothrix sp. HK-06	
Mastigocoleus testarum BC008		Cylindrospermopsis raciborskii CENA302	x
Nostoc sp. NIES-3756		Cylindrospermopsis raciborskii CENA303	
Fischerella sp. NIES-3754		Nostoc sp. T09	
Nodularia spumigena CENA596		Nostoc sp. 106C	
Cylindrospermopsis raciborskii CS-505		Nostoc sp. RF31Y	
Nostoc sp. KVJ20		Nostocales cyanobacterium HT-58-2	
Cylindrospermopsis raciborskii CS-508		Nodularia sp. NIES-3585	
Cylindrospermopsis raciborskii MVCC14	x	Tolypothrix sp. NIES-4075	
Fischerella major NIES-592		Anabaena sp. PCC 7108	
Scytonema sp. HK-05		Fortiea contorta PCC 7126	
Nostoc calcicola FACHB-389		Dolichospermum circinale AWQC131C	
Calothrix sp. HK-06		Dolichospermum circinale AWQC310F	x
Mastigocladus laminosus 74		99p Aphanizomenon flos-aquae NIES-81	
Cylindrospermopsis raciborskii CENA302	x	Scytonema hofmanni UTEX 2349	
Cylindrospermopsis raciborskii CENA303		Cylindrospermopsis raciborskii ITEP-A1	
Nostoc sp. T09		Anabaena sp. 4-3	
Nostoc sp. 106C		Anabaena sp. CA = ATCC 33047	
Nostoc sp. RF31Y		Trichormus sp. NMC-1	
Nostocales cyanobacterium HT-58-2		Cylindrospermopsis raciborskii cr2010	
Nodularia sp. NIES-3585		Cylindrospermopsis raciborskii CYRF	x
Tolypothrix sp. NIES-4075		Cylindrospermopsis raciborskii CYLP	
Mastigocladopsis repens PCC 10914		Sphaerospermopsis aphanizomenoides BCCUSP55	
Fischerella sp. PCC 9339		Cylindrospermopsis raciborskii LB2897	
Fischerella muscicola PCC 7414		Cylindrospermopsis raciborskii MVCC19	x
Fischerella thermalis PCC 7521			
Fischerella muscicola SG 1427-1 = PCC 73103			
Chlorogloeopsis fritschii PCC 9212			
Chlorogloeopsis fritschii PCC 6912			
Calothrix sp. PCC 7103			
Anabaena sp. PCC 7108			
Fortiea contorta PCC 7126			
Dolichospermum circinale AWQC131C			
Dolichospermum circinale AWQC310F	x		
Fischerella sp. PCC 9431			
Fischerella sp. PCC 9605			
99p Aphanizomenon flos-aquae NIES-81			
Scytonema hofmanni UTEX 2349			
Cylindrospermopsis raciborskii ITEP-A1			
Anabaena sp. 4-3			
Anabaena sp. CA = ATCC 33047			
Trichormus sp. NMC-1			
Calothrix rhizosoleniae SC01			
Cylindrospermopsis raciborskii cr2010			
Cylindrospermopsis raciborskii CYRF	x		
Cylindrospermopsis raciborskii CYLP			
Sphaerospermopsis aphanizomenoides BCCUSP55			
Cylindrospermopsis raciborskii LB2897			
Cylindrospermopsis raciborskii MVCC19	x		

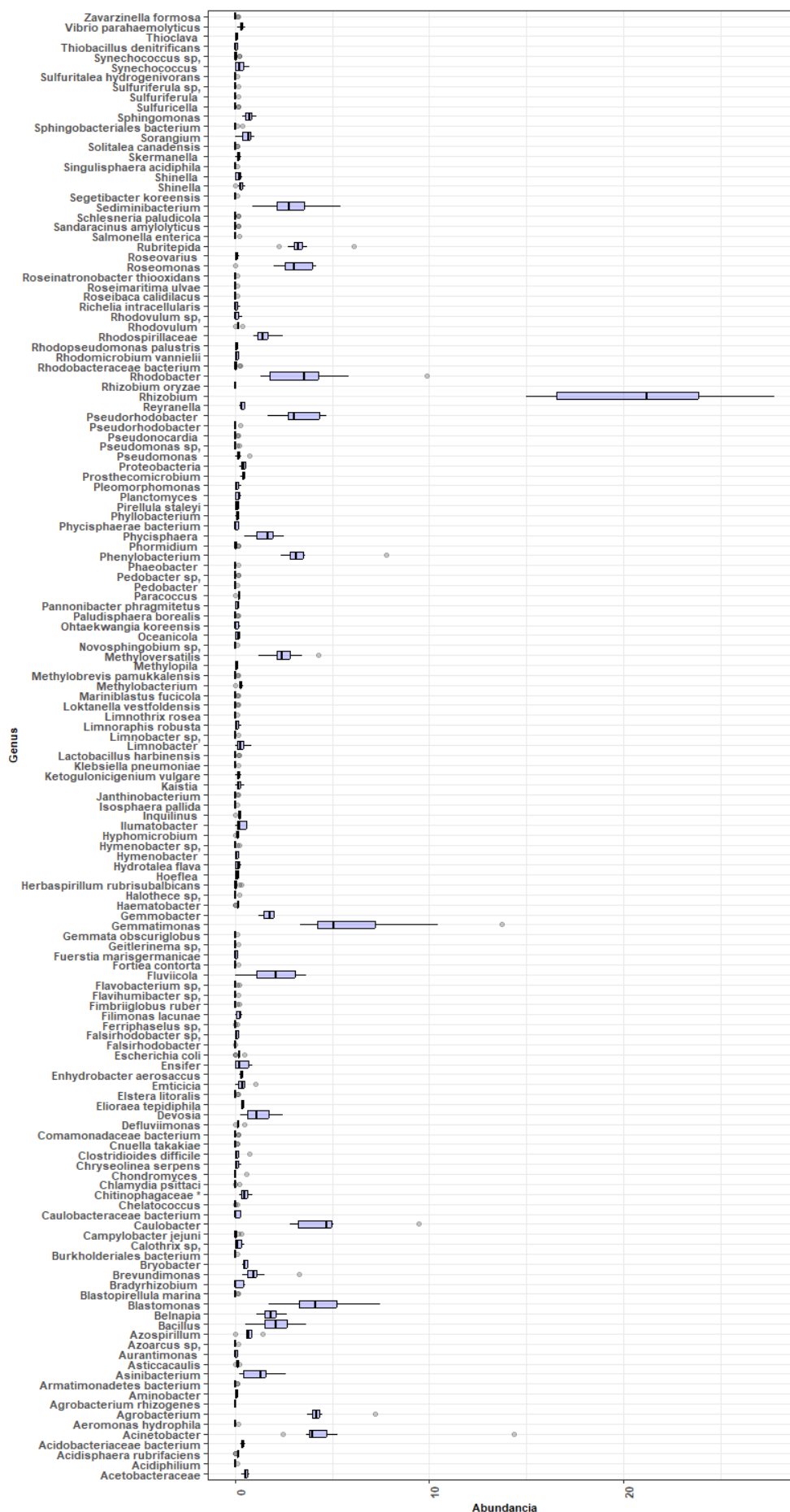


Figura 2.1. Abundancia de géneros bacterianos en el microbioma de MVCC19 de *R. raciborskii* a partir del metatranscriptoma.

Referencias Apéndice 1:

Tabla 1.1

- Aguilera, A., Gómez, E.B., Kaštovský, J., Echenique, R.O., and Salerno, G.L. (2018) The polyphasic analysis of two native *Raphidiopsis* isolates supports the unification of the genera *Raphidiopsis* and *Raphidiopsis* (Nostocales, Cyanobacteria). *Phycologia* **57**: 130–146.
- Amaral, V., Bonilla, S., and Aubriot, L. (2014) Growth optimization of the invasive cyanobacterium *Raphidiopsis raciborskii* in response to phosphate fluctuations. *Eur J Phycol* **49**: 134–141.
- Andrade, C.M. de, Gomes, C.T. da S., Aragão, N.K.C.V., Silva, E.M., and Lira, G.A. da S.T. (2009) Estrutura da comunidade fitoplanctônica com ênfase em Cyanobacteria no reservatório de Tapacurá-PE. *Rev do Inst Adolfo Lutz* **68**: 109–117.
- Dos Anjos, F.M., do Carmo Bittencourt-Oliveira, M., Zajac, M.P., Hiller, S., Christian, B., Erler, K., et al. (2006) Detection of harmful cyanobacteria and their toxins by both PCR amplification and LC-MS during a bloom event. *Toxicon* **48**: 239–245.
- Aragão, N.K.C. V, Gomes, C.T.S., Lira, G.A.S.T., and Andrade, C.M. (2007) Estudo da comunidade fitoplanctônica no reservatório do Carpina-PE, com ênfase em Cyanobacteria. *Rev do Inst Adolfo Lutz* **66**: 240–248.
- Baron-Sola, A., Ouahid, Y., and del Campo, F.F. (2012) Detection of potentially producing cylindrospermopsin and microcystin strains in mixed populations of cyanobacteria by simultaneous amplification of cylindrospermopsin and microcystin gene regions. *Ecotoxicol Environ Saf* **75**: 102–108.
- Bernard, C., Harvey, M., Briand, J.F., Biré, R., Krysz, S., and Fontaine, J.J. (2003) Toxicological comparison of diverse *Raphidiopsis raciborskii* strains: Evidence of liver damage caused by a French *C. raciborskii* strain. *Environ Toxicol* **18**: 176–186.
- Berry, J.P., Jaja-Chimedza, A., Dávalos-Lind, L., and Lind, O. (2012) Apparent bioaccumulation of cylindrospermopsin and paralytic shellfish toxins by finfish in Lake Catemaco (Veracruz, Mexico). *Food Addit Contam Part A* **29**: 314–321.
- Berry, J.P. and Lind, O. (2010) Toxicon First evidence of “ paralytic shellfish toxins ” and cylindrospermopsin in a Mexican freshwater system , Lago Catemaco , and apparent bioaccumulation of the toxins in “ tegogolo ” snails (*Pomacea patula catemacensis*). *Toxicon* **55**: 930–938.
- Bittencourt-Oliveira, M., Carmo, D.O., Piccin-Santos, V., Moura, A.N., Aragao-Tavares, N.K.C., Cordeiro-Araújo, M.K. (2014) Cyanobacteria, microcystins and cylindrospermopsin in public drinking supply reservoirs of Brasil. *An Acad Bras Cienc* **86**: 297–310.
- Bittencourt-Oliveira, M. do C., Dias, S.N., Moura, A.N., Cordeiro-Araújo, M.K., and Dantas, E.W. (2012) Seasonal dynamics of cyanobacteria in a eutrophic reservoir (Arcoverde) in a semi-arid region of Brasil. *Brasílian J Biol* **72**: 533–544.
- Bittencourt-Oliveira, M.D.C. (2011) Cylindrospermopsin in Water Supply Reservoirs in Brasil Determined by Immunochemical and Molecular Methods. *J Water Resour Prot* **03**: 349–355.
- Bittencourt - Oliveira, M. do C., Piccin - Santos, V., and Gouvêa - Barros, S. (2012) Microcystin - producing genotypes from cyanobacteria in Brazilian reservoirs.

- Environ Toxicol* **27**: 461–471.
- Bortoli, S. de (2011) Investigação da biossíntese de toxinas produzidas por cepas de cianobactérias.
- Bouvy, M., Falcão, D., Marinho, M., Pagano, M., and Moura, A. (2000) Occurrence of *Raphidiopsis* (Cyanobacteria) in 39 Brazilian tropical reservoirs during the 1998 drought. *Aquat Microb Ecol* **23**: 13–27.
- Bouvy, M., Molica, R., De Oliveira, S., Marinho, M., and Beker, B. (1999) Dynamics of a toxic cyanobacterial bloom (*Raphidiopsis raciborskii*) in a shallow reservoir in the semi-arid region of northeast Brasil. *Aquat Microb Ecol* **20**: 285–297.
- Bouvy, M., Nascimento, S.M., Molica, R.J.R., Ferreira, A., Huszar, V., and Azevedo, S.M.F.O. (2003) Limnological features in Tapacurá reservoir (northeast Brasil) during a severe drought. *Hydrobiologia* **493**: 115–130.
- Bressan, F.A., Silva, L.H., Ferreira, A.C., Nascimento, S., Molica, R.J.R., and Huszar, V. (1999) A dominância de *Raphidiopsis raciborskii* no açude Tabocas, Caruaru, PE. In, *VII Congresso Brasileiro de Limnologia*. Florianópolis, p. 204.
- Câmara, F.R.A., Rocha, O., Pessoa, E.K.R., Chellappa, S., and Chellappa, N.T. (2015) Morphofunctional changes of phytoplankton community during pluvial anomaly in a tropical reservoir. *Brasilian J Biol* **75**: 628–637.
- Carmichael, W.W., Azevedo, S.M., An, J.S., Molica, R.J., Jochimsen, E.M., Lau, S., et al. (2001) Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environ Health Perspect* **109**: 663–668.
- Chapman, A.D. and Schelske, C.L. (1997) Recent appearance of *Raphidiopsis* (Cyanobacteria) in five hypereutrophic Florida lakes. *J Phycol* **33**: 191–195.
- Clark, M.A.L. and Jones, W.W. (2006) Lake Lemon Monitoring Program, 2005 Results, Bloomington, Indiana.
- Clemente, Z. (2009) Monitoramento do reservatório Alagados, Ponta Grossa (PR) a través de biomarcadores e análise de cianotoxinas.
- COLVARA, W.A. (2012) Estudo das florações de cianobactérias produtoras de toxinas paralisantes e desenvolvimento de metodologia de purificação das toxinas.
- Costa, I.A.S., Azevedo, S.M.F.O., Senna, P.A.C., Bernardo, R.R., Costa, S.M., and Chellappa, N.T. (2006) Occurrence of toxin-producing cyanobacteria blooms in a Brazilian semiarid reservoir. *Brasilian J Biol* **66**: 211–219.
- Crossetti, L.O. and Bicudo, C.E. de M. (2008) Adaptations in phytoplankton life strategies to imposed change in a shallow urban tropical eutrophic reservoir, Garças Reservoir, over 8 years. *Hydrobiologia* **614**: 91–105.
- Dantas, Ê.W., Bittencourt-oliveira, M.C., and Moura, N. (2010) Spatial-temporal variation in coiled and straight morphotypes of *Raphidiopsis raciborskii* (Wolszynska) Seenayya et Subba Raju. **24**: 585–591.
- Dantas, E.W., Moura, A.N., and Bittencourt-Oliveira, M.D.C. (2011) Cyanobacterial blooms in stratified and destratified eutrophic reservoirs in semi-arid region of Brasil. *An Acad Bras Cienc* **83**: 1327–38.
- Dantas, Ê.W., Moura, N., and Bittencourt-Oliveira, M.D.C. (2008) Temporal variation of the phytoplankton community at short sampling intervals in the Mundaú reservoir, Northeastern Brasil. **22**: 970–982.
- Delazari-Barroso, A. (2007) Fatores controladores do desenvolvimento do fitoplâncton em um reservatório de abastecimento público no Espírito Santo, com ênfase em cianobactérias.
- Delazari-Barroso, A., Sant’Anna, C.L., and Senna, P.A.C. (2007) Phytoplankton from Duas Bocas Reservoir, Espírito Santo State, Brasil (except diatoms). *Hoehnea* **34**: 211–229.
- Dobberfuhl, D.R. (2003) *Raphidiopsis raciborskii* in Three Central Florida Lakes: Population Dynamics, Controls, and Management Implications. *Lake Reserv Manag* **19**: 341–348.
- Extreme morphology of *Raphidiopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) in the Lagoa do Peri, a freshwater coastal lagoon, Santa Catarina, Brasil - ScienceBase-

- Catalog.
- Fabre, A., Carballo, C., Hernández, E., Piriz, P., Bergamino, L., Mello, L., et al. (2010) El nitrógeno y la relación zona eufótica / zona de mezcla explican la presencia de cianobacterias en pequeños lagos subtropicales , artificiales de Uruguay. *Panam J Aquat Sci* **5**: 112–125.
- Fernandes, V.O. (2003) Ecossistemas aquáticos continentais do Espírito Santo: “berços” de florações de cianobactérias potencialmente tóxicas? In, *IX Congresso Brasileiro de Limnologia*. Juiz de Fora.
- Figueredo, C.C. and Giani, A. (2009) Phytoplankton community in the tropical lake of Lagoa Santa (Brasil): conditions favoring a persistent bloom of *Raphidiopsis raciborskii*. *Limnologia* **39**: 264–272.
- Fonseca, B.M. and Bicudo, C.E. de M. (2008) Phytoplankton seasonal variation in a shallow stratified eutrophic reservoir (Garças Pond, Brasil). *Hydrobiologia* **600**: 267–282.
- Fonseca, J.R., Vieira, P.C.S., Kujbida, P., and Costa, I.A.S. da (2015) Cyanobacterial occurrence and detection of microcystins and saxitoxins in reservoirs of the Brazilian semi-arid. *Acta Limnol Bras* **27**: 78–92.
- Fuentes, E.V. (2015) Ecologia do fitoplâncton na Lagoa do Peri: influência da variabilidade climática interanual sobre a limnologia e a dinâmica da comunidade de cianobactérias.
- Gemelgo, M.C.P., Mucci, J.L.N., and Navas-Pereira, D. (2009) Population dynamics: seasonal variation of phytoplankton functional groups in Brazilian reservoirs (Billings and Guarapiranga, São Paulo). *Brasilian J Biol* **69**: 1001–1013.
- Gomes, J. (2011) Avaliação da floração da cianobactéria *Raphidiopsis Raciborskii* na represa de alagados, Ponta Grossa, Paraná.
- Gonzalez, N., Vega, C., Sarthou, F., and Bou, N. (2009) Cianobacterias y cianotoxinas en la ciudad de la costa, Montevideo, Uruguay.
- Grellman, C. (2006) Aspectos da morfologia e ecologia de *Raphidiopsis raciborskii* (WOLOSINSKA) SENNAYA et SUBBA RAJU e produção de cianotoxinas na lagoa do Peri, Florianópolis, SC, Brasil.
- Gunkel, G., Rueter, K., Casallas, J., and Sobral, M. do C. (2003) Estudos da limnologia do reservatório de Tapacurá em Pernambuco: problemas da gestão de reservatórios no semi-árido brasileiro. *XV Símpósio Bras Recur Hídricos* 1–16.
- Hepp, K. (2009) Composição, variação temporal e espacial de cianobactérias, com ênfase na espécie *Raphidiopsis raciborskii* (wołoszynska) seenayya & subba raju no lago do Parque Professor Theobaldo Dick, Lajeado, Rio Grande do Sul, Brasil.
- Hoff-Rissetti, C., Dörr, F.A., Schaker, P.D.C., Pinto, E., Werner, V.R., and Fiore, M.F. (2013) Cylindrospermopsin and Saxitoxin Synthetase Genes in *Raphidiopsis raciborskii* Strains from Brazilian Freshwater. *PLoS One* **8**: 35–39.
- Hoffmann, L., Ramos, R.J.T., Guedes, I.A., Costa, P.F., Miguel, C.R.D., and Silva, R. (2017) Draft Genome Sequences of Two Brazilian Cyanobacterial Strains of *Raphidiopsis raciborskii*: Differences in Membrane Transporters, Saxitoxin Production, and Antioxidant Activities. *Genome Announc* **5**: e00879-17.
- Holland, T., St Amand, A., and Good, G. (2006) Otter Lake’05: A successful response. *Lakeline* **26**: 52–56.
- Huszar, V.L.M., Silva, L.H.S., Marinho, M., Domingos, P., and Sant’Anna, C.L. (2000) Cyanoprokaryote assemblages in eight productive tropical Brazilian waters. In, *The Trophic Spectrum Revisited*. Springer, pp. 67–77.
- Jardim, F.A., Fonseca, Y.M.F., and Azevedo, S.M.F.O. (1999) Primeira ocorrência de Cianobactérias tóxicas em captação de água da COPASA – Alfenas (Represa de Furnas) – MG. In, *VII Congresso Brasileiro de Limnologia*. Florianópolis, p. 524.
- Jardim, F.A., Machado, J.N. de A., Schembri, M.C.A.C., Azevedo, S.M.F.O., and Sperling, E. von (2000) A experiência da COPASA no monitoramento, detecção e adoção de medidas mitigadoras para as cianobactérias tóxicas em estações de tratamento de água-Minas Gerais-Brasil. In, *Congreso Interamericano de*

- Ingeniería Sanitaria y Ambiental*, 27. ABES, pp. 1–11.
- Jardim, F.A. and Viana, T.H. (2003) Análise de algas: cianobactérias e cianotoxinas como parâmetros de controle do tratamento da água para abastecimento. In, 22^o Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. Joenville.
- Jiang, Y., Xiao, P., Yu, G., Shao, J., Liu, D., Azevedo, S.M.F.O., and Li, R. (2014) Sporadic distribution and distinctive variations of cylindrospermopsin genes in cyanobacterial strains and environmental samples from Chinese freshwater bodies. *Appl Environ Microbiol* **80**: 5219–5230.
- Kertész, E.N.M. (1999) Presença de *Raphidiopsis raciborskii* em duas sub-bacias hidrográficas do Rio Grande do Sul, Brasil. In, VII Congresso Brasileiro de Limnologia. Flórida, p. 630.
- Komárková, J. and Tavera, R. (2003) Steady state of phytoplankton assemblage in the tropical Lake Catemaco (Mexico). In, *Phytoplankton and Equilibrium Concept: The Ecology of Steady-State Assemblages*. Springer, pp. 187–196.
- Lagos, N., Onodera, H., Zagatto, P.A., Andrinolo, D., Azevedo, S.M.F.Q., and Oshima, Y. (1999) The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Raphidiopsis raciborskii*, isolated from Brasil. *Toxicon* **37**: 1359–1373.
- Lind, O., Dávalos-Lind, L., López, C., López, M., and Dyble Bressie, J. (2016) Seasonal morphological variability in an in situ Cyanobacteria monoculture: example from a persistent *Raphidiopsis* bloom in Lake Catemaco, Veracruz, Mexico. *J Limnol* **75**: 66–80.
- Lira, G. a S.T., Araújo, E.L., Bittencourt-Oliveira, M.D.C., and Moura, A.N. (2011) Phytoplankton abundance, dominance and coexistence in an eutrophic reservoir in the state of Pernambuco, Northeast Brasil. *An Acad Bras Cienc* **83**: 1313–26.
- Lira, G., Moura, A.N., Vilar, M.C.P., Cordeiro-Araujo, M.K., and Bittencourt-Oliveira, M.C. (2014) Vertical and temporal variation in phytoplankton assemblages correlated with environmental conditions in the Mundaú reservoir, semi-arid northeastern Brasil. *Brasílian J Biol* **74**: S093-S102.
- Lopes, I.K.C., Barros, M.U.G., Pestana, C.J., and Capelo Neto, J. (2015) Prevalence of paralytic shellfish poison-producing Planktothrix agardhii and *Raphidiopsis raciborskii* in a Brazilian semi-arid reservoir. *Acta Limnol Bras* **27**: 238–246.
- Lorenzi, A.S., Cordeiro-Araújo, M.K., Chia, M.A., and do Carmo Bittencourt-Oliveira, M. (2018) Cyanotoxin contamination of semiarid drinking water supply reservoirs. *Environ earth Sci* **77**: 595.
- Madhushankha, L., Dhammika, M., Charitha, P., Tilak, A., and Lishantha, G. (2016) Cyanobacteria and cyanotoxins in well waters of the girandurukotte, ckdu endemic area in Sri Lanka; do they drink safe water? *J Ecotechnology Res* **18**: 17–21.
- Miotto, M.C., Costa, L.D.F., Brentano, D.M., Nader, C., dos Santos Souza, L., Gressler, P.D., et al. (2017) Ecophysiological characterization and toxin profile of two strains of *Raphidiopsis raciborskii* isolated from a subtropical lagoon in Southern Brasil. *Hydrobiologia* **802**: 97–113.
- Molica, R., Onodera, H., García, C., Rivas, M., Andrinolo, D., Nascimento, S., et al. (2002) Toxins in the freshwater cyanobacterium *Raphidiopsis raciborskii* (Cyanophyceae) isolated from Tabocas reservoir in Caruaru, Brasil, including demonstration of a new saxitoxin analogue. *Phycologia* **41**: 606–611.
- Molica, R.J.R., Oliveira, E.J.A., Carvalho, P.V.V.C., Costa, A.N.S.F., Cunha, M.C.C., Melo, G.L., and Azevedo, S.M.F.O. (2005) Occurrence of saxitoxins and an anatoxin-a (s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply. *Harmful Algae* **4**: 743–753.
- Moschini-Carlos, V., Bortoli, S., Pinto, E., Nishimura, P.Y., Gomes De Freitas, L., Pompêo, M.L.M., and Dörr, F. (2009) Cyanobacteria and cyanotoxin in the Billings reservoir (São Paulo, SP, Brasil). *Limnetica* **28**: 273–282.
- Moura, A. do N., Bittencourt-Oliveira, M. do C., Chia, M.A., and Severiano, J.S. (2015) Co-occurrence of *Raphidiopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya & Subba Raju

- and *Microcystis panniformis* Komárek et al. in Mundaú reservoir, a semiarid Brazilian ecosystem. *Acta Limnol Bras* **27**: 322–329.
- Moura, A. do N., Bittencourt-Oliveira, M. do C., Dantas, Ê.W., and Arruda Neto, J.D. de T. (2007) Phytoplanktonic associations: a tool to understanding dominance events in a tropical Brazilian reservoir. *Acta Bot Brasilica* **21**: 641–648.
- Moura, A.N., Dantas, E.W., Oliveira, H.S.B., and Bittencourt-Oliveira, M.C. (2011) Vertical and temporal dynamics of cyanobacteria in the Carpina potable water reservoir in northeastern Brasil. *Brasilian J Biol* **71**: 451–459.
- do Nascimento Moura, A., Cardoso do Nascimento, E., and Wocylis Dantas, Ê. (2012) Temporal and spatial dynamics of phytoplankton near farm fish in eutrophic reservoir in Pernambuco, Brasil. *Rev Biol Trop* **60**: 581–597.
- O'Farrell, I., Motta, C., Forastier, M., Polla, W., Otaño, S., Meichtry, N., et al. (2019) Ecological meta-analysis of bloom-forming planktonic Cyanobacteria in Argentina. *Harmful Algae* **83**: 1–13.
- Oliveira, F., Silva, J.D.B., Costa, A., Ramalho, W.P., Moreira, C.H.P., and Calazans, T.L.S. (2015) Comunidade de cianobactérias em dois reservatórios eutróficos e tropicais no nordeste do Brasil. *Acta Sci-Biol Sci* **37**: 169–176.
- Otaño, S. (2009) Saxitoxins in Argentinian inland waters. *Harm Alg News* **39**: 19.
- Otaño, S., Salerno, G., Ruiz, M., Aguilera, A., and Echenique, R.O. (2012) Argentina: cyanobacteria and cyanotoxins: identification, toxicology, monitoring and risk assessment. *Curr approaches to Cyanotoxin risk assessment, risk Manag Regul Differ Ctries* 16.
- Otaño, S.H. and Bogarín, C. (2014) *Raphidiopsis raciborskii* (Cyanobacteria, Nostocales) productora de microcystinas en Corrientes, Argentina. *Acta Toxicológica Argentina* **22**:.
- Panosso, R., Costa, I.A.S., Souza, S.R., Morales, C., and Azevedo, S. (2003) Ocorrência de cianobactérias potencialmente tóxicas e cianotoxinas em ambientes aquáticos do estado do Rio Grande do Norte. In, *IX Congresso Brasileiro de Limnologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora*.
- Piccin-Santos, V. and do Carmo Bittencourt-Oliveira, M. (2012) Toxic cyanobacteria in four Brazilian water supply reservoirs. *J Environ Prot (Irvine, Calif)* **3**: 68.
- Piccini, C., Aubriot, L., D'Alessandro, B., Martigani, F., and Bonilla, S. (2013) Revealing Toxin Signatures in Cyanobacteria: Report of Genes Involved in Cylindrospermopsin Synthesis from Saxitoxin-Producing *Raphidiopsis raciborskii*. *Adv Microbiol* **03**: 289–296.
- Piccini, Claudia, Aubriot, L., Fabre, A., Amaral, V., González-Piana, M., Giani, A., et al. (2011) Genetic and eco-physiological differences of South American *Raphidiopsis raciborskii* isolates support the hypothesis of multiple ecotypes. *Harmful Algae* **10**: 644–653.
- Piccini, C., Rigamonti, N., D'Alessandro, B., Aubriot, L., and Bonilla, S. (2011) *cyrA* gene detection in *Raphidiopsis raciborskii* strains that not produce cylindrospermopsin. *Unpubl (Genbank direct submission)*.
- Rigamonti, N. (2016). Expresión de genes de toxinas de *Raphidiopsis raciborskii* en distintas condiciones de disponibilidad de nutrientes. MSc Thesis. PEDECIBA. Biología. Uruguay.
- Silva-stenico, M.E., Souza, C., Silva, P., Sturion, A., Keiko, T., Etchegaray, A., et al. (2011) Non-ribosomal peptides produced by Brazilian cyanobacterial isolates with antimicrobial activity. *Microbiol Res* **166**: 161–175.
- da Silva, E.M., da Silva Gomes, C.T., da Silva Ramos, C.P., and Bricio, S.M.L. (2013) Ocorrência de Cianobactérias no Reservatório de Mundaú, no Estado de Pernambuco no Período de Janeiro de 2010 a Novembro de 2011. *Vigilância Sanitária em Debate* **1**: 35–42.
- Silveira, M.H. (2013) Estrutura e dinâmica do fitoplâncton e fatores direcionadores da dominância de cianobactérias em uma lagoa rasa subtropical (Lagoa do Peri, SC).
- Soares, M., de A Rocha, M., Marinho, M., Azevedo, S., Branco, C., and Huszar, V.

- (2009) Changes in species composition during annual cyanobacterial dominance in a tropical reservoir: physical factors, nutrients and grazing effects. *Aquat Microb Ecol* **57**: 137–149.
- Soares, M.C.S., Huszar, V.L.M., and Roland, F. (2007) Phytoplankton dynamics in two tropical rivers with different degrees of human impact (Southeast Brasil). *River Res Appl* **23**: 698–714.
- Soares, M.C.S., Lurling, M., and Huszar, V.L.M. (2010) Responses of the rotifer *Brachionus calyciflorus* to two tropical toxic cyanobacteria (*Raphidiopsis raciborskii* and *Microcystis aeruginosa*) in pure and mixed diets with green algae. *J Plankton Res* **32**: 999–1008.
- De Souza, R.C.R., Carvalho, M.C., and Truzzi, A.C. (1998) *Raphidiopsis raciborskii* (Wolosz.) Seenaya and Subba Raju (Cyanophyceae) dominance and a contribution to the knowledge of Rio Pequeno arm, Billings Reservoir, Brasil. *Environ Toxicol Water Qual An Int J* **13**: 73–81.
- splink (2019) speciesLink. *speciesLink*.
- Tavera, R. and Castillo, S. (2000) An eutrophication-induced shift in the composition, frequency and abundance of the phytoplankton in Lake Catemaco, Veracruz, Mexico. *Aquat Ecosyst Mex status scope Backhuys Publ, Leiden* 103–117.
- Tonetta, D., Petrucio, M.M., and Laudaes-silva, R. (2013) Temporal variation in phytoplankton community in a freshwater coastal lake of southern Brasil. **25**: 99–110.
- Tucci, A. and Sant’Anna, C.L. (2003) *Raphidiopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju (Cyanobacteria): weekly variation and relation with environmental factors in an eutrophic lake, São Paulo, SP, Brasil. *Brasilian J Bot* **26**: 97–112.
- USEPA (2009) National Lakes Assessment: a collaborative survey of the Nation’s lakes.
- USEPA (2016) National Lakes Assessment 2012: a collaborative survey of lakes in the United States, US Environmental Protection Agency Washington, DC.
- Vázquez Galicia, D. (1998) Variación morfológica de especies de *Raphidiopsis* (Nostocales, Cyanophyceae) en algunos lagos de la region de Los Tuxtlas, Veracruz, México.
- Ventura, C., Lagos, P., Fernandes, L.F., Gobbi, E.F., Gobbi, M.F., Recksider, R., and Carneiro, C. (2003) Distribuição horizontal das cianobactérias no Reservatório do Iraí, Pinhais. *Congr Bras Limnol (Vol 9)*.
- Viana, M. (2006) Avaliação de técnicas de tratamento na remoção de saxitoxinas em águas de consumo humano.
- Vidal, L. and Kruk, C. (2008) *Raphidiopsis raciborskii* (Cyanobacteria) extends its distribution to Latitude 34 53’ S: taxonomical and ecological features in Uruguayan eutrophic lakes. *Panam J Aquat Sci*.
- Williams, C.D., Burns, J., Chapman, A., Flewelling, L., Pawlowicz, M., and Carmichael, W. (2001) Assessment of cyanotoxins in Florida’s lakes, reservoirs, and rivers. *St Johns River Water Manag Dist*.
- Yilmaz, M. (2007) Molecular Investigations Of Cylindrospermopsin Production In Florida Lakes, A Dissertation Presented To The Graduate School Of The University Of Florida
- Yilmaz, M., Philips, E.J., Szabo, N.J., and Badylak, S. (2008a) A comparative study of Florida strains of *Raphidiopsis* and *Aphanizomenon* for cylindrospermopsin production. *Toxicon* **51**: 130–9.
- Yilmaz, M., Philips, E.J., Szabo, N.J., and Badylak, S. (2008b) A comparative study of Florida strains of *Raphidiopsis* and *Aphanizomenon* for cylindrospermopsin production. *Toxicon* **51**: 130–9.
- Yunes, J.S., Cunha, N.T., Barros, L.P., Proença, L.A.O., and Monserrat, J.M. (2003) Cyanobacterial neurotoxins from Southern Brazilian freshwaters. *Comments Toxicol* **9**: 103–115.

