



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE ECOLOGÍA
ECOLOGÍA

**INTERACCIÓN, MEDIANTE LA PRODUCCIÓN DE AGENTES
ANTIMICROBIANOS, ENTRE CEPAS AMBIENTALES DE CUATRO CIÉNEGAS
COAHUILA, MÉXICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

VÍCTOR MANUEL SOSA JIMÉNEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ANA ELENA ESCALANTE HERNÁNDEZ
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. VALERIA SOUZA SALDIVAR
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. GLORIA SOBERÓN CHÁVEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

MÉXICO, D.F. ENERO, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE ECOLOGÍA
ECOLOGÍA

**INTERACCIÓN, MEDIANTE LA PRODUCCIÓN DE AGENTES
ANTIMICROBIANOS, ENTRE CEPAS AMBIENTALES DE CUATRO CIÉNEGAS
COAHUILA, MÉXICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

VÍCTOR MANUEL SOSA JIMÉNEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ANA ELENA ESCALANTE HERNÁNDEZ
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. VALERIA SOUZA SALDIVAR
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. GLORIA SOBERÓN CHÁVEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

MÉXICO, D.F. ENERO, 2016

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Biología Evolutiva y Sistemática, en su sesión ordinaria del día 29 de junio de 2015, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **SOSA JIMÉNEZ VÍCTOR MANUEL** con número de cuenta 302142235 con la tesis titulada **"INTERACCIÓN, MEDIANTE LA PRODUCCIÓN DE AGENTES ANTIMICROBIANOS, ENTRE CEPAS AMBIENTALES DE CUATRO CIÉNEGAS COAHUILA, MÉXICO"**, bajo la dirección de la **DRA. ANA ELENA ESCALANTE HERNÁNDEZ**:

Presidente: DR. ARTURO CARLOS II BECERRA BRACHO
Vocal: DR. ENEAS AGUIRRE VON WOBESER
Secretario: DRA. GLORIA SOBERÓN CHÁVEZ
Suplente: DR. RENÉ CERRITOS FLORES
Suplente: DRA. VALERIA FRANCISCA EUGENIA LEOPOLDINA DE
MARÍA GUADALUPE SOUZA SALDIVAR

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 23 de octubre de 2015.



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

Agradecimientos

Al **Posgrado de Ciencias Biológicas** de la UNAM por darme la oportunidad de realizar la maestría y ser parte importante de mi formación.

Este proyecto se llevó a cabo gracias al apoyo del programa **PAPIIT** IN203712 y al programa de apoyo a becarios de **CONACyT**, número de becario: 480725.

A mi **comité tutorial** conformado por la Dra. Ana Elena Escalante Hernández, Dra. Valeria Francisca Eugenia Leopoldina de Maria Guadalupe Souza Saldivar y Dra. Gloria Soberón Chávez. Por el apoyo y asesoría en mi formación.

Quiero agradecer a la Universidad Nacional autónoma de México por haberme cobijado como estudiante, gentilmente me abrió sus puertas desde la preparatoria hasta ahora que estoy justo a la mitad del camino de mi formación.

A la Facultad de Ciencias, con mucho cariño y especial agradecimiento porque fue allí donde esta historia realmente inició. Sus muros y su gente son testigos de mi formación.

Al Instituto de Ecología agradezco por hacer que mis sueños cada día crezcan más, además de hacerme fijar metas más altas y nuevos retos.

A mis profesores en general, porque sin ellos y sus conocimientos no habría sido posible que haya llegado hasta este punto.

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM y al CONACyT, por darme la oportunidad de formarme como maestro en ciencias biológicas y apoyado mi formación.

A mi **jurado**, por apoyarme y brindarme consejos enriquecedores para culminar este trabajo.

A la Dra. **Valeria Souza**, por ser hoy y siempre un ejemplo de dedicación en el quehacer científico. Su entusiasmo y vitalidad contagian. Gracias también por todo el apoyo que me brindó, porque gracias a usted en gran medida esta investigación ha sido posible. Por su infinita paciencia y afectuoso trato hacia todos sus alumnos. Espero poder seguir contando a futuro con usted.

Al Dr. **Eneas Aguirre von Wobeser**, por su apoyo, asesoría, amistad, confianza, entusiasmo, energías, porque en lo académico y en lo personal fue parte importante en este proceso. Estoy muy agradecido con usted porque es una fuente inagotable de conocimientos, razón por la cual lo respeto a usted mucho. Además de la infinita paciencia que tuvo con este hombre distraído que soy.

A la Dra. **Gloria Soberón Chávez**, porque su figura implacable y determinación inspiran a forjar un carácter en el quehacer científico. Por su apoyo académico y personal. Es una figura digna de respeto por el gran ser humano y científica que es usted.

A la Dra. **Ana Elena Escalante Hernández**, por su apoyo, tolerancia y enseñanzas. Es una gran científica, joven y entusiasta, sobretodo rigurosa en su profesión. Porque usted fue la brújula que me hizo no perder la dirección de esta investigación. Gracias por los regaños, porque a veces hace falta que alguien te hable fuerte y claro para entender que las cosas deben hacerse bien. Considero que de usted es de quien más aprendí cosas que en las aulas, libros y artículos no se aprenden. Gracias por las valiosas lecciones de vida.

Al Dr. **Luis E. Eguiarte**, a pesar de ser poco el acercamiento con usted, agradezco que junto con la Dra. Souza me hayan abierto las puertas de su laboratorio. Gracias por las breves explicaciones sobre agaváceas que en campo me dio.

Al Dr. **René Cerritos**, por esas últimas charlas que tuvimos, además de ser llamadas de atención en lo profesional, también me han hecho crecer como

persona. No sabía en qué estima me tiene usted, y tenga por seguro que es recíproco. Es bueno saber que cuento con un excelente ser humano como lo es usted, siempre preocupado por sus alumnos y me siento honrado de poder ser uno de ellos.

Dr. **Arturo Becerra**, por el apoyo incondicional. Fue un placer haber tomado clases con usted, además de tenerlo en mi jurado. Como científico y como persona lo admiro.

A la Dra. **Laura Espinosa Asuar** y la Dra. **Erika Aguirre Planter**, por la asesoría técnica y por el ambiente de compañerismo profesional.

Al laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, porque siempre me han hecho sentir parte de esa enorme y bonita familia. Si todo ser humano tiene un segundo hogar, para mi ese es el laboratorio (el lab).

A mis compañeros de laboratorio en general, por ser parte del día a día.

Gabriel, gracias por la compañía en el laboratorio de la Dra. Soberón, eres agradable y alguien en quien se puede confiar. Paola, Mirna, Diego y Valerie, estuvieron en los momentos de máxima desesperación, me dieron palabras de aliento y me instaban a reírme de mi lamentable situación con las secuencias fallidas, a verle el lado bueno a las cosas y no bajar los brazos. A todos los demás del laboratorio, por su compañerismo. Tere, por escuchar mis traumas.

Doña Chivis, por las risas diarias, carrerearme y tenerme material estéril aun en horas no apropiadas.

Manuel, Erika y Laura, por asesorarme en lo requerido en el laboratorio, materiales, equipo. Es bueno contar con personas como ustedes que saben como hacer su trabajo y enseñar a los demás.

A Eduardo Mucito, por ayudarme con la estadística y el uso de R. Fuiste muy paciente conmigo por no hacer buen equipo con las computadoras.

Al INECOL de Xalapa. Por la experiencia tan grata que pude vivir. Porque hay científicos y seres humanos que me hicieron sentir parte de ellos,

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas, por cobijarme durante la realización de mis experimentos, sobre todo al laboratorio de la Dra. Soberón por haber abierto sus puertas a mí.

Al Dr. Servín, porque aprendí un poco más de bioquímica y biología molecular a través de los seminarios y discusiones de artículos con usted y sus alumnos.

Dedicatoria

A mi familia, por ser el pilar principal en mi vida.

A mi padre, porque aunque has trascendido, sé que tu esencia está conmigo.

A mi madre, por ser mi TODO. Te amo mamá, estoy a mitad de camino. Gracias por estar a mi lado. El día de mañana seré yo quien vea por ti. Te mereces el Universo entero viejita.

A mis hermanos, por estar siempre a mi lado. Por la confianza, risas, peleas, complicidad. Los amo.

A mis sobrinos. Por ser los hijos que tal vez no tenga. Son los seres más increíbles que conozco, y han despertado en mí ese lado paternal que no sabía que tenía. Generan en mí ese amor puro y desinteresado. Gracias por ser mi motor changuitos.

A mis abuelos, sobre todo a mi abuelita Maura, eres la única raíz viva que queda, te amo viejita. Gracias por las risas y experiencias. Eres un ser muy lleno de vida y amor para su familia.

A mis tíos, en especial a Florinda, Abraham y Elia por apoyarme mucho y hacerme sentir como un hijo de ustedes. Tía Florinda, más que tía eres una amiga. Tío Abraham, eres el tío que todos quieren tener, divertido y buena onda. Tía Elia, simplemente eres única.

A mis primos, por ser mis segundos hermanos. Gracias por estar ahí.

A mis hermanos que en la vida pude yo elegir, ellos son mis amigos. Han sido mis incansables compañeros de vida, hemos viajado juntos en este océano de aventuras. Gracias por ser cómplices y hasta alcahuetes de mis locuras. Sé que en ustedes puedo confiar para lo que sea, desde echarnos una chela hasta desahogarme en su hombro por mis más terribles demonios que de mi se apoderan. No sé qué haría sin ustedes.

A mis amigos y compañeros del voleibol, porque este deporte ha sido mi mejor terapia, la más sana y noble. Me permite conocer a muchas personas, en su mayoría valiosas. Este ambiente no deja de sorprenderme.

A mi universidad. Por ser mi segundo hogar y ocupar un lugar muy privilegiado en mi corazón.

Índice

Agradecimientos	1
Dedicatoria	6
Índice	8
Índice de figuras y tablas.....	10
Resumen.....	11
Abstract.....	11
Introducción.....	12
Ecología de comunidades.....	12
Competencia en Comunidades Bacterianas	19
Bacterias de Cuatro Ciénegas	25
Antecedentes	26
Justificación.....	29
Objetivo.....	30
Hipótesis	31
Métodos	31
Área de estudio.....	31
Muestreo y aislamiento de cepas.....	33
Medios de cultivo	34
Determinación taxonómica de cepas	35
Ensayo de competencia.....	37
Análisis de datos.....	38
Resultados	39
Determinación taxonómica de aislados.....	39
Variación en el grado de antagonismo de las <i>Pseudomonas</i>	41
Variación en el grado de sensibilidad de cepas contendientes	44

Relación entre intensidad de interacción antagónica y distancia filogenética.....	48
Discusión	50
Perspectivas.....	57
Conclusiones.....	59
Referencias.....	60
Apéndice I.	69

Índice de figuras y tablas

Figura 1	32
Figura 2	42
Figura 3	49
Figura 4	50
Apéndice I	69
I.I rama de Pantoea	70
I.II Rama de Acinetobacter	70
I.III Rama de Brevundimonas.....	71
III.IV Rama de Staphylococcus	71
I.V Rama de Bacillus	72
I.VI Rama de Micrococcus	73
I.VII Rama de Kocuria.....	73
I.VIII Rama de Williamsia.....	74
I.IX Rama de Brachybacterium	74
I.X Rama de Janibacter	75
I.XI Rama de Dermacoccus	75
I.XII Rama de Kytococcus.....	76
I.XIII Rama de Agrococcus	77
I.XIV Rama de Microbacterium	77
Tabla 1	40
Tabla 2	43

Interacción, mediante la producción de agentes antimicrobianos, entre cepas ambientales de Cuatro Ciénegas Coahuila, México.

Resumen

En este trabajo, se investigó la acción inhibitoria de una colección de *Pseudomonas* aisladas del sistema acuático Churince, en el Valle de Cuatro Ciénegas (Coahuila), sobre 47 cepas de 13 diferentes géneros, aisladas del mismo sitio. Para este fin, se aislaron distintas bacterias del mismo medio ambiente, y se identificaron taxonómicamente mediante la secuencia del gen 16S rDNA. Estos aislados se confrontaron en medio sólido con las *Pseudomonas* para determinar si estas últimas eran capaces de inhibir su crecimiento. Se encontró que la acción inhibitoria de la colección de *Pseudomonas* es independiente de la distancia filogenética. Por lo tanto, los mecanismos de inhibición de estas *Pseudomonas* se pueden considerar de amplio espectro de acción.

Abstract

In this study, inhibitory action was tested from a collection of *Pseudomonas* strains isolated from Churince in Cuatro Cienegas (Coahuila), against 47 strains of 13 different genera, isolated from the same site. All the bacteria were identified taxonomically by sequencing 16S rDNA. A Burkholder plate assay was achieved to test *Pseudomonas* inhibitory action over the newly characterized strains. No relationship was observed between inhibitory action of the tested *Pseudomonas* and the phylogenetic distance suggesting that Pseudomonads from Churince have a broad spectrum inhibition.

Introducción

Ecología de comunidades

El estudio de la ecología de comunidades tiene como propiedades emergentes la estructura, diversidad y funcionamiento de las mismas, entre otras (Jousset et al. 2011; Vetsigian et al. 2011). Dentro de las comunidades se llevan a cabo diversas interacciones que pueden representarse como redes, siendo éstas más complejas (con mayor número de conexiones), cuando hay mayor riqueza de especies. Las comunidades, al estar compuestas de poblaciones de organismos de diferentes especies, son el escenario donde éstas interactúan. Desde este punto de vista, se pueden describir las propias comunidades como el conjunto de poblaciones de distintas especies que coexisten e interactúan en tiempo y espacio. Uno de los objetivos de la ecología de comunidades es estudiar su estructuración, funcionamiento y la manera en que interactúan las especies (Green & Bohannan 2006).

La organización de una comunidad biológica con respecto a las interacciones bióticas se conoce como estructura de la comunidad (HilleRisLambers et al. 2011; Pérez-Gutiérrez et al. 2012). Para entender las interacciones que determinan esta estructura, es necesario conocer primero las especies presentes, las cuáles podrían potencialmente interactuar. Por este motivo, el estudio de la estructura de las comunidades está estrechamente relacionado con la determinación de la composición filogenética de los organismos que las conforman.

Las comunidades son el nivel de organización biológica en donde se estudia la coexistencia de especies para aproximarse a entender los mecanismos que determinan la biodiversidad local o alfa (Gaston & Blackburn 2008; Green & Bohannan 2006). Esto sin menoscabo de la necesidad de estudiar la biodiversidad en todos los niveles de organización biológica, desde genes hasta comunidades (Escalante et al. 2008), e incluso ecosistemas.

De manera muy general, las teorías que explican la biodiversidad con base en la coexistencia dentro de las comunidades, se pueden clasificar en tres grandes aproximaciones. Primero, la visión mecanística (muchas veces determinista) propone que existen reglas de ensamblaje, las cuales rigen la coexistencia, y cuya comprensión permitiría en mayor o menor medida la predicción de la biodiversidad. Otra visión centra su atención en los procesos históricos, postulando que eventos específicos que ocurrieron en una localidad son los que determinan su biodiversidad, y proporcionan una historia compartida entre las especies que allí se encuentran. Por último, diversas teorías ponen un peso mayor o menor a los procesos neutros o aleatorios, que involucran las dinámicas poblacionales de migración, especiación y extinción (Strange et al. 1993; Tilman 1994; Piñol & Martínez Vilalta 2006; Etienne & Alonso 2007; Martiny et al. 2006). Estas tres grandes visiones se interrelacionan, y el peso relativo de los procesos que describen podría variar entre casos.

Neutralismo y Determinismo

Es instructivo contrastar los dos casos más extremos del ensamblaje de comunidades: por un lado la visión determinista, que considera mecanismos predecibles basados en reglas de ensamblaje, con la versión completamente aleatoria, donde los organismos que llegan a un ambiente se establecen sin mayor problema, y es esta migración aleatoria la que produce un ensamble determinado de especies.

La teoría neutral le da todo el peso al ensamble aleatorio de la comunidad. En particular, predice que patrones aleatorios de co-ocurrencia de especies (por ejemplo, debido a la dispersión) y autocorrelación espacial (la similitud está dada por la distancia geográfica y no por similitudes ambientales) deben ser de las principales características de la estructura de la comunidad (Caruso et al. 2011). Naturalmente, esto se daría como resultado de que la estocasticidad demográfica y la limitada dispersión por sí solas controlan la dinámica poblacional de cada especie de la comunidad (Caruso et al. 2011). Desde la perspectiva neutral, las dinámicas poblacionales no difieren entre especies. De esta forma, las teorías neutrales dependen en gran medida de la suposición de que muchas especies son ecológicamente equivalentes, por lo que el concepto de nicho no se reconoce en esta visión (Leibold & McPeck 2006). Esta equivalencia, en el sentido más estricto, se refiere a que las diferencias entre las especies no se relacionan con caracteres que influyen en algún aspecto de su adecuación o demografía y por lo tanto con su interacción con otros ambientes abióticos y especies.

En contraste, la visión determinista considera la existencia del nicho ecológico, que incluye todas las dimensiones ecológicas asociadas con la especie, entre ellas, las interacciones, siendo la competencia un tipo de interacción que parece explicar la diversidad en muchos casos (Dumbrell et al. 2010). El conjunto de recursos y condiciones ambientales que cada especie puede explotar define su nicho, el cual no debe traslaparse con el de las demás especies con las que coexiste. Cuando hay tal traslape, con una especie de características ecológicas similares, una de ellas será desplazada, de acuerdo al principio de exclusión competitiva. Este principio, basado en experimentos de competencia en laboratorio, formaliza la noción de que en una comunidad dos especies no pueden ocupar el mismo nicho y, si compiten por los mismos recursos, la competencia no puede continuar por siempre, sino que en algún momento la mejor competidora desplaza a la otra hasta extinguirla (Gauze 1934).

Entonces, de acuerdo con la visión determinista, los factores que distinguen el nicho son la causa última del ensamblaje y por ello esenciales en el mantenimiento de la biodiversidad a diferentes escalas. Estos factores son diversos, incluyendo recursos, competidores, mutualistas, hábitats, agregación temporal y espacial, así como la competencia directa e indirecta con sus conespecíficos (Leibold & McPeck 2006).

Entre las causas que se consideran determinantes en la generación y mantenimiento de la biodiversidad se encuentra los conceptos de oportunidad biológica (nichos disponibles) y la competencia (Darwin 1859; Spiers et al. 2000).

La oportunidad ecológica se considera un factor esencial y causa primaria de la diversidad. Si un ambiente carece de heterogeneidad y alberga un solo nicho, entonces, según el principio de exclusión competitiva (Hardin 1960), solo podrá establecerse una especie (Gauze 1934; Spiers et al. 2000). Sin embargo, la explotación de un nicho por una especie determinada puede traer consigo la generación de nuevos nichos. Por ejemplo, en una comunidad microbiana, el metabolismo de una bacteria puede generar distintos productos de la degradación de los recursos originales, y así permitir el establecimiento de mutantes o inmigrantes especialistas que aprovechan estos desechos (Helling et al. 1963; Spiers et al. 2000; Hibbing et al. 2010). Estos mutantes o inmigrantes probablemente presenten traslape de nichos, generando así competencia entre ellos.

En esta tesis consideramos que los patrones de la estructura de las comunidades dependen de un complejo balance entre fuerzas determinísticas y estocásticas actuando sobre las poblaciones a diferentes escalas espaciales y en diferentes grupos funcionales. Sin embargo, y a pesar de que la probable participación de procesos neutrales e históricos es innegable, la distribución no aleatoria de las especies en la naturaleza, así como la evidencia a favor de diferentes patrones susceptibles a modelación matemática (Tilman 1994; Huisman & Weissing 1999), sugieren que el enfoque determinístico para explicar las causas de la biodiversidad también puede proveer información valiosa. Por lo tanto, en este trabajo se exploran las interacciones de competencia entre especies, y su contribución a la generación y el mantenimiento de la diversidad.

El papel de las interacciones en la coexistencia

Si consideramos que la diversidad biológica corresponde a la coexistencia estable de los componentes de las comunidades y que, desde el punto de vista mecanístico la coexistencia es, en parte, resultado de las interacciones que se establecen entre dichos componentes, la determinación de las interacciones entre los componentes es esencial para entender las causas de la diversidad biológica y su estructura en comunidades.

La competencia es un ejemplo de interacción que se establece entre poblaciones de especies dentro de una comunidad biológica. La competencia implica inversión energética de las partes interactuantes, y llega a ser tan intensa que puede dar lugar a la extinción de alguna de ellas, especialmente cuando el número de recursos que limitan el crecimiento –como pueden ser agua, luz o nutrientes– es reducido (Gauze 1934). De acuerdo con la teoría de la exclusión competitiva, y los experimentos que la soportan, el número de especies (o componentes) competidoras en equilibrio (i.e. coexistencia) no puede ser menor al número de recursos limitantes (Hardin 1960). Así, el mejor competidor por un solo recurso limitante debe desplazar a todas las demás especies de un hábitat, independientemente de sus densidades iniciales (Gauze 1934; Tilman 1982). Sin embargo, en la naturaleza las especies parecidas pueden coexistir (Hutchinson et al. 1961). Entonces ¿cómo pueden coexistir un gran número de especies si no pueden estar compitiendo por siempre?

Si las especies tienen que encontrar nichos distintos para poder coexistir, la similitud entre dos especies podría significar una competencia más intensa. Existe una tendencia de los organismos a ser fisiológica y ecológicamente más parecidos cuanto más cercanos filogenéticamente sean. Esta observación llevó a Darwin a razonar que los organismos más cercanos filogenéticamente, por ejemplo, pertenecientes al mismo género, deberían ocupar nichos ecológicos más parecidos, y tener por lo tanto una competencia más intensa (Darwin 1859). La propuesta de Darwin contiene elementos de un entendimiento evolutivo de la organización de las comunidades: las especies interactúan en las comunidades, lo hacen con base en sus diferencias y similitudes fenotípicas, y la variación fenotípica tiene sus bases en la historia evolutiva (Webb et al. 2014). En microorganismos, la situación no es tan clara.

La competencia representa presiones selectivas que promueven el mantenimiento de aquellos organismos que poseen las mejores características para lidiar con el entorno, tanto abiótico como con el componente biótico en que habitan. En ocasiones, estas presiones favorecen el desarrollo de armas en diferentes especies en respuesta a los caracteres competitivos de los organismos con quienes interactúan, lo que es llamado carrera armamentista (Elrich & Raven 1964; Dawkins & Krebs 1979). En estos casos los organismos, como resultado de interacciones competitivas, están constantemente evolucionando y, de esa manera, pueden seguir siendo parte del entorno en que habitan (Van Valen 1974).

La coexistencia requiere que las especies respondan a heterogeneidades ecológicas en diferentes formas, y esas diferencias son por lo general el resultado de compensaciones (trade-offs) en las habilidades de las especies para interactuar con diferentes características del ambiente (Tilman 1994; Chesson 2000; Amarasekare 2003; Kneitel & Chase 2004). Lo principal que debe notarse es que las compensaciones permiten la coexistencia en tanto permitan la diferenciación de nicho entre especies (Amarasekare, 2003). En general, se ha propuesto que la coexistencia requiere una similitud limitada y compensaciones interespecíficas de habilidad competitiva, habilidad de colonización y longevidad (Tilman 1994).

El principal mecanismo de la coexistencia favorecido por compensaciones es que los competidores superiores (estrategas K) en cuanto al uso de recursos se ven desfavorecidos en fecundidad, reclutamiento o capacidad de dispersión, o carecen de la habilidad para colonizar hábitats en etapas tempranas de sucesión. Los competidores inferiores (estrategas r) tienen altas tasas de fecundidad, de capacidad de reclutamiento, o amplios rangos de dispersión, y por eso son buenos para explotar ambientes perturbados y dispersar a su descendencia una vez que llegan los competidores superiores (Amarasekare 2003; Kneitel & Chase 2004).

Competencia en Comunidades Bacterianas

Las comunidades microbianas constituyen la mayoría de la biodiversidad de la Tierra y catalizan procesos que son críticos para sostener la vida en la Tierra (Staley & Konopka 1985; Rusch et al. 2007; Venter et al. 2004; Curtis et al. 2006;

Falkowski et al.2008; Tyson et al. 2004; Madsen 2011), por lo que su estudio es altamente relevante.

Uno de los principales retos en ecología microbiana es explicar la gran diversidad que existe en el planeta y una aproximación a ello es el estudio de las interacciones que ocurren dentro de las comunidades. En particular, aquí nos interesa la competencia como mecanismo generador de diversidad en comunidades bacterianas.

Los microorganismos se han utilizado comúnmente como modelos en estudios de competencia. Por ejemplo, Gauze estableció el principio de exclusión competitiva utilizando paramecios. Asimismo, el conflicto entre la alta biodiversidad observada en la naturaleza y este principio fue observado por primera vez en el plancton (Hutchinson et al. 1961), que se compone en gran parte de microorganismos. A partir de entonces, los estudios de competencia en microorganismos abundan en la literatura (Baltzis & Fredrickson 1983; Sommer 1985; Freedman et al. 1989; Passarge et al. 2006; Kardinaal et al. 2007; Brauer et al. 2012; Aguirre von Wobeser et al. 2014 2015). Los microorganismos compiten por espacio y recursos en sus hábitats (Pérez-Gutiérrez et al. 2012; Hibbing et al. 2010). Los recursos nutricionales son factores muy importantes en la competencia entre microorganismos (Hibbing et al. 2010). Los microorganismos suelen excretar sustancias tóxicas o inhibitorias para sus competidores creando interacciones antagonistas entre productores y no productores (Pérez-Gutiérrez et al. 2012).

En los diferentes ambientes los microorganismos se enfrentan a diversas presiones ambientales, entre ellas la disponibilidad de recursos, viéndose envueltos en batallas por tener acceso a éstos. Los microorganismos han evolucionado dando como resultado diferentes estrategias para mejorar la adquisición de recursos, las cuales incluyen la capacidad de desplazamiento, la plasticidad en los mecanismos de adquisición y utilización de nutrientes, y la guerra química (Hibbing et al. 2010). Un aspecto crítico de muchas de las interacciones competitivas es tener acceso a los lugares más favorables donde posicionarse en el ambiente, lo que requiere tener una gran capacidad para colonizar nichos tan rápido como éstos aparecen o fomentar el desplazamiento activo de otros competidores. Las interacciones competitivas se presentan tanto a nivel intraespecífico como interespecífico (Hibbing et al. 2010).

Se puede categorizar la competencia por recursos limitantes en dos grandes grupos: por arrebatamiento o explotación y contienda o interferencia (Nicholson 1954). Por explotación involucra el rápido aprovechamiento de los recursos limitantes sin que interactúen de manera directa las especies competidoras, por ejemplo mediante la formación de sideróforos (Wandersman & Delepelaire 2004; Khan et al. 2006). En la contienda, en cambio, se requiere la interacción antagonista directa entre competidores, siendo el mejor competidor quien gana el acceso a los recursos. Ejemplo de esto es la producción de sustancias antimicrobianas. Ambas estrategias pueden observarse en el mundo microbiano (Hibbing et al. 2010). La mayoría de estos mecanismos funcionan para restringir

de manera activa el crecimiento, o bien remover el nutriente de un organismo para que otro pueda aprovecharlo (Hibbing et al. 2010).

En comunidades microbianas, la producción de sustancias químicas es de las armas más recurrentes, principalmente entre bacterias (Czaran et al.2002; Ratcliff & Denison 2011; Vetsigian et al. 2011) como el caso de los antibióticos, enzimas de lisis y bacteriocinas para defender su nicho en contra de competidores (Hentschel et al. 2001; Parret and De Mot 2002; Riley et al. 2003)

En ecología microbiana las interacciones antagonistas pueden ser utilizadas como modelo de estudio de sistemas de contienda directa. Las bacterias se valen de estrategias como la depredación como el caso de los géneros *Bdellovibrio* y *Myxococcus*, también la producción de agentes antimicrobianos de naturaleza proteínica como son bacteriocinas (Riley, Margaret a 1999; Šmarda et al. 2007) y antibióticos (Hibbing et al. 2010), que son producidos por muchos linajes bacterianos (Riley & Gordon1999; Gardner et al. 2004; Riley et al. 2003; Riley & Wertz 2002) y sustancias de otra naturaleza química (Toribio et al. 2011). Estas estrategias de competencia representan costos en el desempeño del organismo que las produce (Gardner et al. 2004). Se ha observado que estas interacciones por agentes antimicrobianos tienden a ser más intensas en tanto las especies son más cercanas ecológica y filogenéticamente (Riley & Wertz 2002), aunque se ha visto que diferentes sustancias actúan en un amplio espectro (Parret & De Mot 2002; Šmarda et al. 2007; Vetsigian & 2011; Li et al. 2012).

A pesar de que el principio de exclusión competitiva puede ser demostrado en bacterias en cultivo, hay mecanismos que resultan en interacciones complejas, que pueden favorecer la coexistencia (Kerr et al. 2002). Anteriormente, se pensaba que la producción de sustancias antimicrobianas estaba restringida a las bacterias Gram positivas (Rosenfeld & Zobell 1947) aunque más tarde se demostró que también las Gram negativas poseen este carácter (Gauthier en Nair & Simidu 1987). Como ejemplo de algunas bacterias que utilizan estos mecanismos, en las γ -Proteobacteria se encuentran comúnmente en bacterias como *Pseudomonas*, *Alteromonas* y *Vibrio* (Nair & Simidu 1987). Es común que haya bacterias ambientales con capacidades inhibitorias hacia otras bacterias (Burkholder et al. 1966; Nair & Simidu 1987), sobre todo bacterias heterotróficas (Nair & Simidu 1987). Hay aislados de bacterias marinas pertenecientes a la familia Pseudomonadaceae que producen sustancias capaces de inhibir a bacterias Gram positivas sin inhibir a miembros de su propia familia (Burkholder et al. 1966). No obstante, se ha reportado que la interacción entre cepas de *Pseudomonas* de ambientes oligotróficos es más compleja de lo que parece, pudiendo haber interacción entre bacterias pertenecientes a éste mismo género (Aguirre-von-Wobeser et al. 2014).

Estas sustancias pueden actuar en un espectro de acción amplio, inhibiendo organismos tanto lejanos como cercanos filogenética y ecológicamente, pudiendo representar alguna ventaja en la competencia por alimento y espacio, así como en la adhesión a un sustrato (Nair & Simidu, 1987). Se plantea también que la producción y amplitud de acción de las sustancias dependerá en alguna medida

del medio en el que se cultivan las bacterias (Okami en Nair & Simidu 1987; Cha et al. 2008).

Se tiene poca información sobre la amplitud de acción de las bacteriocinas dentro de las comunidades; la mayoría de los estudios están más enfocados a las interacciones intraespecíficas. Esto probablemente se debe en parte a que algunas de las sustancias estudiadas anteriormente, particularmente las bacteriocinas, presentan un rango de acción restringido (James et al. en Riley et al. 2003).

Aunque el papel de las sustancias antimicrobianas como inhibidoras del crecimiento de otras bacterias, para obtener una ventaja competitiva está sustentado por un amplio cuerpo teórico y experimental (Riley et al. 2003; Riley & Gordon 1999; Czárán & Hoekstra 2003; Czaran et al. 2002), existe controversia acerca de su papel en el ambiente, y se ha propuesto que juegan también un papel en la manipulación de otras bacterias, o incluso en la comunicación entre las propias cepas productoras (Ratcliff and Denison 2011). Se ha propuesto que la acción de estas sustancias puede estar involucrada en la interacción que se presenta cuando un microorganismo arriba a una población establecida, eliminando a los posibles competidores; y a la inversa, de manera defensiva para evitar que los invasores se integren a la comunidad o evitar que las células vecinas continúen su avance (Riley et al. 2003).

Las interacciones mediadas por la producción de agentes antimicrobianos frecuentemente se dirigen a organismos ecológicamente cercanos a la bacteria

que produce las sustancias antagonistas. En algunos sistemas la cercanía de los nichos ecológicos se correlaciona con la cercanía filogenética, por lo que estas sustancias tienden a inhibir el desempeño de organismos filogenética y ecológicamente relacionados (Riley & Wertz 2002; Parret & De Mot 2002; Šmarda et al. 2007).

Sin embargo, en otros sistemas no se mantiene esta relación, pues se ha visto que una cepa es capaz de inhibir a un amplio espectro de competidores (Riley & Wertz 2002; Parret & De Mot 2002; Mayali & Azam 2004; Šmarda et al. 2007; Vetsigian, et al. 2011).

En ciertos sistemas la cooperación entre conespecíficos en microorganismos se ve favorecida. Tal es el caso de la producción de antibióticos, donde ésta puede favorecer la competitividad de las poblaciones que los producen, en vez de solo incrementar el éxito de un individuo (Cordero et al. 2012).

Bacterias de Cuatro Ciénegas

En Cuatro Ciénegas se presenta una gran diversidad de microorganismos de los dominios Bacteria y Arquea (Souza et al. 2004; Souza et al. 2006; Cerritos et al. 2011; Bonilla-Rosso et al. 2012). Para su estudio, se han empleado métodos dependientes e independientes de cultivo, lo que ha demostrado que las comunidades de Cuatro Ciénegas son muy diferentes entre sí (Souza et al. 2004; Souza et al. 2006; Cerritos et al. 2011; Bonilla-Rosso et al. 2012). Datos metagenómicos revelan que Cuatro Ciénegas presenta una alta diversidad de bacterias a pesar de ser un sitio oligotrófico. Esta diversidad está representada por

un gran número de linajes, aunque la composición entre metagenomas es contrastante igual que sus ambientes de procedencia (Bonilla-Rosso et al. 2012).

Antecedentes

Se ha comprobado el potencial antimicrobiano de sustancias que producen las bacterias (Riley & Gordon 1999; Riley & Wertz 2002), lo cual históricamente inició por la búsqueda de químicos con acción antibacteriana para el manejo de cepas clínicas (Burkholder et al. 1966). Posteriormente, se realizaron estudios sobre la producción de sustancias inhibitorias por bacterias ambientales (Hibbing et al. 2010) aunque sin enfocarse concretamente en el papel ecológico que juegan estas estrategias. Fue recientemente que se empezaron a plantear las interrogantes de manera más dirigida hacia el papel ecológico de la producción de sustancias antibacterianas (Riley & Gordon 1999; Long & Azam 2001; Mangano et al. 2009; Hawlena et al. 2010; Pérez-Gutiérrez et al. 2012; Aguirre-von-Wobeser et al. 2014).

Hay una gran diversidad de organismos productores de una amplia variedad de sustancias antimicrobianas (Hibbing et al. 2010) tales como las colicinas (Chao & Levin 1981; Šmarda et al. 2007), piocinas (Michel-Briand & Baysse 2002), turincinas (Abriouel et al. 2011), lantabióticos (Mulders et al. 1991) y duramicina (Hécharde & Sahl 2002), por mencionar algunas. Estas sustancias presentan un espectro de acción reducido, es decir, actúan sobre organismos filogenéticamente cercanos a las cepas productoras (Riley & Wertz 2002; Parret & De Mot 2002; Šmarda et al. 2007). Por otro lado, también se han encontrado sustancias con

espectro de acción amplio como fenazinas, 2,4-diacetilfloroglucinol, pioluteorina, pirrolnitrina, lipopéptidos y ácido cianhídrico, capaces de actuar incluso en organismos filogenéticamente lejanos como hongos y nemátodos (Haas & Keel 2003).

Un buen modelo de estudio sobre organismos productores de sustancias antimicrobianas, abundantes y versátiles en sus hábitats son las bacterias del género *Pseudomonas*, ya que se conoce poco el espectro de acción de las sustancias antimicrobianas que producen (Nair & Simidu 1987; Burkholder et al. 1966; Haas & Keel, 2003). Son también productoras de sustancias distintas a antibióticos pero con propiedades inhibitorias hacia bacterias no tan estrechamente relacionadas (Toribio et al. 2011).

Cuatro Ciénegas es un oasis que presenta una alta diversidad de microorganismos (Souza et al. 2006). Existen varios estudios sobre la diversidad de comunidades de bacterias que allí podemos encontrar (Souza et al. 2006; Desnues et al. 2011; Escalante et al. 2008; Breitbart et al. 2009; Cerritos et al. 2011; Bonilla-Rosso et al. 2012). Dentro de la gran diversidad de bacterias, cabe mencionar la presencia de organismos endémicos aún en géneros cosmopolitas con alta capacidad de dispersión, como *Bacillus*; organismos marinos del género *Rheinheimera*, bacterias similares a simbioses de moluscos marinos del género *Teredinibactertunerae*, así como otras cercanas a *Rhodobacter* marinas. En las cuevas de Cuatro Ciénegas se encuentran bacterias oxidantes del azufre muy similares a simbioses de gusanos de trincheras hidrotermales del Atlántico, así

como bacterias típicas de glaciales y arqueas de sedimentos marinos. También hay organismos halófilos y halotolerantes de relevancia astrobiológica como *Halomonas*, *Vibrio*, *Oceanomonas* y la arquea *Halobacterium*, así como representantes del género *Magnetospirillum* y *Aquaspirillum* (Souza et al. 2004), por mencionar a grandes rasgos la diversidad de bacterias de este lugar.

A la fecha, se ha podido demostrar correlación con las condiciones ambientales y la estructura de las comunidades microbianas en *Pseudomonas* de 2 temporadas (invierno vs verano Rodríguez-Verdugo et al. 2012), de *Exiguobacterium* asociado o al sedimento o al agua (Rebollar et al. 2012) y de bacterias termoresistentes que responden a la salinidad (Cerritos et al. 2011) así como variación de la composición de comunidades en mesocosmos con diferentes cantidades de nutrientes (Ponce-Soto et al. 2015), reflejando de alguna manera la distribución de la diversidad de las bacterias de acuerdo a sus adaptaciones al ambiente y partición del nicho, lo cual ofrece una aproximación al entendimiento de cómo se estructuran las comunidades bacterianas en Cuatro Ciénegas. Por otra parte, además de componentes abióticos, existen tres estudios que abordan explícitamente el papel que las interacciones ecológicas pueden tener en la estructura de la diversidad observada en un sitio particular dentro de Cuatro Ciénegas denominado Churince (Pérez-Gutiérrez et al. 2012; Aguirre-von-Wobeser et al. 2014; Ponce-Soto et al. 2015).

Pérez-Gutiérrez et al. (2013) estudiaron las interacciones entre cepas co-ocurrentes del género *Bacillus* aisladas de sedimento, con el propósito de

entender la influencia de las interacciones de interferencia y determinar el potencial antagonista de estas cepas, comparando las interacciones dentro del mismo sitio de muestreo, así como entre sitios. Encontraron que hay menos interacciones antagonistas dentro de cada sitio que entre sitios, sugiriendo que las interacciones antagonistas influyen el arreglo de la comunidad en cada sitio. Además el antagonismo y la sensibilidad pueden estar asociados a grupos taxonómicos específicos de *Bacillus* arreglando a éstos grupos en una red estructurada a manera de cadena trófica (Pérez-Gutierrez et al. 2012). Aguirre et al. (2014) presenta las interacciones entre un grupo de aislados de la columna de agua, del género *Pseudomonas* y otros relacionados. Representando las interacciones como una red, se encontró que algunas de las cepas fueron altamente inhibidoras; es decir, tenían efecto antagonista sobre las demás cepas sin ser inhibidas por éstas, o siendo inhibidas con menor intensidad. Aún en los subgrupos de cepas sensibles y cepas inhibidoras se presentaron inhibiciones entre estas cepas, demostrando que las redes de interacción entre bacterias son muy complejas. Al igual que en Pérez-Gutierrez (2013) en este estudio se obtuvo una red a manera de cadena trófica.

Justificación

Dada la enorme diversidad de microorganismos en el planeta, la interrogante de las causas subyacentes a ella es común en ecología microbiana. Como se discutió anteriormente, en ecología existen dos grandes visiones sobre estas causas, la

neutral y la determinista. Desde una perspectiva adaptativa y de partición de nicho, la visión determinista incluye a las interacciones como uno de los factores importantes en la construcción del nicho y en la generación y mantenimiento de la biodiversidad. En particular, la competencia ha tenido un lugar central en la discusión. Así, y desde un punto de vista evolutivo, se ha establecido que la competencia entre organismos más cercanos filogenéticamente debe ser más intensa debido a que comparten un mayor número de dimensiones del nicho que ocupan.

Una localidad en donde existe particular interés por investigar las causas de la diversidad microbiana, dada la extrema oligotrofia de sus ambientes, es el valle de Cuatro Ciénegas en Coahuila, México. Esta localidad se ha convertido en un modelo de estudio sobre las causas de la diversidad microbiana, y esta investigación contribuye desde el estudio de las interacciones entre cepas del género *Pseudomonas*, reportadas como abundantes y productoras de antimicrobianos, y cepas de otros géneros aislados de los mismos sitios.

De este modo, el objetivo e hipótesis del trabajo son:

Objetivo

- Determinar la amplitud filogenética de la inhibición de crecimiento bacteriano por cepas aisladas de *Pseudomonas* en Cuatro Ciénegas

Hipótesis

Ho. La acción inhibitoria de las sustancias antimicrobianas de las *Pseudomonas* probadas en este estudio, es dependiente de la distancia filogenética de la cepa contendiente. A mayor distancia filogenética menor acción inhibitoria.

HA. La acción inhibitoria de las sustancias antimicrobianas de las *Pseudomonas* probadas en este estudio no sigue un patrón dependiente de la distancia filogenética entre cepas contendientes.

Métodos

Área de estudio

Cuatro Ciénegas Coahuila

Cuatro Ciénegas es un valle en el desierto Chihuahuense que contiene cientos de cuerpos de agua (Minckley & Cole 1968). Se encuentra en la parte central del estado de Coahuila, México, y forma parte del desierto Chihuahuense; se localiza a 26° 59' N y 102° 04' W (Minckley 1969) con una extensión de 3,632.6 km² (coordenadas del polígono: latitud 27°11'24" - 26°42'36" N, longitud 102° 48' 00" – 101° 54' 36" W) (CONABIO 2014).

Los cuerpos de agua se caracterizan por ser pobres en nutrientes (oligotróficos), principalmente en fósforo, por lo que el crecimiento de algas es limitado y se ha sugerido que la red trófica del lugar está sustentada por bacterias (Souza et al. 2006). Presenta los niveles de fósforo más bajos reportados para aguas continentales, lo que ejerce una fuerte presión selectiva en la estructura y función de las comunidades biológicas (Elser et al. 2005).

A pesar de su extrema oligotrofia, Cuatro Ciénegas tiene la más alta biodiversidad endémica de Norteamérica como resultado de su aislamiento geográfico (Stein et al. 2000). También hay una gran diversidad de procariontes y virus (Souza et al. 2006; Desnues et al. 2011; Bonilla et al. 2012) así como un gran potencial metabólico de estos organismos (Breitbart et al. 2009; Peimbert et al. 2012). Aunque hay especies compartidas entre sitios, la composición en cada lugar estudiado dentro del Valle de Cuatro Ciénegas es contrastante y a pesar de la presencia de organismos similares a bacterias marinas y de lugares distantes, los datos sugieren que son residentes de los cuerpos de agua de esta localidad (Souza et al. 2006; Souza et al. 2012).

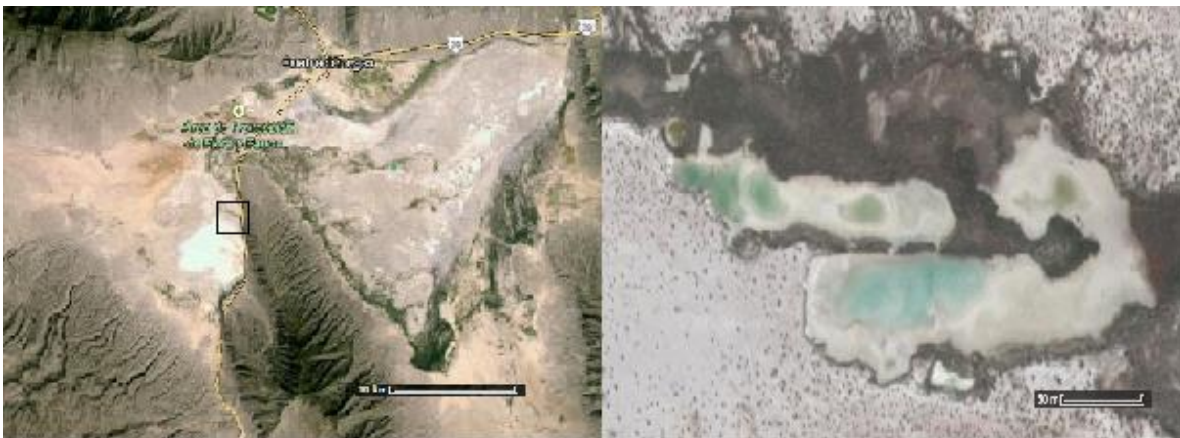


Figura 1. Mapa de Cuatro Ciénegas (izquierda) y mapa de Laguna intermedia en Churince (derecha).

Sistema Churince

El sistema Churince se localiza en la región oeste del valle de Cuatro Ciénegas (Figura 1). Este sistema comprende tres diferentes zonas conectadas por pequeños cauces de agua; un manantial, seguido por una laguna intermedia (sitio

donde se llevó a cabo el muestreo del presente estudio) y una gran laguna de desecación (Laguna Grande). Este sistema mide alrededor de 3 km de longitud. Es un sistema caracterizado por fuertes gradientes ambientales (Cerritos et al. 2011). Las concentraciones de calcio, magnesio, sodio, potasio, cloruro y sulfatos se incrementan del manantial hacia la laguna de desecación y el pH también aumenta en ese sentido (Johannesson et al. 2004; Cerritos et al. 2011). Sin embargo, desde el 2006 la laguna de desecación esta seca y la laguna intermedia esta en peligro de perderse debido a la sobre explotación del acuífero. Se sabe que el origen del agua profunda en el Churince es muy antigua y que sube a la superficie debido al calor magmático que se encuentra bajo la sierra de San Márcos y Pinos por lo que este ecosistema se ve dominado por sulfatos y depende sobre todo de la recarga del humedal (Johannesson et al. 2004; Wolaver et al. 2013).

Muestreo y aislamiento de cepas

Se llevó a cabo la obtención de muestras de columna de agua superficial en la laguna intermedia del sistema Churince. Se tomaron las muestras de agua en tubos Falcon y se almacenaron y transportaron a 4°C para su posterior manipulación.

Se realizaron diluciones 1:10000 con solución fisiológica, y se tomaron 200 µL de estas para plaqueo en cajas de Petri con medio sólido. Se incubaron a temperatura ambiente y se realizó el aislamiento de las colonias que crecieron.

Las primeras colonias conspicuas se presentaron a las 48 horas de incubación. Se seleccionaron 47 cepas, las cuales fueron estriadas y cultivadas en serie con el propósito de obtener líneas de cultivo puras.

Las cepas de *Pseudomonas* potenciales antagonistas se aislaron previamente de este mismo sitio en medio PIA, seleccionándose solo aquellas que resultaron ser las 10 más antagonistas en el estudio de Aguirre et al. 2014

Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados fueron: Luria Bertani (LB) y Medio Marino (MM). El medio LB es ampliamente utilizado por muchos microbiólogos pues permite el rápido crecimiento de diferentes especies (Sezonov et al. 2007). Para preparar un litro de medio LB se añadieron 10 g de Peptona de caseína, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl. Para preparar el medio sólido se añadió 15 g de agar. El Bacto Agar Marino o medio marino (MM) Difco 2216 también se utiliza para crecer una amplia variedad de microorganismos (Denner et al. 2006). Se utilizó una versión modificada de Bacto Agar Marino 2216. Para preparar un litro de MM se disolvió en 970 ml de H₂O, 5 g de peptona de caseína, 1 g de extracto de levadura, 20 g de NaCl, KBr 0.08 g, SrCl₂ 0.34 g, H₃BO₃ 0.022 g, NaF 0.024 g, (NH₄)₂NO₃ 0.026 g, Na₂HPO₄ 0.08 g, Na₂SiO₃ 10 µL, MgCl₂ 2.2 g, Na₂SO₄ 1 g, CaCl₂ 0.4 g, KCl 0.2 g, NaHCO₃ 0.1 g; aparte se disolvió en 30 mL de H₂O, 0.1 g de FeC₆H₅O₇, que una vez esterilizados se incorporaron a la solución. Para preparar medio sólido se añadió 15 g de agar (Avitia comunicación personal).

Determinación taxonómica de cepas

La determinación taxonómica de las cepas aisladas se realizó mediante la determinación de la secuencia del gen 16S rRNA y su comparación en la base de datos del sitio web de Ribosomal Database Project Release 10, update30 (Cole et al. 2009).

Extracción y purificación de DNA

Para cada cepa aislada se extrajo DNA genómico. El protocolo utilizado es el sugerido por el kit DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Alemania). Antes de la extracción de DNA las cepas de este estudio fueron crecidas por 18 h hasta obtener una densidad celular suficiente para extraer DNA. Se tomó 1 mL de volumen de bacterias en medio de cultivo y colocó en tubos Eppendorf de 1.5 mL, se centrifugaron a 10 000 rpm durante 1 min para separar las células del medio de cultivo. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón de células con 500 μ L de $MgSO_4$ (50mM). Se incubó por media hora a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 7500 rpm, se descartó el sobrenadante y se conservó el precipitado de células. Se resuspendió en 180 μ L de solución de lisis (Buffer de lisis con 200 mM Tris-HCl pH=8, 2mM EDTA; Triton 1.2% y lisozima 20 mg/mL) y se incubó a 37°C por 30 min. Al finalizar este paso se añadió 20 μ L de proteinasa K y 200 μ L de buffer AL del kit de DNeasy. Se resuspendió y después se incubó a 70°C por 30 min. Al término de este paso se añadieron 200 μ L de etanol 100% y se agitó en un Vortex. Todo el contenido se tomó y colocó en una microcolumna del kit y se centrifugó un minuto a 8000 rpm. Se recuperó la columna, y fue colocada en otro tubo colector. Se añadió a la columna 500 μ L de

buffer AW1 y se centrifugó a 8000 rpm por un minuto. Se recuperó la columna, se colocó en un tubo colector nuevo, se añadieron 500 µL de buffer AW2 y se centrifugó a 14 000 rpm por tres minutos. Se recuperó la columna y se colocó sobre un tubo Eppendorf (donde se colectó el DNA puro) y a la columna se le añadieron 100 µL de buffer AE y se centrifugó a 8000 rpm un minuto. Finalmente, sin quitar la columna del tubo Eppendorf, se añadieron 50 µL de H₂O ultrapura (Sigma ®) y se descartó la columna. En el tubo Eppendorff quedó DNA purificado de buena calidad.

Amplificación del gen 16S rRNA por PCR

Para preparar la reacción de amplificación de PCR se mezclaron 3 µL de Cloruro de Magnesio (MgCl₂ 1.5 mM), 5 µL de buffer de reacción (1x), 1 µL de dNTPs (200 µM), 1 µL de oligo forward y 1 µL de oligo reverse (0.2 µM) [27Forward (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3'), y 1492Reverse (5'CGGTTACCTTGTTACGACTT 3') (Lane 1991)], enzima de amplificación Amplificasa® 0.2 µl (1U), 1 µL de DNA muestra y 37.8 µL de H₂O. Todas las muestras se amplificaron en un termociclador Techne TC 3000 (Barloworld Scientific, Staffordshire, UK). La amplificación se llevó a cabo en tres pasos. Primero: se subió la temperatura del termociclador a 94° C por un minuto. Segundo: se repitieron 35 ciclos con las siguientes características: se elevó la temperatura a 94°C por 1 min, para desnaturalizar el DNA, se bajó la temperatura para alinear los primers a 52°C por 1 min y finalmente se subió a 72°C por un minuto para llevar a cabo la extensión. Tercero: se mantuvo a 72°C por 5 min para una extensión final y finalmente se bajó a 4°C. Los productos fueron purificados

en columnas de purificación Centrisep. Los productos fueron secuenciados en un secuenciador 3500XL Life Technologies utilizando el protocolo establecido para el kit BigDye® Direct Sequencing (Life Technologies Carlsbad, CA, USA).

Análisis filogenético y determinación taxonómica

Se revisaron los histogramas usando el programa Chromas 2.4 (Technelysium Pty Lsd© 2014) para seleccionar aquellas áreas de la secuencia que presentaron mejor calidad y descartar aquellos segmentos poco claros. Los fragmentos de secuencia de buena calidad se colocaron en un solo archivo en formato FASTA y se alinearon usando MUSCLE (Edgar 2004) y posteriormente se realizó una revisión manual de la alineación. Para la reconstrucción del árbol filogenético se llevó a cabo un análisis de máxima verosimilitud con RaxML-HPC2 8.0.24 en Cyberinfraestructure for Phylogenetic Research CIPRES (Stamatakis 2006; Miller, et al. 2010). Además del árbol principal, se generaron 1000 árboles a partir de remuestreos aleatorios con reemplazo (remuestreo tipo bootstrap), y los porcentajes de aparición de cada rama en los remuestreos fueron calculados por RaxML. Para la identificación taxonómica se empleó la herramienta Compare de Greengenes (DeSantis et al. 2006), en la opción BLAST, la cual arrojó una tabla con el contenido de datos taxonómicos de cada una de las secuencias.

Ensayo de competencia

Se seleccionaron 11 cepas de *Pseudomonas* aisladas de la Laguna Intermedia de Churince (las más antagonistas reportadas en el estudio de Aguirre et al. 2014) para probar antagonismo sobre las 47 cepas aisladas del Churince. Las interacciones fueron probadas por el experimento de plato de Burkholder

(Burkholder et al. 1966), ya que en medio semisólido pueden coexistir con las productoras y ser observadas sus interacciones (Chao & Levin 1981; Greig & Travisano 2008). Se formó un tapete de células con cada una de las 47 cepas del Churince para probar su sensibilidad a las 11 cepas de *Pseudomonas* antagonistas. El tapete se creó mezclando 1 mL de cultivo de las cepas potencialmente sensibles crecidas a fase exponencial (Densidad óptica a 600 nm 0.4 – 0.7) con 2.5 mL de medio agar suave 0.7% (LB o MM según hayan sido aisladas las cepas); la mezcla se esparció uniformemente sobre medio sólido en caja de Petri de tal manera que se obtuvo una capa con células potencialmente sensibles. Se dejó secar 10 minutos e inmediatamente se colocó sobre el tapete una gota de 3 μ L de cultivo de cada una de las cepas de *Pseudomonas* antagonistas a fase exponencial. Se dejaron crecer durante 16-20 horas, y concluido ese tiempo, se evaluó la presencia de halos de inhibición. El experimento se llevó a cabo por triplicado. Se asignaron valores en una escala de 0-5 para la presencia de halos de inhibición, donde 0 es que no se presenta halo y 5 es que hay halo claro.

Análisis de datos

Los resultados del ensayo de competencia se registraron en una matriz donde en las filas se ordenan las cepas potencialmente sensibles y en las columnas las cepas de *Pseudomonas* del estudio de Aguirre et al. (2014) que son las antagonistas. Con estos datos se construyó un heatmap en Matlab (The Mathworks, USA) ordenando las cepas (tanto sensibles como antagonistas) de acuerdo a su filogenia.

Para identificar diferencias significativas ($P < 0.05$) en la capacidad de inhibición de las cepas antagonistas (*Pseudomonas*), se realizó una prueba no paramétrica de análisis de varianza Kruskal-Wallis con ayuda del programa R (R core Team 2013). Posteriormente se aplicó una prueba post-hoc de Nemenyi para identificar los pares de cepas antagonistas con diferencias significativas en su capacidad de inhibición.

Para probar la posible relación entre la distancia filogenética y la actividad inhibitoria por parte de la colección de cepas de *Pseudomonas* antagonistas se realizó un análisis de regresión lineal para cada cepa de *Pseudomonas*. La distancia filogenética se determinó como la suma de distancias desde el nodo común más cercano, hasta cada una de las dos cepas, en el árbol filogenético construido previamente (figura 4), estos cálculos se realizaron en Matlab (The Mathworks, USA).

Resultados

Determinación taxonómica de aislados

Con el fin de obtener una colección de microorganismos para los experimentos de antagonismo, se llevó a cabo un muestreo de columna de agua superficial en la Laguna Intermedia, del sistema Churince, en Cuatro Ciénegas Coahuila, México (26.84810° N, 102.14160° W), en noviembre de 2012 (Fig. 1). Se seleccionaron 47 colonias y se aislaron hasta obtener cultivos puros, a los que posteriormente se les

extrajo el DNA y se amplificó y secuenció el gen 16S rRNA para su determinación taxonómica.

Tabla 1. Determinación taxonómica de las cepas muestreadas

Cepa	Phylum	Género	Cepa	Phylum	Género
MMV3-91	Actinobacteria	<i>Micrococcus</i>	LBV2-7.2	γ -Proteobacteria	<i>Acinetobacter</i>
MMV1-95	Actinobacteria	<i>Micrococcus</i>	LBV2-7	γ -Proteobacteria	<i>Acinetobacter</i>
LBV1-106	Actinobacteria	<i>Micrococcus</i>	LBV1-35	Firmicutes	<i>Staphylococcus</i>
MMV2-25.2	Actinobacteria	<i>Kocuria</i>	MMV3-41	Firmicutes	<i>Staphylococcus</i>
MMV2-25	Actinobacteria	<i>Kocuria</i>	MMV4-13	Firmicutes	<i>Staphylococcus</i>
MMV3-34	Actinobacteria	<i>Kocuria</i>	MMV1-RX2	Firmicutes	<i>Bacillus</i>
MMV3-35	Actinobacteria	<i>Kocuria</i>	MMV1-113	Firmicutes	<i>Bacillus</i>
MMV1-95.2	Actinobacteria	<i>Williamsia</i>	LBV3-101	Firmicutes	<i>Bacillus</i>
LBV3-93	Actinobacteria	<i>Williamsia</i>	LBV1-168	Firmicutes	<i>Bacillus</i>
MMV1-92.2	Actinobacteria	<i>Williamsia</i>	LBV3-106	Firmicutes	<i>Bacillus</i>
LBV5-20	Actinobacteria	<i>Williamsia</i>	MMV3-64	Firmicutes	<i>Bacillus</i>
LBV2-104	Actinobacteria	<i>Williamsia</i>	MMV3-33	Firmicutes	<i>Bacillus</i>
MMV1-92	Actinobacteria	<i>Williamsia</i>	MMV1-57	Firmicutes	<i>Bacillus</i>
MMV3-13	Actinobacteria	<i>Williamsia</i>	MMV1-55	Firmicutes	<i>Bacillus</i>
MMV3-56	Actinobacteria	<i>Brachybacterium</i>	LBV1-26.2	Firmicutes	<i>Bacillus</i>
LBV1-261	Actinobacteria	<i>Janibacter</i>	MMV3-24	Firmicutes	<i>Bacillus</i>
LBV2-94.2	Actinobacteria	<i>Dermaococcus</i>	MMV3-19	Firmicutes	<i>Bacillus</i>
LBV3-135	Actinobacteria	<i>Kytococcus</i>	LBV1-116.2	Firmicutes	<i>Bacillus</i>
LBV3-135.3	Actinobacteria	<i>Kytococcus</i>	MMV2-116	Actinobacteria	<i>Microbacterium</i>
LBV3-135.2	Actinobacteria	<i>Agrococcus</i>	MMV1-80	Actinobacteria	<i>Microbacterium</i>
LBV5-18.2	Actinobacteria	<i>Agrococcus</i>	MMV364.2	Actinobacteria	<i>Microbacterium</i>
LBV5-18	Actinobacteria	<i>Agrococcus</i>	MMV3-164	Actinobacteria	<i>Microbacterium</i>
LBV2-150	α -Proteobacteria	<i>Brevundimonas</i>	LBV1-26	Actinobacteria	<i>Microbacterium</i>
LBV2-111	γ -Proteobacteria	<i>Pantoea</i>			

La determinación taxonómica de cada uno de los aislados se obtuvo al comparar las secuencias con la base de datos de Greengenes (DeSantis et al. 2006), mediante la herramienta de alineamiento local básico de secuencias BLAST (Altschul et al. 1990). En la tabla 1 se muestran los resultados de búsqueda para cada una de las secuencias de los aislados. Principalmente se obtuvieron

bacterias Gram positivas y solo algunas Gram negativas, representantes de Proteobacteria. Cuatro Phyla bacterianos estuvieron representados en las cepas caracterizadas en este estudio, Actinobacteria, Firmicutes y Proteobacteria (γ -Proteobacteria y α -Proteobacteria). El género mejor representado fue *Bacillus* en 13 de los aislados, seguido por *Williamsia* con siete aislados, *Kocuria* y *Microbacterium* con cuatro aislados; con tres aislados por género están *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Agrococcus*; *Acinetobacter* y *Kytococcus* con dos aislados; y representados en un solo aislado *Brevundimonas*, *Pantoea*, *Brachybacterium*, *Janibacter* y *Dermacoccus*.

Variación en el grado de antagonismo de las *Pseudomonas*

En general, las cepas muestreadas presentaron sensibilidad a la inhibición por parte de la colección de *Pseudomonas* previamente seleccionadas. De las 47 cepas probadas en este estudio, 34 fueron inhibidas por al menos una de las cepas antagonistas (Figura 2).

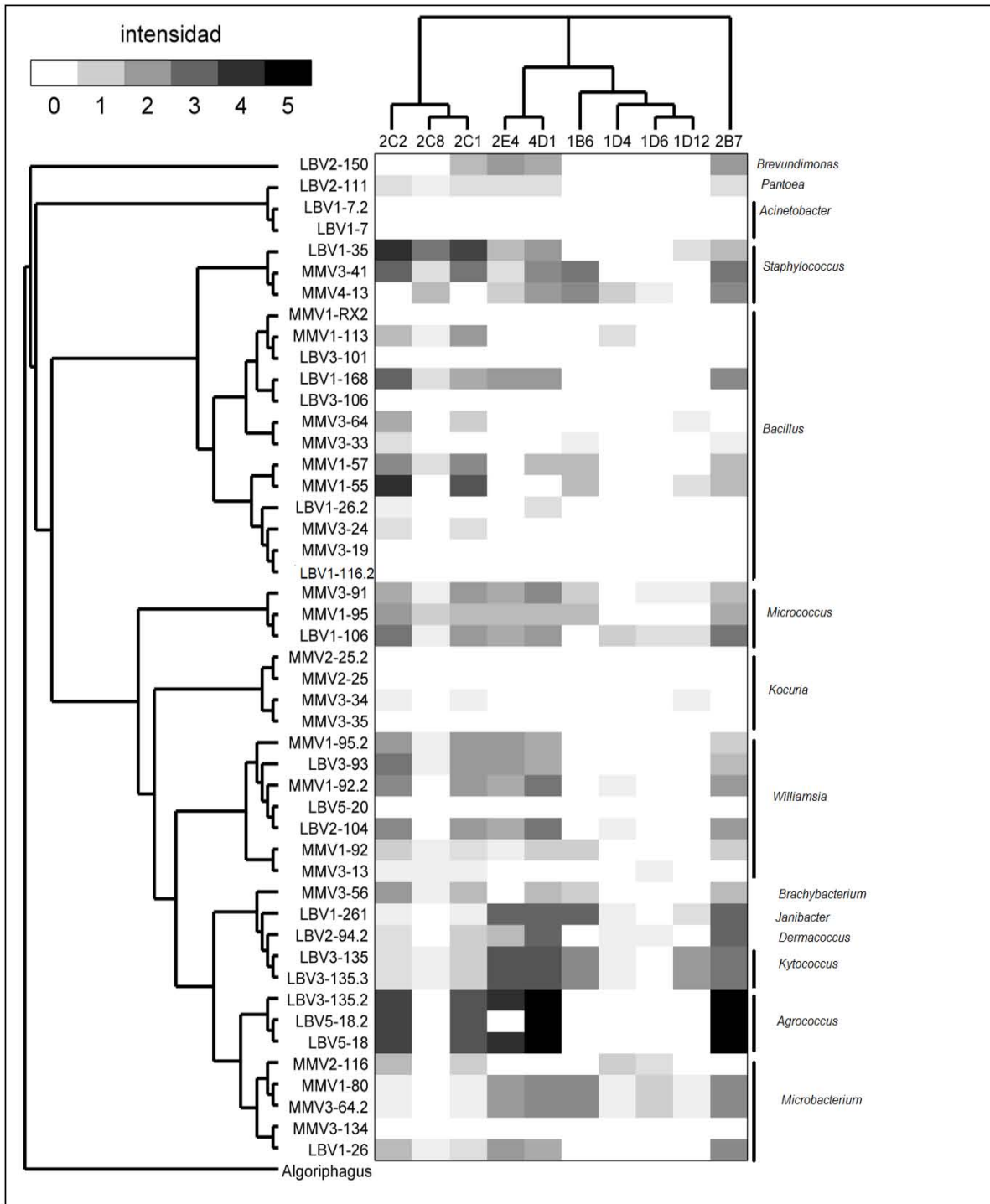


Figura 2. Intensidad de interacción de antagonismo competitivo entre cepas de *Pseudomonas* y las cepas caracterizadas en este estudio. A la izquierda se presenta la filogenia de cepas colectadas para este estudio. Arriba y horizontalmente se presenta la filogenia de cepas de *Pseudomonas* (probadas por Aguirre et al., 2014). A la izquierda arriba se muestra la escala de intensidad que va de 0-5 (blanco-negro) donde cero (blanco) muestra ausencia de inhibición, y cinco (negro) muestra el máximo de intensidad.

Valores <i>p</i> prueba post-hoc de Nemenyi entre cepas antagonistas										
	2C2	2C8	2C1	2E4	4D1	1B6	1D4	1D6	1D12	2B7
2C2		-	-	-	-	-	-	-	-	-
2C8	0.00953		-	-	-	-	-	-	-	-
2C1	1	0.02847		-	-	-	-	-	-	-
2E4	0.8632	0.53359	0.96379		-	-	-	-	-	-
4D1	0.99998	0.04603	1	0.98488		-	-	-	-	-
1B6	0.02686	1	0.07085	0.73998	0.10751		-	-	-	-
1D4	0.0003	0.998	0.0012	0.0977	0.00228	0.98109		-	-	-
1D6	2.80E-05	0.94929	0.00013	0.02272	0.00028	0.83942	0.99998		-	-
1D12	0.0003	0.99808	0.00123	0.09879	0.00232	0.98156	1	0.99998		-
2B7	1	0.03546	1	0.97498	1	0.08579	0.00161	0.00019	0.00164	-

Tabla2. Valores *p* prueba post-hoc de Nemenyi. En rojo los valores *p* indican las parejas de cepas antagonistas que fueron significativamente diferentes en su acción de inhibición ($p < 0.05$).

Los máximos de inhibición los presentaron las cepas de *Pseudomonas* 4D1 y 2B7 afectando a la rama de LBV3-135.2, LBV5-18.2 Y LBV5-18, rama que corresponde a cepas relacionadas con el linaje de *Agrococcus*. También se presenta fuerte inhibición por parte de las *Pseudomonas* 2C2, 2C1 y 2E4. El menor antagonismo lo presentaron las *Pseudomonas* 2C8, 1B6, 1D4, 1D6 y 1D8. En estas bacterias se presentaron escasos casos de inhibición y éstos fueron de baja intensidad (Figura 2).

La observación cualitativa de diferencias en capacidad de inhibición de *Pseudomonas* se puso a prueba cuantitativamente con una prueba no paramétrica de análisis de varianza Kruskal-Wallis. La prueba arrojó que hay diferencia significativa de inhibición entre las cepas antagonistas (Tabla 2, $p < 0.05$).

De acuerdo con la observación del heatmap y las pruebas estadísticas, podemos distinguir dos grupos de *Pseudomonas*, aquellas que inhiben mayor número de

cepas de géneros distintos y con altos valores de intensidad (2C2, 2C1, 2E4, 4D1 y 2B7, y las que inhiben a un bajo número de otras cepas y además con poca intensidad (2C8, 1B6, 1D4, 1D6 y 1D12). Éstas últimas, todas se agrupan en la misma rama de su filogenia excepto 2C8 que se encuentra en la misma rama que 2C1 y 2C2 que son de las más inhibidoras. 2E4 y 4D1 están en una misma rama mientras 2B7 está sola en una rama. En cada una de las tres ramas donde se presentaron *Pseudomonas* con los más altos valores de inhibición hay una cepa con niveles de intensidad de inhibición cercanos a 5 que es el valor más alto. Estas cepas son 2C2, 4D1 y 2B7.

Variación en el grado de sensibilidad de cepas contendientes

Las cepas caracterizadas en este estudio que presentaron mayor resistencia (menor inhibición por *Pseudomonas*) fueron, por el lado de γ -Proteobacteria LBV1-7.2 y LBV1-7 que están relacionadas con el linaje de *Acinetobacter*. Por el lado de Firmicutes se encontraron entre las más resistentes cepas emparentadas con linajes de *Bacillus* como MMV1-Rx2, LBV3.101, LBV3.106, MMV3-119 y MMV2-116.2. En Actinobacteria el grupo emparentado con el linaje de *Kocuria* (MMV2-25.2, MMV2-25, MMV3-34 y MMV3-35) también se mostró resistente a la acción de las cepas antagonistas. Una de las cepas de *Williamsia*, a diferencia de los otros miembros de la esta rama, LBV5-20 fue resistente al no presentar inhibición por las antagonistas. Lo mismo que en el caso anterior ocurrió con MMV3-134 perteneciente a *Micrococcus*, pues de esta rama, solo este miembro fue resistente al antagonismo de las cepas de *Pseudomonas*.

Como se mencionó con anterioridad, la rama relacionada con *Agrococcus* fue donde se mostró el máximo de sensibilidad a cepas antagonistas. Sin embargo, en otras ramas también se mostró alta sensibilidad, como en el caso de la rama emparentada con *Staphylococcus* (LBV1-135, MMV3-41 y MMV4-13). Aquí cabe resaltar que solo la mitad de las cepas antagonistas inhibieron a las dos primeras cepas sensibles de esta rama. Éstas antagonistas fueron 2C2, 2C8, 2C1, 2E4 y 4D1. El resto de las antagonistas (1B6, 1D4, 1D6 y 1D12) únicamente inhibió a MMV4-13. La única cepa que inhibió a las tres sensibles de este grupo fue 2B7. Este mismo patrón de inhibición donde 2C2, 2C8, 2C1, 2E4, 4D1 y 2B7 son las cepas que mostraron antagonismo. Aquí 2C8 ya no muestra antagonismo de gran intensidad; y el patrón de 1B6, 1D4, 1D6 y 1D12 se conservó pues no son fuertemente inhibidoras, y los pocos casos de inhibición que presentaron fueron de baja intensidad.

La rama de cepas emparentadas con *Micrococcus* y la de *Williamsia* en general se comportaron como un grupo muy sensible, sobre todo el grupo de *Micrococcus* pues las 10 cepas antagonistas mostraron inhibición sobre estas cepas. Las cepas emparentadas con *Williamsia* también fueron sensibles aunque no fueron afectadas por todas las antagonistas, sin embargo la intensidad de inhibición que se presentó fue media (en la escala con valores de 2-3).

Se realizó para cada género de cepas potencialmente sensibles una prueba de Kruskal-Wallis para determinar si las cepas antagonistas inhiben de manera significativamente diferente a éstos grupos. Las bacterias probadas en este

estudio pertenecen a 14 géneros diferentes, por lo tanto se conformaron 14 grupos a analizar. Se partió de la premisa que en general hubo diferencia significativa en la inhibición de *Pseudomonas* sobre las cepas sensibles. Se realizaron pruebas pareadas de *t* para determinar, por grupo taxonómico, si esta inhibición fue significativamente diferente. Hubo grupos donde las cepas antagonistas no inhibieron significativamente diferente ($p > 0.05$) como en el caso de *Brevundimonas* (α -Proteobacteria), *Pantoea* y *Acinetobacter* (γ -Proteobacteria), *Staphylococcus* (Firmicutes), *Micrococcus*, *Kocuria*, *Brachybacterium*, *Janibacter*, *Dermacoccus*, *Kytococcus* y *Mycrobacterium* (Actinobacteria).

Los grupos que si presentaron diferencia significativa de inhibición por *Pseudomonas* ($p < 0.05$) fueron *Bacillus* (Firmicutes), *Williamsia* y *Agrococcus* (Actinobacteria).

Se realizaron las mismas pruebas para cada una de las cepas antagonistas para determinar si inhiben de manera diferente a cada uno de los grupos de bacterias sensibles. En 6 de las 10 cepas de *Pseudomonas* hubo diferencias significativas de inhibición en los grupos de bacterias sensibles ($p < 0.05$). Estas fueron 2C8, 2E4, 4D1, 1B6, 1D6 y 2B7. Para cada una de estas cepas, se hicieron pruebas pareadas con 0.05 de significancia, para saber que grupos de bacterias sensibles fueron inhibidas de manera significativamente diferente por cada una de las antagonistas.

En 2C8 resultó que el grupo de *Bacillus*, *Kocuria*, *Williamsia* y *Mycrobacterium* fue inhibido significativamente diferente a *Agrococcus*, mientras que *Micrococcus* fue

diferente a *Kocuria* y *Microbacterium* ($p < 0.05$). En 2E4 se tienen los mismos resultados, además de que *Kocuria* fue inhibida significativamente diferente a *Williamsia*. En 4D1, en general los grupos fueron inhibidos significativamente diferente, excepto el grupo de *Acinetobacter* y *Dermacoccus*, que no mostraron ser inhibidos de modo significativamente diferente a ningún otro grupo. En cambio el grupo de *Bacillus* fue muy diferente a todos los grupos excepto los dos antes mencionados y *Brachybacterium*. Los grupos de *Brevundimonas* y *Pantoea* solo mostraron diferencia con *Bacillus*, mientras que *Staphylococcus*, además de con éstos, también mostro diferencia con *Kocuria*, y éste último grupo también con *Williamsia*, *Dermacoccus* y *Micrococcus*. Éste último también fue inhibido con diferente intensidad a *Microbacterium* que a su vez también presentó diferencias con *Kytococcus* que difirió también con *Williamsia* y *Kocuria* ($p < 0.05$).

En el caso de la cepa 1B6, el grupo de *Staphylococcus* mostró intensidad de inhibición significativamente diferente a *Bacillus* y *Kocuria*. *Bacillus* en este caso, al igual que en 4D1 fue el grupo que mostró haber sido inhibido significativamente diferente a un mayor grupo de bacterias. Aquí difirió además de con *Staphylococcus*, con *Micrococcus*, *Williamsia*, *Kytococcus*, *Agrococcus* y *Microbacterium*. El grupo de *Micrococcus* también fue diferente a *Kocuria*, y éste a su vez con *Williamsia* y *Agrococcus* que a su vez difirieron con *Dermacoccus* y *Kytococcus* el primero, mientras el segundo con *Microbacterium* ($p < 0.05$).

En cuanto a 1D6 solo el grupo de *Bacillus* fue inhibido de modo significativamente diferente a *Brachybacterium*, *Janibacter*, *Dermacoccus* y *Microbacterium*, mientras

que *Kytococcus* fue diferente a *Agrococcus*. Mientras que en lo que respecta a 2B7 solo hubo diferencia entre *Kytococcus* con *Bacillus* y *Williamsia* que ésta a su vez difirió de *Janibacter* y *Micrococcus*.

Relación entre intensidad de interacción antagónica y distancia filogenética

Se buscó probar si había alguna relación entre la intensidad de inhibición y la distancia filogenética entre las cepas interactuantes. Sin embargo, no se encontró patrón alguno que demuestre que éstas variables estén relacionadas (Figura 3). El análisis de regresión lineal indica que para ninguna cepa de *Pseudomonas* se encontró una relación estadísticamente significativa entre su distancia filogenética con las cepas contendientes y la actividad inhibitoria ($p > 0.05$).

Aunque hubo variaciones en el grado de inhibición, ésta se observó independientemente del grupo taxonómico de la cepa sensible, tanto en cepas relacionadas con *Pseudomonas* (Proteobacteria) como en cepas filogenéticamente lejanas (Firmicutes y Actinobacteria) (Figura 3).

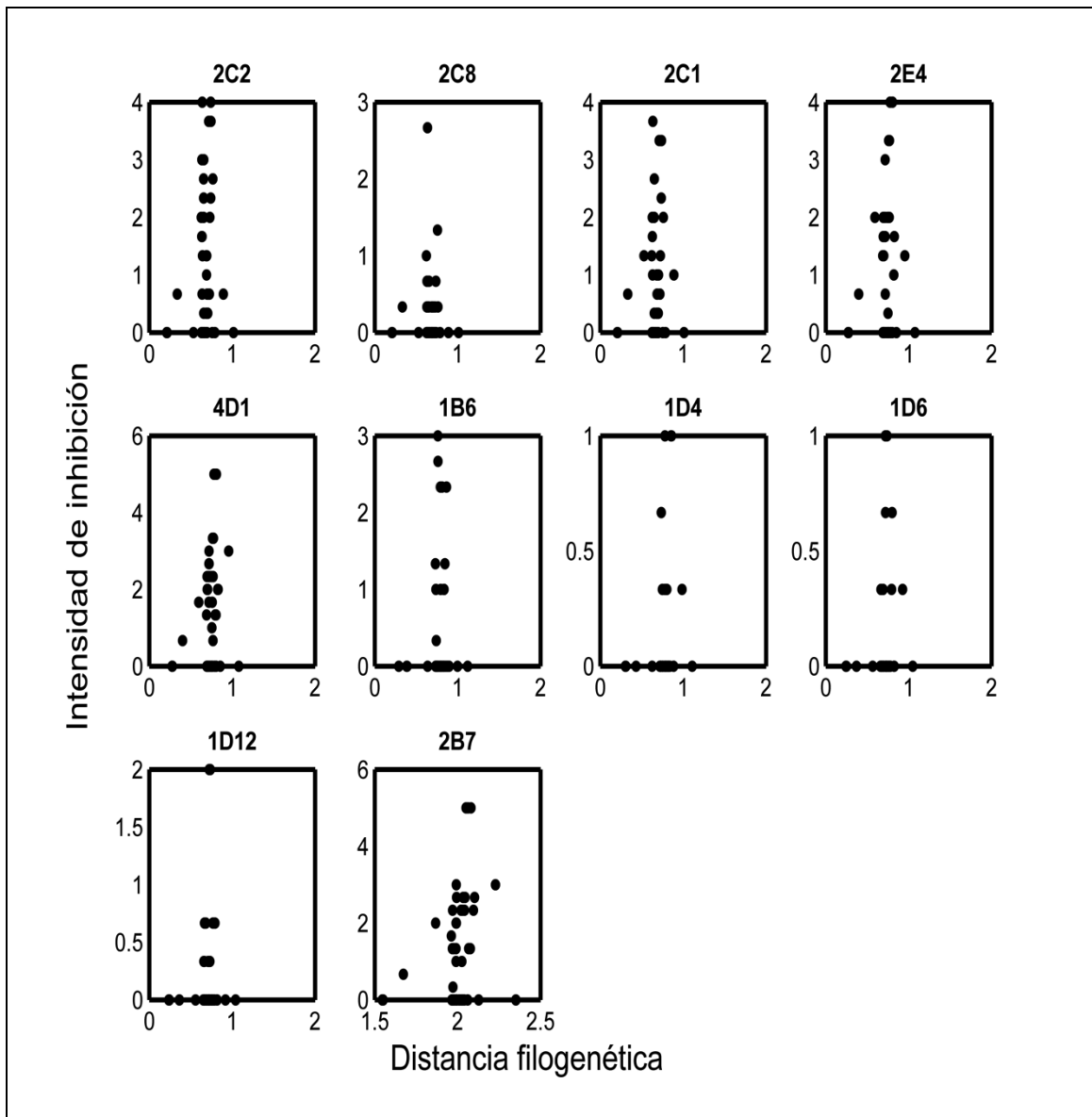


Figura 3. Regresión lineal para cada cepa de *Pseudomonas* antagonista, relacionando la distancia filogenética y la actividad antagonista. En cada panel se grafica en el eje de las abscisas la distancia filogenética y en las ordenadas la intensidad de inhibición.

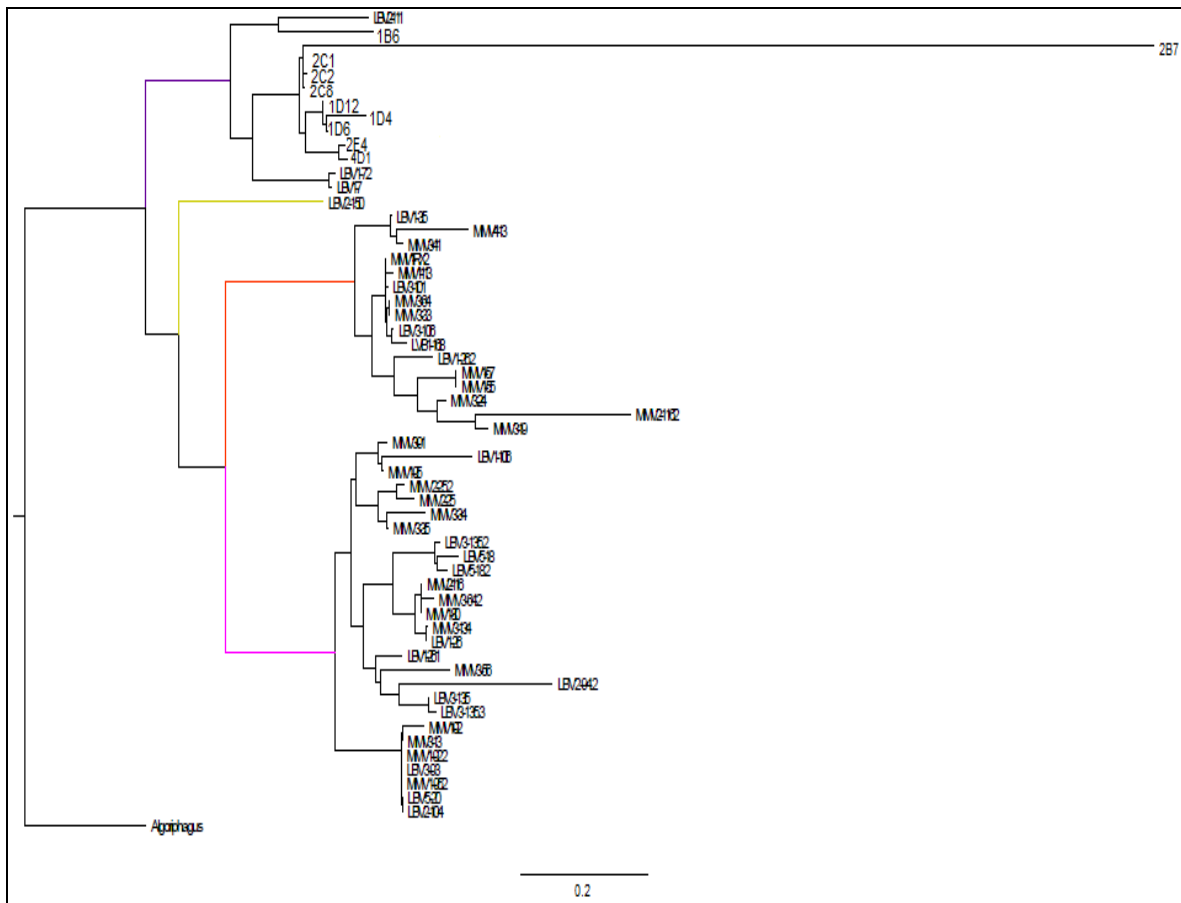


Figura 4. Filogenia con las secuencias de *Pseudomonas* y las 47 cepas caracterizadas en este trabajo. A partir de éste árbol se calcularon las distancias filogenéticas. En morado la rama de γ -Proteobacteria, en amarillo la de α -Proteobacteria, en naranja Firmicutes y en rosa Actinobacteria.

Discusión

El universo de los microbios es uno de los mundos menos explorados dentro de nuestro planeta. A pesar de los esfuerzos realizados por mejorar el conocimiento de la diversidad de microorganismos aún falta mucho por ser explorado acerca de su biología (Green and Bohannan 2006; Van der Gucht et al. 2007; Fuhrman 2009; Barberán & Casamayor 2010; Zhang et al. 2011; Wang et al. 2012; Gobet et al.

2012; Oliveira et al. 2014) La dificultad para aislar bacterias en medios de cultivo complica todavía más el estudio de aspectos particulares de su biología. Por ejemplo, la interacción de antagonismo competitivo entre bacterias solo se puede determinar si se cuenta con cepas aisladas. Si bien la representatividad de la comunidad en medios de cultivo es baja (Whitman et al.1998), al menos se puede abordar el estudio de las interacciones con los aislados conseguidos y así tener una idea directa de cómo se podrían llevar a cabo las interacciones entre microorganismos pertenecientes a una comunidad. Estos cuentan con un gran arsenal de sustancias químicas que tienen efecto antimicrobiano con diferentes espectros de acción (Riley & Wertz 2002). Los hay de amplio espectro como son los antibióticos, que son capaces de inhibir la proliferación de organismos filogenéticamente y ecológicamente relacionados así como aquellos distantes (Hibbing et al. 2010; Czárán et al. 2002; Ratcliff & Denison 2011; Vetsigian et al. 2011; Riley & Gordon1999; Šmarda et al. 2007; Nair & Simidu 1987;Riley et al. 2003). De acuerdo al espectro de inhibición presentado por la colección de cepas de *Pseudomonas* probadas en este estudio, las sustancias que producen estas bacterias presentan un comportamiento parecido al de este último tipo de sustancias. Por lo general son, al igual que las bacteriocinas (aunque éstas son de espectro reducido), sustancias de origen peptídico, aunque hay otras sustancias de naturaleza distinta con atributos inhibitorios, como los biosurfactantes producidos por *Pseudomonas* (Toribio et al. 2011).

Gran parte de los estudios de acción de sustancias antimicrobianas se han enfocado a organismos de interés médico, aislados de ambientes diferentes al de

las bacterias de este estudio. Por lo tanto, resulta valioso abordar estudios en comunidades diferentes al de organismos patógenos, con la finalidad de entender las interacciones antagonistas en bacterias de manera más amplia.

Se han caracterizado sustancias en bacterias ambientales que inhiben a cepas patógenas (Burkholder et al. 1966; Nair & Simidu 1987; Hentschel et al. 2001). Tener el conocimiento del alcance filogenético de la acción inhibitoria de cepas de bacterias ambientales abre una enorme posibilidad para solucionar problemas con bacterias patogénicas, por lo cual resulta interesante el diseño de proyectos dirigidos a probar el rango de acción de estas cepas, así como aislar y caracterizar los compuestos que estén involucrados directamente en la inhibición.

Este estudio se centró en la amplitud filogenética del espectro de acción de los mecanismos de inhibición que presentan las cepas de una colección de *Pseudomonas* aisladas de Churince. Se partió de la premisa de que cepas emparentadas ocupan nichos ecológicos más parecidos, y son las competidoras más directas de cualquier cepa. Los resultados no mostraron una relación entre la distancia filogenética de las cepas interactuantes y la intensidad de la inhibición (Figura 3) a pesar de que las antagonistas inhiben diferencialmente a diferentes grupos taxonómicos de bacterias potencialmente sensibles. Al no haber un patrón que demuestre que la inhibición con respecto a la distancia filogenética es diferencial, la hipótesis planteada en este trabajo no puede ser aceptada ya que la teoría de interacciones por competencia postula que entre menor sea la distancia filogenética, los organismos tienen mayor similitud con respecto a los elementos

que definen sus nichos, es decir, son ecológicamente más parecidos y por lo tanto la competencia suele ser más intensa.

A pesar de que el objetivo del presente trabajo se centró en la caracterización del espectro filogenético de acción antimicrobiana y no en la caracterización de los compuestos químicos involucrados, dados los resultados, es relevante considerar las posibles razones por las que no observamos ningún patrón filogenético. Una explicación posible para este fenómeno es la versatilidad de *Pseudomonas* para explotar diferentes ambientes, es decir, son organismos generalistas, y no defienden un núcleo de recursos de un grupo filogenéticamente cercano, sino llevan la defensa de recursos más allá produciendo sustancias de amplio espectro que les permita por un lado superar a un mayor número de competidores, y por otro, y en consecuencia tener acceso a más recursos.

No todas las bacterias antagonistas en este estudio fueron exitosas en el sentido de inhibir el crecimiento de las cepas con quienes interactuaron. Cada grupo de bacterias cuenta con variabilidad donde no todas son totalmente antagonistas, como se observó con 2C2, 2C8 y 2C1. A pesar de ser miembros de una misma rama en el árbol filogenético, solo 2C1 y 2C2 fueron antagonistas. Miembros de una misma rama no fueron fuertes antagonistas (1B6, 1D4, 1D6 y 1D12) lo cual puede sugerir que al interior de un grupo de bacterias emparentadas, hay de alguna forma estructuración filogenética, pues tenemos una rama de organismos no antagonistas y ramas de organismos que sí lo son, por lo tanto, esto podría

explicar por qué no hay un patrón claro de la intensidad de inhibición con respecto a la distancia filogenética.

Esto sugiere que hay *Pseudomonas* que no solo apuestan por estrategias de producción de sustancia antimicrobiana, de contienda directa, sino que podrían valerse de otras. Cualesquiera que sean estas estrategias, al parecer promueven la coexistencia entre grupos de bacterias, y evitan que se caiga en exclusión competitiva, de lo contrario, un sitio como Cuatro Ciénegas no presentaría una alta diversidad de linajes bacterianos, sino se tendrían comunidades dominadas por pocos grupos de bacterias. Entonces, cepas como 1B6, 1D4, 1D6 y 1D12, inhiben pocos miembros de su mismo género y con baja intensidad (Aguirre et al., 2014), así también a bacterias de otros géneros, promoviendo no solo la coexistencia de conoespecíficos, sino también con distintos grupos taxonómicos de la comunidad.

Las cepas 2C2, 2C1, 2E4, 4D1 y 2B7 fueron las cepas que tuvieron los valores más altos de inhibición, además de ser antagonistas de un gran número de bacterias. Este comportamiento lo presentaron en el estudio de Aguirre et al. 2014. Estas cepas son altamente antagonistas ya que no solo inhiben con alta intensidad a un gran número de miembros de su propio género, sino también hacen lo mismo con bacterias de diferentes géneros, lo que sugiere que su estrategia es matar a tantos competidores como les sea posible para tener acceso a sus recursos celulares en un ambiente pobre en nutrientes como es el de Cuatro Ciénegas. Por otro lado, es de llamar la atención que la cepa de *Pseudomonas* 2C8 es una fuerte competidora de otras *Pseudomonas* (fue de hecho la que inhibe

a un mayor número de cepas), sin embargo, no inhibió del mismo modo a las cepas de diferentes linajes ya que inhibe con poca intensidad a pocas cepas. Estos resultados sugieren que las sustancias que produce 2C8 son efectivas solamente contra organismos cercanos filogenética y ecológicamente a ella, y no así con bacterias distantes, que es lo que la teoría ecológica propone, esto no es el caso en el resto de las cepas antagonistas de *Pseudomonas* que parecen tener un muy amplio espectro de antagonismo. Por otra parte, este es un estudio muy parcial, por lo que de ninguna manera se puede concluir que las *Pseudomonas* no antagonistas carecen de la capacidad de producir sustancias inhibitorias, sino que los resultados obtenidos sugieren solamente que no son eficientes para inhibir los grupos probados en esta investigación.

En un sitio como Cuatro Ciénegas, donde hay una alta biodiversidad de bacterias (Souza et al. 2006), la competencia por tener acceso a los recursos es fuerte, de acuerdo a un estudio metagenómico en Poza Roja (Bonilla-Rosso et al. 2012). En dicho estudio se encontró un sistema dominado por bacterias del linaje de *Pseudomonas* y gran número de genes de resistencia a antibióticos (Souza, comunicación personal). Por otra parte, en En Churince se ha encontrado que hay cierta abundancia de *Pseudomonas* (Escalante 2008) y como bien es sabido son productoras de un gran arsenal químico (Nair & Smidu 1987; Haas & Keel, 2003; Hibbing 2010; Aguirre et al. 2014). Las bacterias invierten recursos en diferentes estrategias para no ser desplazadas del medio que habitan, lo que podría jugar un papel importante en este caso. Un ejemplo de esto es la inversión de materia y energía en la producción de sustancias inhibitorias en contra de otros

competidores, usándolas como primera línea de defensa (Riley & Wertz, 2002). Por otro lado las sensibles, pueden invertir recursos en adquirir cierta resistencia a esas sustancias.

Invertir en la producción de costosos caracteres para la contienda en un ambiente oligotrófico podría conferir ventajas a los organismos productores, sobre todo si son generalistas, pues deben proteger un rango más amplio de recursos. Las especies generalistas que ocupan un gran espectro de ambientes es más probable que se beneficien de la producción de sustancias de amplio espectro o un coctel de toxinas que sea capaz de llegar a diferentes competidores potenciales (Hibbing et al. 2010). Más aún, si se considera que la producción de sustancias que se diluyen al medio puede ser altamente costosa en ambientes acuáticos oligotróficos (Aguirre-von-Wobeser et al. 2015). Quizás las presiones ambientales a las cuales las bacterias están sometidas, en este caso la oligotrofia de las aguas del sistema Churince en Cuatro Ciénegas (Souza et al. 2006), favorecen la prevalencia de aquellas sustancias de amplio espectro de acción. Si bien este estudio es una aproximación a lo que ocurre en la comunidad, sería relevante llevar a cabo más estudios de interacciones, con el propósito de dilucidar o al menos tener un panorama más completo de las interacciones en este sitio, además de simular las condiciones de oligotrofia del ambiente y así poder saber hasta qué punto es ventajoso producir estas sustancias.

Perspectivas

Hay numerosos escenarios que no se exploraron en este estudio. Uno de ellos fue probar si las cepas distintas a *Pseudomonas* inhiben a éstas, es decir, se probaron como cepas potencialmente sensibles, aunque valdría la pena realizar el experimento pero probando a estas cepas como potenciales antagonistas y demostrar si hay alguna relación con su aparente resistencia a algunas de las *Pseudomonas*, además de explorar contiendas de todas contra todas, probando si estas interacciones funcionan como el modelo de piedra-papel-tijeras y describir el tipo de redes de interacción que se forman.

Valdría también la pena llevar a cabo investigaciones futuras con un mayor número de cepas de cada grupo para tener un panorama más completo de cómo es la interacción entre estas bacterias y comprobar si realmente no hay un patrón claro entre la distancia filogenética y la intensidad de interacción, determinando si estos resultados son producto de la interacción biótica misma

Como se mencionó antes sobre la oligotrofia de las aguas de Cuatro Ciénegas, resulta relevante preguntarse si existe una relación entre la producción de sustancias antimicrobianas y la disponibilidad de nutrientes. Producir éstas sustancias es costoso, entonces, al hacer estudios donde se varíe la concentración de nutrientes del medio en el que compiten las bacterias podría arrojar información valiosa que encamine a entender si existe dicha relación y poder plantear qué beneficios proporciona apostar a tan costosas estrategias. En este sentido también es necesario dirigir investigaciones que nos ayuden a

resolver estas incógnitas sobre la eficacia de explotación de diferentes fuentes de nutrientes.

No se sabe si la producción de estos costosos agentes antimicrobianos ocurre solo en presencia de potenciales competidores o si ésta se expresa de manera constitutiva por cepas antagonistas. Para resolver esta pregunta, se puede ejecutar la misma metodología empleada en esta investigación, aunque se sugiere filtrar el cultivo de células y así determinar si en el medio hay sustancias que estos organismos producen independientemente de estar en contacto con un organismo competidor.

Entender a qué escala geográfica son relevantes este tipo de interacciones resulta de importancia. En el sistema Churince Cerritos et al. (2011) llevó a cabo un estudio en el que correlaciona variables ambientales con la diversidad biológica en diez puntos de muestreo a lo largo de este sistema acuático; de este estudio se tiene una colección de aislados de diversos géneros, incluyendo muchos distintos a los caracterizados en este estudio. Con colecciones de aislados como ésta se puede por un lado, reproducir el experimento de la presente investigación para ampliar el conocimiento del alcance filogenético de las sustancias que producen las cepas que aquí se probaron, y por otro buscar patrones (si los hay) entre la intensidad de la interacción con respecto a la distancia geográfica que separa a las cepas interactuantes.

En ecología química, el papel que juegan las sustancias que producen las bacterias como *Pseudomonas* en los sitios que habitan se interpreta como un

control de las dinámicas poblacionales de los demás microorganismos con los que coexisten (Burkholder et al. 1996). En este punto la información que proporcionan estudios metagenómicos será de ayuda para tener un censo más completo de la riqueza y abundancia de especies en Churince y comprobar si la abundancia de grupos de bacterias se relaciona con la coocurrencia de los demás grupos de microorganismos con los que coexisten.

Conclusiones

La acción inhibitoria de la colección de *Pseudomonas* es independiente de la distancia filogenética entre ellas y las cepas inhibidas. Por lo tanto, los mecanismos de inhibición de estas *Pseudomonas* se pueden considerar de amplio espectro de acción.

Referencias

- Abriouel, Hikmate, Charles M a P Franz, Nabil Ben Omar, and Antonio Galvez. 2011. "Diversity and Applications of Bacillus Bacteriocins." *FEMS Microbiology Reviews* 35: 201–32. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x.
- Aguirre-von-Wobeser, Eneas, Luis E. Eguiarte, Valeria Souza, and Gloria Soberón-Chávez. 2015. "Theoretical Analysis of the Cost of Antagonistic Activity for Aquatic Bacteria in Oligotrophic Environments." *Frontiers in Microbiology* 6 (May): 1–8. doi:10.3389/fmicb.2015.00490.
- Aguirre-von-Wobeser, Eneas, Gloria Soberón-Chávez, Luis E. Eguiarte, Gabriel Yaxal Ponce-Soto, Mirna Vázquez-Rosas-Landa, and Valeria Souza. 2014. "Two-Role Model of an Interaction Network of Free-Living Γ -Proteobacteria from an Oligotrophic Environment." *Environmental Microbiology* 16: 1366–77. doi:10.1111/1462-2920.12305.
- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, and D.J. Lipman. 1990. "Basic Local Alignment Search Tool." *J. Mol. Biol.*, no. 215: 403–10. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- Amarasekare, Priyanga. 2003. "Competitive Coexistence in Spatially Structured Environments: A Synthesis." *Ecology Letters* 6: 1109–22. doi:10.1046/j.1461-0248.2003.00530.x.
- Baltzis, B C, and A G Fredrickson. 1983. "Competition of Two Microbial Populations for a Single Resource in a Chemostat When One of Them Exhibits Wall Attachment." *Biotechnology and Bioengineering* 25 (10): 2419–39.
- Barberán, Albert, and Emilio O. Casamayor. 2010. "Global Phylogenetic Community Structure and B-Diversity Patterns in Surface Bacterioplankton Metacommunities." *Aquatic Microbial Ecology* 59: 1–10. doi:10.3354/ame01389.
- Bo, Simone I, Susan M Huse, and Justus E E Van Beusekom. 2012. "Diversity and Dynamics of Rare and of Resident Bacterial Populations in Coastal Sands," 542–53. doi:10.1038/ismej.2011.132.
- Bonilla-Rosso, Germán, Mariana Peimbert, Luis David Alcaraz, Ismael Hernández, Luis E. Eguiarte, Gabriela Olmedo-Alvarez, and Valeria Souza. 2012. "Comparative Metagenomics of Two Microbial Mats at Cuatro Ciénegas Basin II: Community Structure and Composition in Oligotrophic Environments." *Astrobiology*.
- Brauer, Verena S., Maayke Stomp, and Jef Huisman. 2012. "The Nutrient-Load Hypothesis: Patterns of Resource Limitation and Community Structure Driven by Competition for Nutrients and Light." *The American Naturalist*.
- Breitbart, Mya, Ana Hoare, Anthony Nitti, Janet Siefert, Matthew Haynes, Elizabeth Dinsdale, Robert Edwards, Valeria Souza, Forest Rohwer, and David Hollander. 2009. "Metagenomic and Stable Isotopic Analyses of Modern Freshwater Microbialites in Cuatro Ciénegas, Mexico." *Environmental Microbiology* 11 (March 2008): 16–34. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01725.x.
- Burkholder, P R, R M Pfister, and F H Leitz. 1966. "Production of a Pyrrole Antibiotic by a Marine Bacterium." *Applied Microbiology* 14: 649–53.

- Caruso, Tancredi, Yuki Chan, Donnabella C Lacap, Maggie C Y Lau, Christopher P McKay, and Stephen B Pointing. 2011. "Stochastic and Deterministic Processes Interact in the Assembly of Desert Microbial Communities on a Global Scale." *The ISME Journal* 5. Nature Publishing Group: 1406–13. doi:10.1038/ismej.2011.21.
- Cerritos, René, Luis E. Eguiarte, Morena Avitia, Janet Siefert, Michael Travisano, Alejandra Rodríguez-Verdugo, and Valeria Souza. 2011. "Diversity of Culturable Thermo-Resistant Aquatic Bacteria along an Environmental Gradient in Cuatro Ciénegas, Coahuila, México." *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 99: 303–18. doi:10.1007/s10482-010-9490-9.
- Cha, Misun, Naeun Lee, Minju Kim, Mia Kim, and Sangjoon Lee. 2008. "Heterologous Production of Pseudomonas Aeruginosa EMS1 Biosurfactant in Pseudomonas Putida." *Bioresource Technology* 99: 2192–99. doi:10.1016/j.biortech.2007.05.035.
- Chao, L, and B R Levin. 1981. "Structured Habitats and the Evolution of Anticompetitor Toxins in Bacteria." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (10): 6324–28. doi:10.1073/pnas.78.10.6324.
- Chesson, Peter. 2000. "Mechanisms of Maintenance of Species Diversity." *Annual Review of Ecology and Systematics* 31 (2000): 343–66. doi:10.1146/annurev.ecolsys.31.1.343.
- Cole, J. R., Q. Wang, E. Cardenas, J. Fish, B. Chai, R. J. Farris, a. S. Kulam-Syed-Mohideen, et al. 2009. "The Ribosomal Database Project: Improved Alignments and New Tools for rRNA Analysis." *Nucleic Acids Research* 37 (November 2008): 141–45. doi:10.1093/nar/gkn879.
- Cordero, O. X., H. Wildschutte, B. Kirkup, S. Proehl, L. Ngo, F. Hussain, F. Le Roux, T. Mincer, and M. F. Polz. 2012. "Ecological Populations of Bacteria Act as Socially Cohesive Units of Antibiotic Production and Resistance." *Science* 337 (2012): 1228–31. doi:10.1126/science.1219385.
- Curtis, Thomas P, Ian M Head, Mary Lunn, Stephen Woodcock, Patrick D Schloss, and William T Sloan. 2006. "What Is the Extent of Prokaryotic Diversity?" *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 361 (November): 2023–37. doi:10.1098/rstb.2006.1921.
- Czaran, T, R F Hoekstra, and Pagie L. 2002. "Chemical Warfare between Microbes." *Pnas* 99: 786–90.
- Czárán, Tamás L, and Rolf F Hoekstra. 2003. "Killer-Sensitive Coexistence in Metapopulations of Micro-Organisms." *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society* 270 (May): 1373–78. doi:10.1098/rspb.2003.2338.
- Darwin, Charles. 1859. *Charles Darwin and the Origin of Species (6th Edition)*. *The Eugenics Review*. Vol. 2. Project Gutenberg.
- Dawkins, R, and J R Krebs. 1979. "Arms Races between and within Species." *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character. Royal Society (Great Britain)* 205 (September): 489–511. doi:10.1098/rspb.1979.0081.

- Denner, E. B M, Marko Kolari, Douwe Hoornstra, Irina Tsitko, Peter Kämpfer, H. J. Busse, and Mirja Salkinoja-Salonen. 2006. "Rubellimicrobium Thermophilum Gen. Nov., Sp. Nov., a Red-Pigmented, Moderately Thermophilic Bacterium Isolated from Coloured Slime Deposits in Paper Machines." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56 (6): 1355–62.
- DeSantis, T. Z., P. Hugenholtz, N. Larsen, M. Rojas, E. L. Brodie, K. Keller, T. Huber, D. Dalevi, P. Hu, and G. L. Andersen. 2006. "Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB." *Applied and Environmental Microbiology* 72 (7): 5069–72.
- Desnues, Christelle, Beltran Rodriguez-Brito, Steve Rayhawk, Scott Kelley, Tuong Tran, Matthew Haynes, Hong Liu, et al. 2011. "Biodiversity and Biogeography of Phages in Modern Stromatolites and Thrombolites." *Handbook of Molecular Microbial Ecology II: Metagenomics in Different Habitats* 452 (March): 37–44. doi:10.1002/9781118010549.ch5.
- Dumbrell, Alex J, Michaela Nelson, Thorunn Helgason, Calvin Dytham, and Alastair H Fitter. 2010. "Relative Roles of Niche and Neutral Processes in Structuring a Soil Microbial Community." *The ISME Journal* 4: 337–45. doi:10.1038/ismej.2009.122.
- Edgar, Robert C. 2004. "MUSCLE: Multiple Sequence Alignment with High Accuracy and High Throughput." *Nucleic Acids Research* 32 (5): 1792–97. doi:10.1093/nar/gkh340.
- Elser, James J., John H. Schampel, Ferran Garcia-Pichel, Brian D. Wade, Valeria Souza, Luis Eguiarte, Ana Escalante, and Jack D. Farmer. 2005. "Effects of Phosphorus Enrichment and Grazing Snails on Modern Stromatolitic Microbial Communities." *Freshwater Biology* 50: 1808–25. doi:10.1111/j.1365-2427.2005.01451.x.
- Escalante, Ana E., Luis E. Eguiarte, Laura Espinosa-Asuar, Larry J. Forney, Ana M. Noguez, and Valeria Souza Saldivar. 2008. "Diversity of Aquatic Prokaryotic Communities in the Cuatro Ciénegas Basin." *FEMS Microbiology Ecology* 65: 50–60. doi:10.1111/j.1574-6941.2008.00496.x.
- Etienne, Rampal S., and David Alonso. 2007. "Neutral Community Theory: How Stochasticity and Dispersal-Limitation Can Explain Species Coexistence." *Journal of Statistical Physics* 128 (July): 485–510. doi:10.1007/s10955-006-9163-2.
- Falkowski, Paul G, Tom Fenchel, and Edward F Delong. 2008. "The Microbial Engines That Drive Earth's Biogeochemical Cycles." *Science (New York, N.Y.)* 320 (2008): 1034–39. doi:10.1126/science.1153213.
- Fernandes, Sheryl Oliveira, David L Kirchman, Valérie D Michotey, Patricia C Bonin, and P A Lokabharathi. 2014. "Bacterial Diversity in Relatively Pristine and Anthropogenically-Influenced Mangrove Ecosystems (Goa , India)" 1171: 1161–71.
- Fuhrman, Jed a. 2009. "Microbial Community Structure and Its Functional Implications." *Nature* 459 (May): 193–99. doi:10.1038/nature08058.
- Gardner, Andy, Stuart a West, and Angus Buckling. 2004. "Bacteriocins, Spite and Virulence." *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society* 271 (July): 1529–35. doi:10.1098/rspb.2004.2756.

- Gaston, Kevin, and Tim Blackburn. 2008. *Pattern and Process in Macroecology (Google eBook)*. <http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=6VnYAlDjWzAC&pgis=1>.
- Gauze, G. F. 1934. *The Struggle for Existence, by G. F. Gause*. Baltimore,: The Williams & Wilkins company,. doi:10.5962/bhl.title.4489.
- Green, Jessica, and Brendan J M Bohannan. 2006. "Spatial Scaling of Microbial Biodiversity." *Trends in Ecology and Evolution* 21 (9): 501–7. doi:10.1016/j.tree.2006.06.012.
- Greig, Duncan, and Michael Travisano. 2008. "Density-Dependent Effects on Allelopathic Interactions in Yeast." *Evolution* 62 (1981): 521–27. doi:10.1111/j.1558-5646.2007.00292.x.
- Haas, Dieter, and Christoph Keel. 2003. "Regulation of Antibiotic Production in Root-Colonizing Pseudomonas Spp. and Relevance for Biological Control of Plant Disease." *Annual Review of Phytopathology* 41 (63): 117–53. doi:10.1146/annurev.phyto.41.052002.095656.
- "Hardin 1960.pdf." n.d.
- Hawlena, Hadas, Farrah Bashey, and Curtis M. Lively. 2010. "The Evolution of Spite: Population Structure and Bacteriocin-Mediated Antagonism in Two Natural Populations of Xenorhabdus Bacteria." *Evolution* 64: 3198–3204. doi:10.1111/j.1558-5646.2010.01070.x.
- Héchar, Yann, and Hans Georg Sahl. 2002. "Mode of Action of Modified and Unmodified Bacteriocins from Gram-Positive Bacteria." *Biochimie*.
- Helling R, Vargas C, Adams J. 1963. "Escherichia Coli." *Immunology* 6 (2): 126–39. doi:10.1111/j.1749-6632.1956.tb40107.x.
- Hentschel, U, M Schmid, M Wagner, L Fieseler, C Gernert, and J Hacker. 2001. "Isolation and Phylogenetic Analysis of Bacteria with Antimicrobial Activities from the Mediterranean Sponges *Aplysina Aerophoba* and *Aplysina Cavernicola*." *FEMS Microbiology Ecology* 35: 305–12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11311441>.
- Hibbing, Michael E, Clay Fuqua, Matthew R Parsek, and S Brook Peterson. 2010. "Jungle" 8 (1): 15–25. doi:10.1038/nrmicro2259.Bacterial.
- HilleRisLambers, J., P.B. Adler, W.S. Harpole, J.M. Levine, and M. M. Mayfield. 2011. "Rethinking Community Assembly Through the Lens of Coexistence Theory." *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 43: 227–48. doi:10.1146/annurev-ecolsys-110411-160411.
- Huisman, J, and F J Weissing. 1999. "Biodiversity of Plankton by Species Oscillations and Chaos." *Nature* 402 (February): 407–10. doi:10.1038/46540.
- Hutchinson, Author G E, Source The, American Naturalist, and No May Jun. 1961. "The University of Chicago The Paradox of the Plankton" 95 (882): 137–45.

- Johannesson, Karen H., Alejandra Cortés, and Kathryn C. Kilroy. 2004. "Reconnaissance Isotopic and Hydrochemical Study of Cuatro Ciénegas Groundwater, Coahuila, México." *Journal of South American Earth Sciences* 17: 171–80. doi:10.1016/j.jsames.2004.01.002.
- Jousset, A., B. Schmid, S. Scheu, and N. Eisenhauer. 2011. "Genotypic Richness and Dissimilarity Oppositely Affect Ecosystem Functioning." *Ecology Letters* 14: 537–45. doi:10.1111/j.1461-0248.2011.01613.x.
- Kardinaal, W. E A, Linda Tonk, Ingmar Janse, Suzanne Hol, Pieter Slot, Jef Huisman, and Petra M. Visser. 2007. "Competition for Light between Toxic and Nontoxic Strains of the Harmful Cyanobacterium *Microcystis*." *Applied and Environmental Microbiology* 73 (9): 2939–46.
- Kerr, Benjamin, Margaret A Riley, Marcus W Feldman, and Brendan J M Bohannan. 2002. "Local Dispersal Promotes Biodiversity in a Real-Life Game of Rock-Paper-Scissors." *Nature* 418 (6894): 171–74.
- Khan, Arif, R. Geetha, Aparna Akolkar, Ami Pandya, G. Archana, and Anjana J. Desai. 2006. "Differential Cross-Utilization of Heterologous Siderophores by Nodule Bacteria of *Cajanus cajan* and Its Possible Role in Growth under Iron-Limited Conditions." *Applied Soil Ecology* 34: 19–26. doi:10.1016/j.apsoil.2005.12.001.
- Kneitel, Jamie M., and Jonathan M. Chase. 2004. "Trade-Offs in Community Ecology: Linking Spatial Scales and Species Coexistence." *Ecology Letters* 7: 69–80. doi:10.1046/j.1461-0248.2003.00551.x.
- Lane, David J. 1991. "16S/23S rRNA Sequencing." In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, edited by E Stackebrandt and M Goodfellow, 115–75. Wiley. <http://ci.nii.ac.jp/naid/10018533690/en/>.
- Leibold, Mathew A., and Mark A. McPeck. 2006. "Coexistence of the Niche and Neutral Perspectives in Community Ecology." *Ecology*.
- Li, Yanmei, Qi Xiang, Qihao Zhang, Yadong Huang, and Zhijian Su. 2012. "Overview on the Recent Study of Antimicrobial Peptides: Origins, Functions, Relative Mechanisms and Application." *Peptides* 37 (2). Elsevier Inc.: 207–15. doi:10.1016/j.peptides.2012.07.001.
- Long, R.a., and Farooq Azam. 2001. "Antagonistic Interactions among Marine Bacteria." *Applied and Environmental Microbiology* 67 (11): 4875–4983. doi:10.1128/AEM.67.11.4975-4983.2001.
- Madsen, Eugene L. 2011. "Microorganisms and Their Roles in Fundamental Biogeochemical Cycles." *Current Opinion in Biotechnology* 22 (3). Elsevier Ltd: 456–64. doi:10.1016/j.copbio.2011.01.008.
- Mangano, Santina, Luigi Michaud, Consolazione Caruso, Matteo Brilli, Vivia Bruni, Renato Fani, and Angelina Lo Giudice. 2009. "Antagonistic Interactions between Psychrotrophic Cultivable Bacteria Isolated from Antarctic Sponges: A Preliminary Analysis." *Research in Microbiology* 160 (1). Elsevier Masson SAS: 27–37. doi:10.1016/j.resmic.2008.09.013.

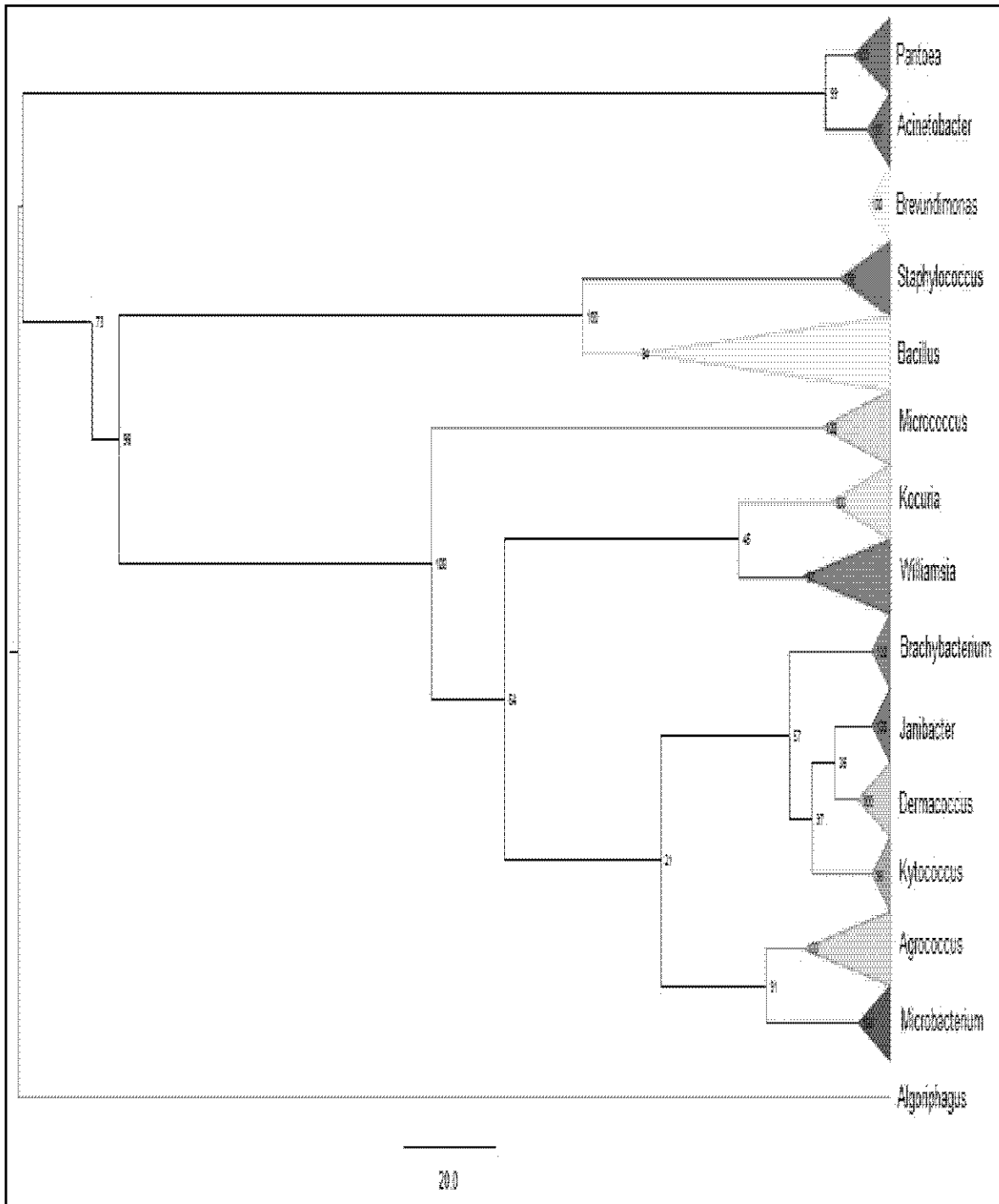
- Martiny, Jennifer B Hughes, Brendan J M Bohannon, James H Brown, Robert K Colwell, Jed a Fuhrman, Jessica L Green, M Claire Horner-Devine, et al. 2006. "Microbial Biogeography: Putting Microorganisms on the Map." *Nature Reviews. Microbiology* 4 (February): 102–12. doi:10.1038/nrmicro1341.
- Mayali, Xavier, and Farooq Azam. 2004. "Algicidal Bacteria in the Sea and Their Impact on Algal Blooms." *Journal of Eukaryotic Microbiology* 51 (2): 139–44. doi:10.1111/j.1550-7408.2004.tb00538.x.
- Michel-Briand, Yvon, and Christine Baysse. 2002. "The Pyocins of *Pseudomonas Aeruginosa*." *Biochimie* 84: 499–510. doi:10.1016/S0300-9084(02)01422-0.
- Miller, Mark A., Wayne Pfeiffer, and Terri Schwartz. 2010. "Creating the CIPRES Science Gateway for Inference of Large Phylogenetic Trees." In *2010 Gateway Computing Environments Workshop, GCE 2010*.
- Minckley, W. L., and G. a. Cole. 1968. "Preliminary Limnologic Information on Waters of the Cuatro Cienegas Basin, Coahuila, Mexico." *The Southwestern Naturalist* 13 (4): 421–31.
- Minckley, Wl. 1969. "Environments of the Bolson of Cuatro Cienegas, Coahuila, Mexico," 1–65. <http://www.nativefishlab.net/library/textpdf/13676.pdf>.
- Mulders, J. W M, I. J. Boerrigter, H. S. Rollema, R. J. Siezen, and W. M. De Vos. 1991. "Identification and Characterization of the Lantibiotic Nisin Z, a Natural Nisin Variant." *European Journal of Biochemistry* 201: 581–84. doi:10.1111/j.1432-1033.1991.tb16317.x.
- Nair, S, and U Simidu. 1987. "Distribution and Significance of Heterotrophic Marine-Bacteria with Antibacterial Activity." *Applied and Environmental Microbiology* 53 (12): 2957–62. http://apps.webofknowledge.com/globalproxy.cvt.dk/full_record.do?product=UA&search_mode=GeneralSearch&qid=49&SID=V2omBEkbAn113hkgk53&page=1&doc=1.
- Parret, a. H a, and René De Mot. 2002. "Bacteria Killing Their Own Kind: Novel Bacteriocins of *Pseudomonas* and Other Γ -Proteobacteria." *Trends in Microbiology* 10 (3): 107–12. doi:10.1016/S0966-842X(02)02307-7.
- Passarge, Jutta, Suzanne Hol, Marieke Escher, and Jef Huisman. 2006. "Competition for Nutrients and Light: Stable Coexistence, Alternative Stable States, or Competitive Exclusion?" *Ecological Monographs* 76 (1): 57–72.
- Pérez-Gutiérrez, Rocío-Anaís, Varinia López-Ramírez, África Islas, Luis David Alcaraz, Ismael Hernández-González, Beatriz Carely Luna Olivera, Moisés Santillán, et al. 2012. "Antagonism Influences Assembly of a *Bacillus* Guild in a Local Community and Is Depicted as a Food-Chain Network." *The ISME Journal*, 487–97. doi:10.1038/ismej.2012.119.
- Piñol, J, and J Martinez Vilalta. 2006. "El Modelo de Hubbell de Biodiversidad Y Biogeografía." *Ecología Con Números*, 1–4.

- Ponce-Soto, Gabriel Y., Eneas Aguirre-von-Wobeser, Luis E. Eguiarte, James J. Elser, Zarras M.-P. Lee, and Valeria Souza. 2015. "Enrichment Experiment Changes Microbial Interactions in an Ultra-Oligotrophic Environment." *Frontiers in Microbiology* 6 (April): 1–11. doi:10.3389/fmicb.2015.00246.
- Ratcliff, William Croft, and Robert Ford Denison. 2011. "Microbiology. Alternative Actions for Antibiotics." *Science (New York, N.Y.)* 332: 547–48. doi:10.1126/science.1205970.
- Rebollar, Eria A., Morena Avitia, Luis E. Eguiarte, Andrea González-González, Lucy Mora, Germán Bonilla-Rosso, and Valeria Souza. 2012. "Water-Sediment Niche Differentiation in Ancient Marine Lineages of Exiguobacterium Endemic to the Cuatro Ciénegas Basin." *Environmental Microbiology* 14 (9): 2323–33.
- Riley, Margaret a. 1999. "The Ecological Role of Bacteriocins in." *Trends in Microbiology*, no. 99: 129–33.
- Riley, Margaret a, and John E Wertz. 2002. "Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application." *Annual Review of Microbiology* 56: 117–37. doi:10.1146/annurev.micro.56.012302.161024.
- Riley, Margaret a., C. M. Goldstone, J. E. Wertz, and D. Gordon. 2003. "A Phylogenetic Approach to Assessing the Targets of Microbial Warfare." *Journal of Evolutionary Biology* 16: 690–97. doi:10.1046/j.1420-9101.2003.00575.x.
- Riley, Margaret a, Gordon D. 1999. "The Ecological Role of Bacteriocins in." *Trends in Microbiology*, no. 99: 129–33.
- Rosenfeld, William D, and Claude E Zobell. 1947. "Nonmarine Bacteria," no. 327.
- Rusch, Douglas B., Aaron L. Halpern, Granger Sutton, Karla B. Heidelberg, Shannon Williamson, Shibu Yooseph, Dongying Wu, et al. 2007. "The Sorcerer II Global Ocean Sampling Expedition: Northwest Atlantic through Eastern Tropical Pacific." *PLoS Biology* 5 (3): 0398–0431. doi:10.1371/journal.pbio.0050077.
- Sezonov, Guennadi, Danièle Joseleau-Petit, and Richard D'Ari. 2007. "Escherichia Coli Physiology in Luria-Bertani Broth." *Journal of Bacteriology* 189 (23): 8746–49. doi:10.1128/JB.01368-07.
- Šmarda, Jan, David Šmajš, Hana Lhotová, and Daniela Dědičová. 2007. "Occurrence of Strains Producing Specific Antibacterial Inhibitory Agents in Five Genera of Enterobacteriaceae." *Current Microbiology* 54: 113–18. doi:10.1007/s00284-006-0196-1.
- Society, Ecological. 2008. "Competition and Biodiversity in Spatially Structured Habitats Author (S): David Tilman Published by : Ecological Society of America Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/1939377> COMPETITION AND BIODIVERSITY IN SPATIALLY STRUCTURED HABITATS '." *America* 75 (1): 2–16.
- SOMMER, ULRICH. 1985. "Comparison between Steady State and Non-Steady State Competition: Experiments with Natural Phytoplankton." *Limnology and Oceanography*.

- Souza, Valeria, Ana Escalante, Laura Espinoza, and Aldo Valera. 2004. "Valeria Souza, Ana Escalante, Laura Espinoza, Aldo Valera, Antonio Cruz, Luis E. Eguiarte, Ferrán García Pichel, Jim Elser." *Ciencias* 75: 4–12.
- Souza, Valeria, Laura Espinosa-Asuar, Ana E Escalante, Luis E Eguiarte, Jack Farmer, Larry Forney, Lourdes Lloret, et al. 2006. "An Endangered Oasis of Aquatic Microbial Biodiversity in the Chihuahuan Desert." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (17): 6565–70. doi:10.1073/pnas.0601434103.
- Spiers, Andrew J, Angus Buckling, and Paul B Rainey. 2000. "MINI REVIEW The Causes of *Pseudomonas* Diversity." *Microbiology* 146: 2345–50.
- Stamatakis, Alexandros. 2006. "The RAxML 7.0.4 Manual." *Bioinformatics* 22(21): 2688–90.
- Strange, E M, P B Moyle, and T C Foin. 1993. "Interactions between Stochastic and Deterministic Processes in Stream Fish Community Assembly." *Environmental Biology of Fishes* 36 (1982): 1–15. <Go to ISI>://A1993KJ24900001.
- Team, R. 2013. "R Development Core Team." *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. <http://www.mendeley.com/research/r-language-environment-statistical-computing-96/\npapers2://publication/uuid/A1207DAB-22D3-4A04-82FB-D4DD5AD57C28>.
- Tilman, D. 1982. "Resource Competition and Community Structure." *Monographs in Population Biology* 17: 1–296.
- Tilman D. 1994. "Causes, Consequences and Ethics of Biodiversity." *Nature* 405 (6783): 208–11.
- Toribio, Jeiry, Ana E. Escalante, Jesús Caballero-Mellado, Andrea González-González, Sergio Zavala, Valeria Souza, and Gloria Soberón-Chávez. 2011. "Characterization of a Novel Biosurfactant Producing *Pseudomonas Koreensis* Lineage That Is Endemic to Cuatro Ciénegas Basin." *Systematic and Applied Microbiology* 34 (7): 531–35.
- Tyson, Gene W, Jarrod Chapman, Philip Hugenholtz, Eric E Allen, Rachna J Ram, Paul M Richardson, Victor V Solovyev, Edward M Rubin, Daniel S Rokhsar, and Jillian F Banfield. 2004. "Community Structure and Metabolism through Reconstruction of Microbial Genomes from the Environment." *Nature* 428 (March): 37–43. doi:10.1038/nature02340.
- Van der Gucht, Katleen, Karl Cottenie, Koenraad Muylaert, Nele Vloemans, Sylvie Cousin, Steven Declerck, Erik Jeppesen, et al. 2007. "The Power of Species Sorting: Local Factors Drive Bacterial Community Composition over a Wide Range of Spatial Scales." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 20404–9. doi:10.1073/pnas.0707200104.
- Van Trappen, Stefanie, Joris Mergaert, Sylvie Van Eygen, Peter Dawyndt, Margo C Cnockaert, and Jean Swings. 2002. "Diversity of 746 Heterotrophic Bacteria Isolated from Microbial Mats from Ten Antarctic Lakes." *Systematic and Applied Microbiology* 25: 603–10. doi:10.1078/07232020260517742.

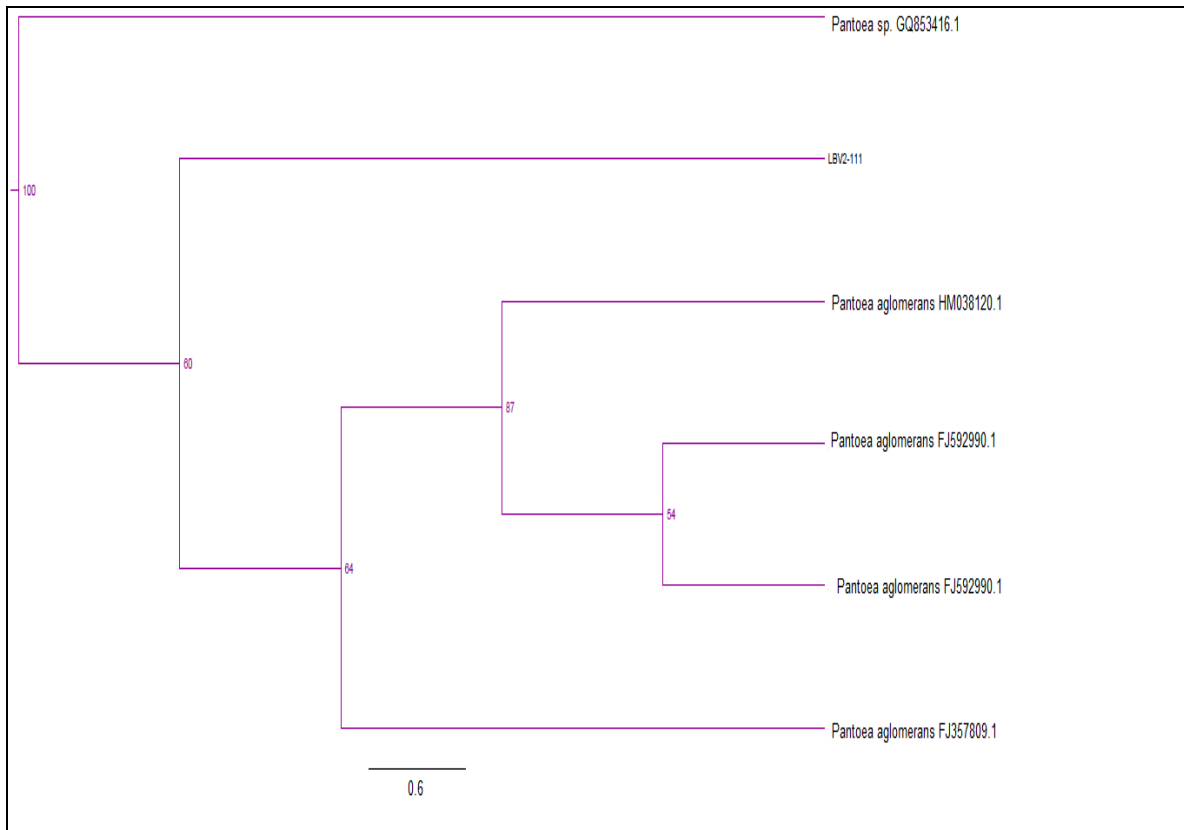
- Van Valen, L. 1974. "Molecular Evolution as Predicted by Natural Selection." *Journal of Molecular Evolution* 3: 89–101. doi:10.1007/BF01796554.
- Venter, J Craig, Karin Remington, John F Heidelberg, Aaron L Halpern, Doug Rusch, Jonathan a Eisen, Dongying Wu, et al. 2004. "Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea." *Science (New York, N.Y.)* 304 (2004): 66–74. doi:10.1126/science.1093857.
- Vetsigian, Kalin, Rishi Jajoo, and Roy Kishony. 2011. "Structure and Evolution of Streptomyces Interaction Networks in Soil and in Silico." *PLoS Biology* 9 (10). doi:10.1371/journal.pbio.1001184.
- Wandersman, Cécile, and Philippe Delepelaire. 2004. "Bacterial Iron Sources: From Siderophores to Hemophores." *Annual Review of Microbiology* 58: 611–47. doi:10.1146/annurev.micro.58.030603.123811.
- Wang, Yu, Hua-fang Sheng, Yan He, Jin-ya Wu, Yun-xia Jiang, Nora Fung-ye Tam, and Hong-wei Zhou. 2012. "Comparison of the Levels of Bacterial Diversity in Freshwater , Intertidal Wetland , and Marine Sediments by Using Millions of" *78 (23):* 8264–71. doi:10.1128/AEM.01821-12.
- Webb, Campbell O, David D Ackerly, Mark a Mcpeek, Michael J Donoghue, and Campbell Webb. 2014. "And Community Ecology" *33 (2002):* 475–505.
- Whitman, W B, D C Coleman, and W J Wiebe. 1998. "Prokaryotes: The Unseen Majority." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (June): 6578–83. doi:10.1073/pnas.95.12.6578.
- Zhang, Tong, Ming-fei Shao, and Lin Ye. 2011. "454 Pyrosequencing Reveals Bacterial Diversity of Activated Sludge from 14 Sewage Treatment Plants." *The ISME Journal* 6 (6). Nature Publishing Group: 1137–47. doi:10.1038/ismej.2011.188.

Apéndice I. Filogenia con secuencias de referencia

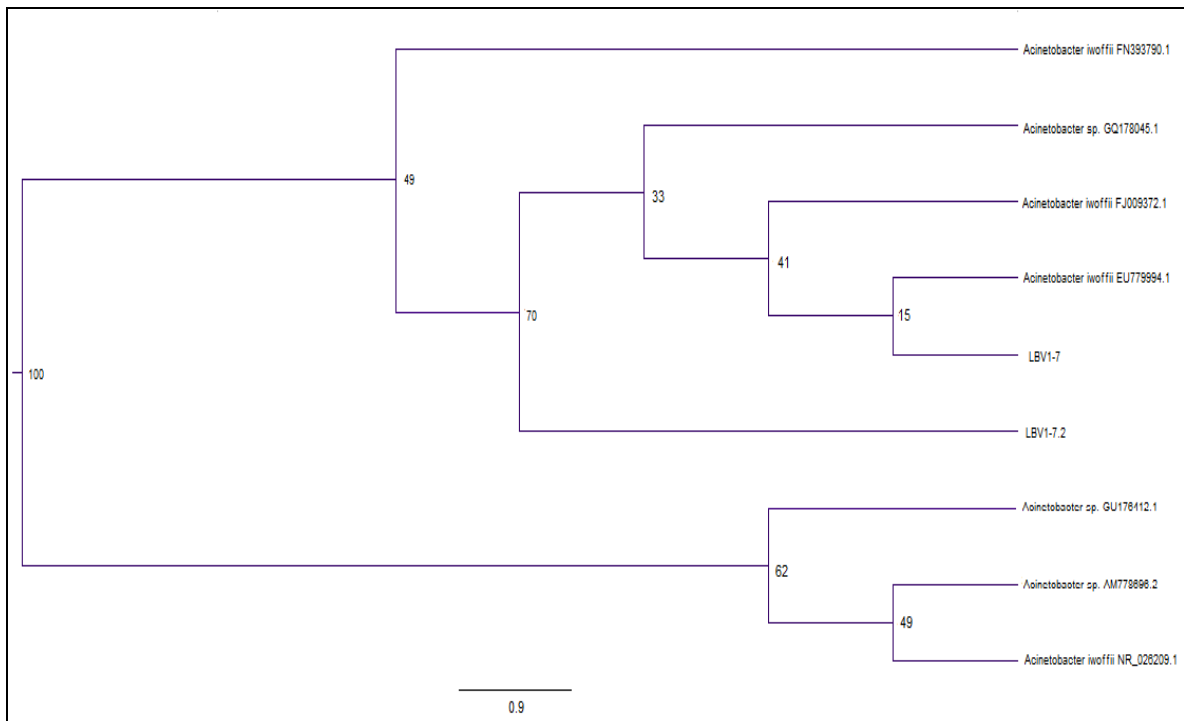


Filogenia de los diferentes grupos taxonómicos caracterizados en las cepas aisladas en este estudio. Cada una de las ramas colapsadas contiene cepas de referencia que sustentan la pertenencia de las cepas caracterizadas a sus grupos taxonómicos. A continuación se muestran a detalle cada una de las ramas.

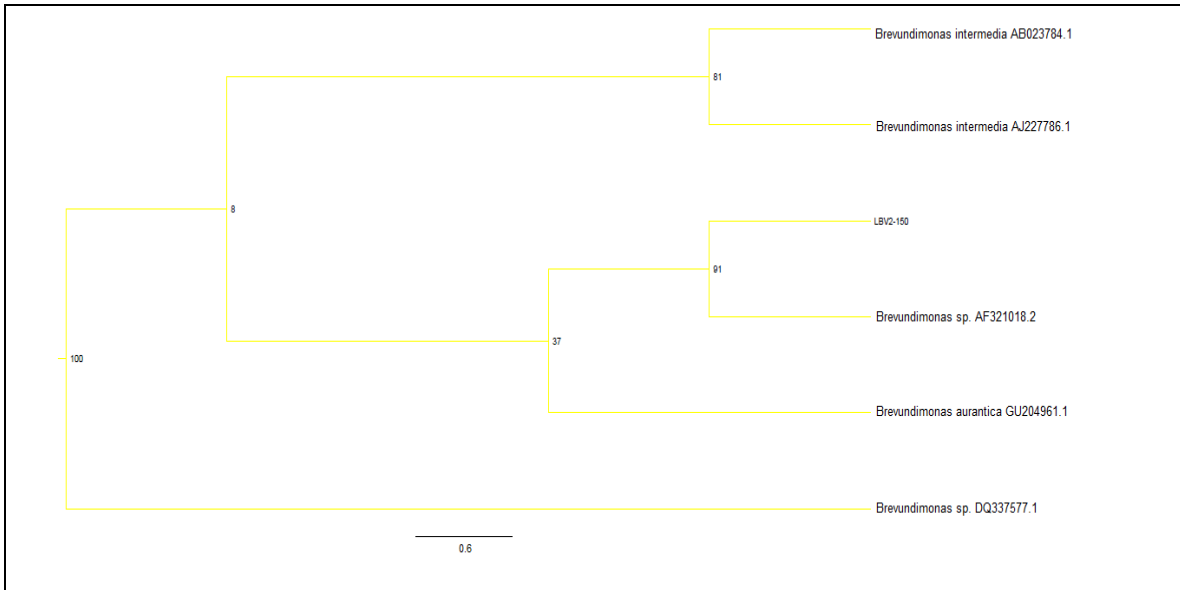
I.I rama de *Pantoea*



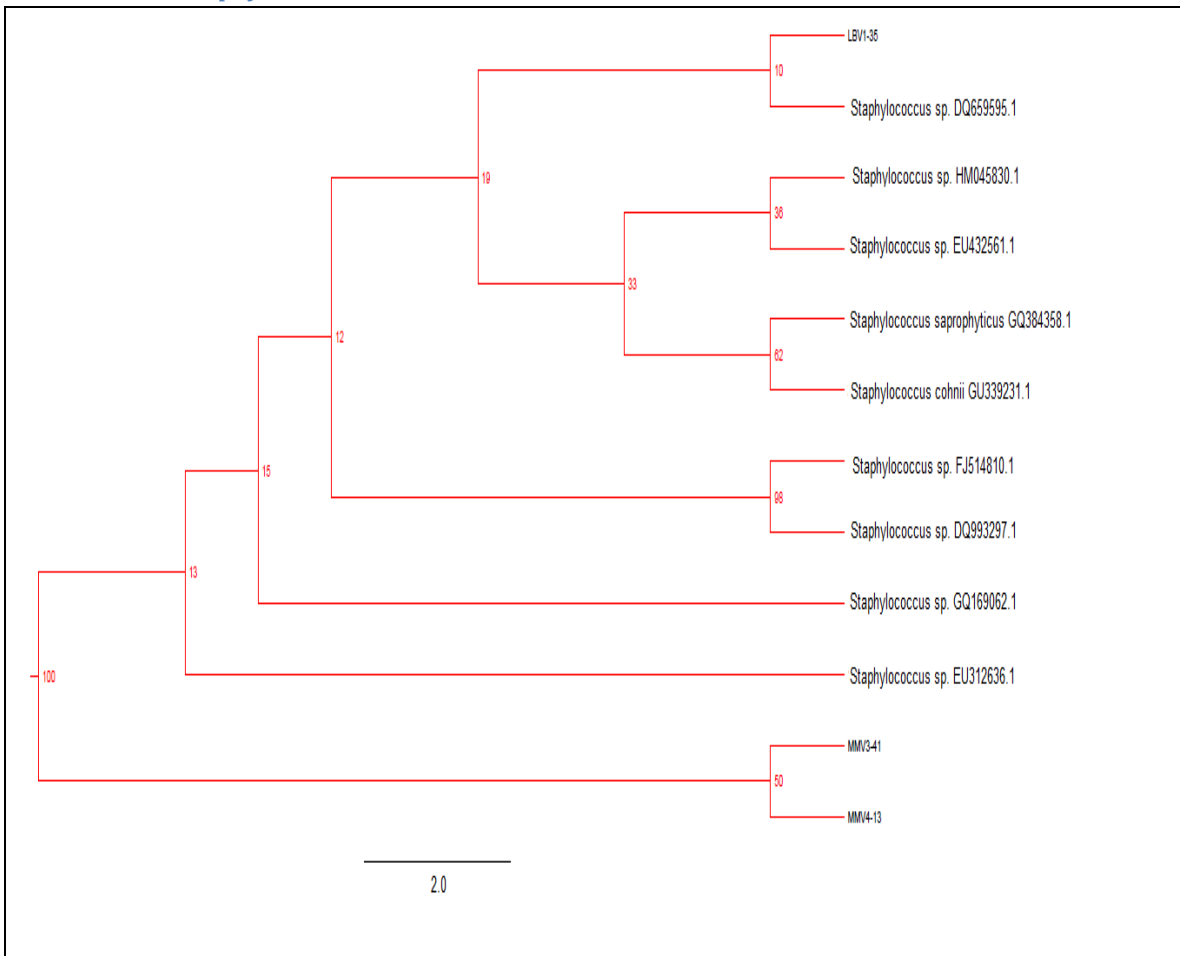
I.II Rama de *Acinetobacter*



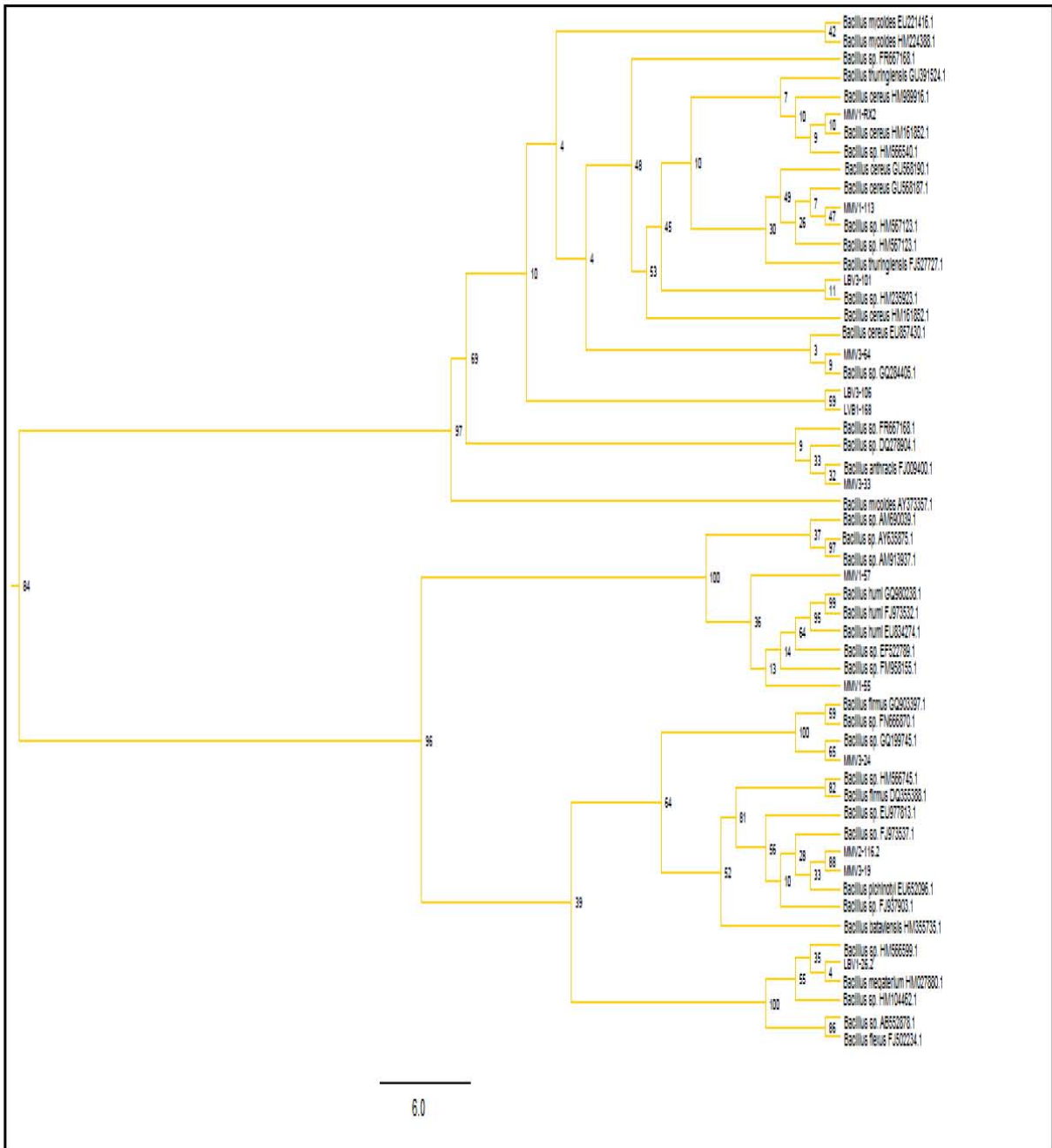
I.III Rama de *Brevundimonas*



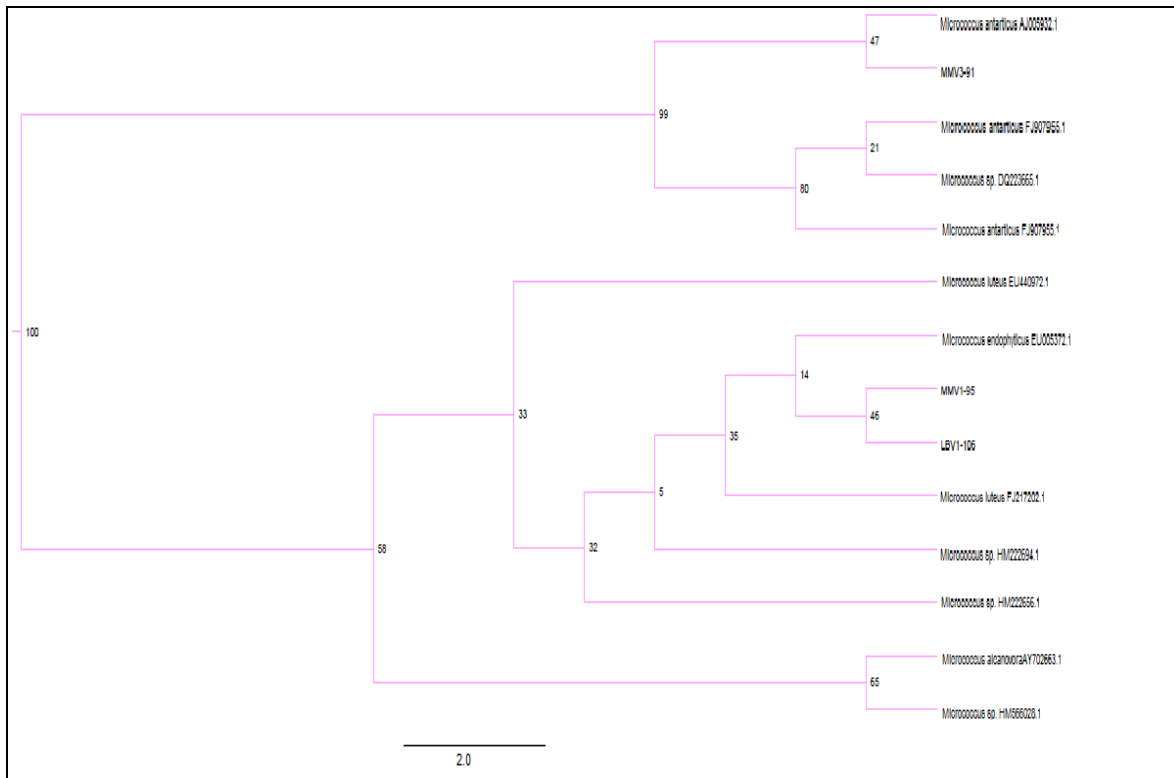
III.IV Rama de *Staphylococcus*



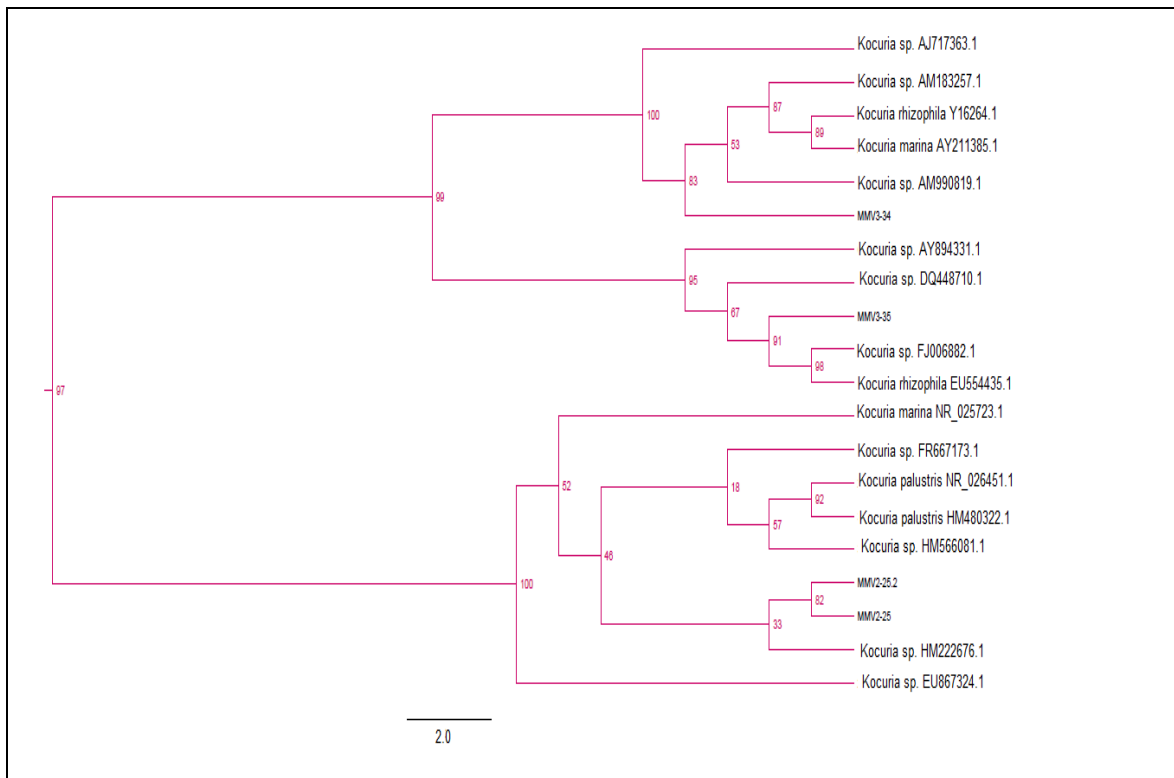
I.V Rama de *Bacillus*



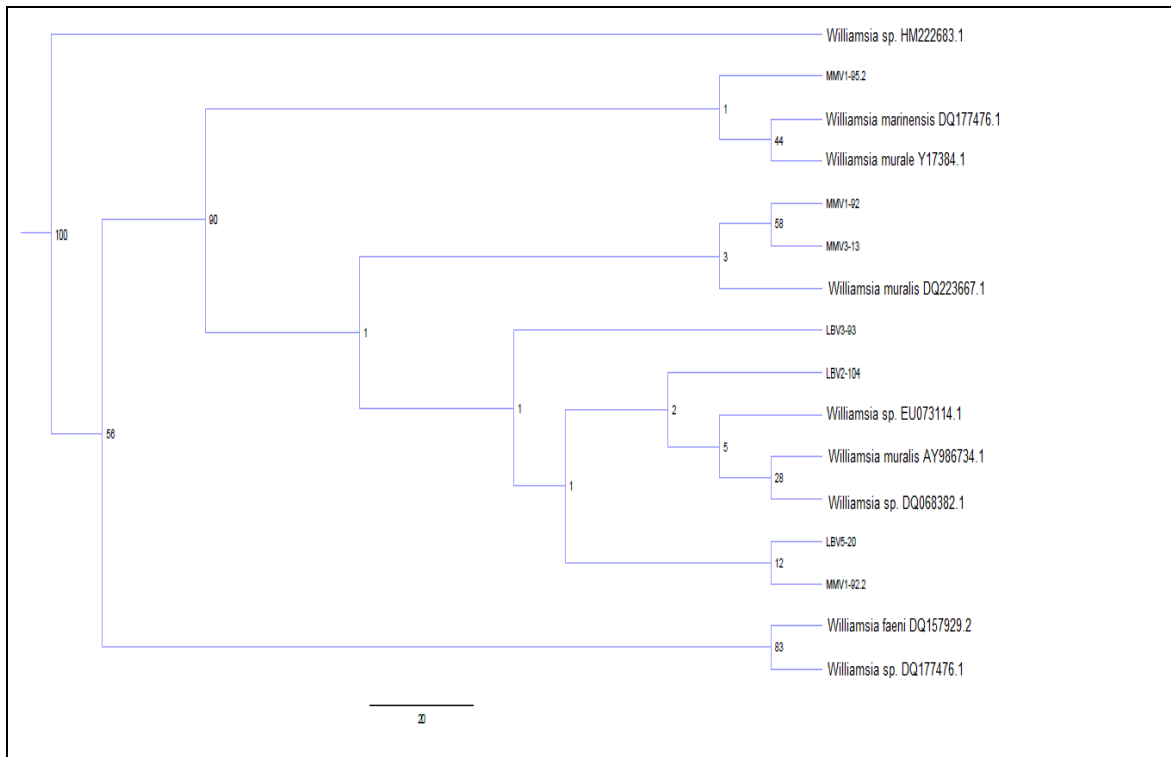
I.VI Rama de *Micrococcus*



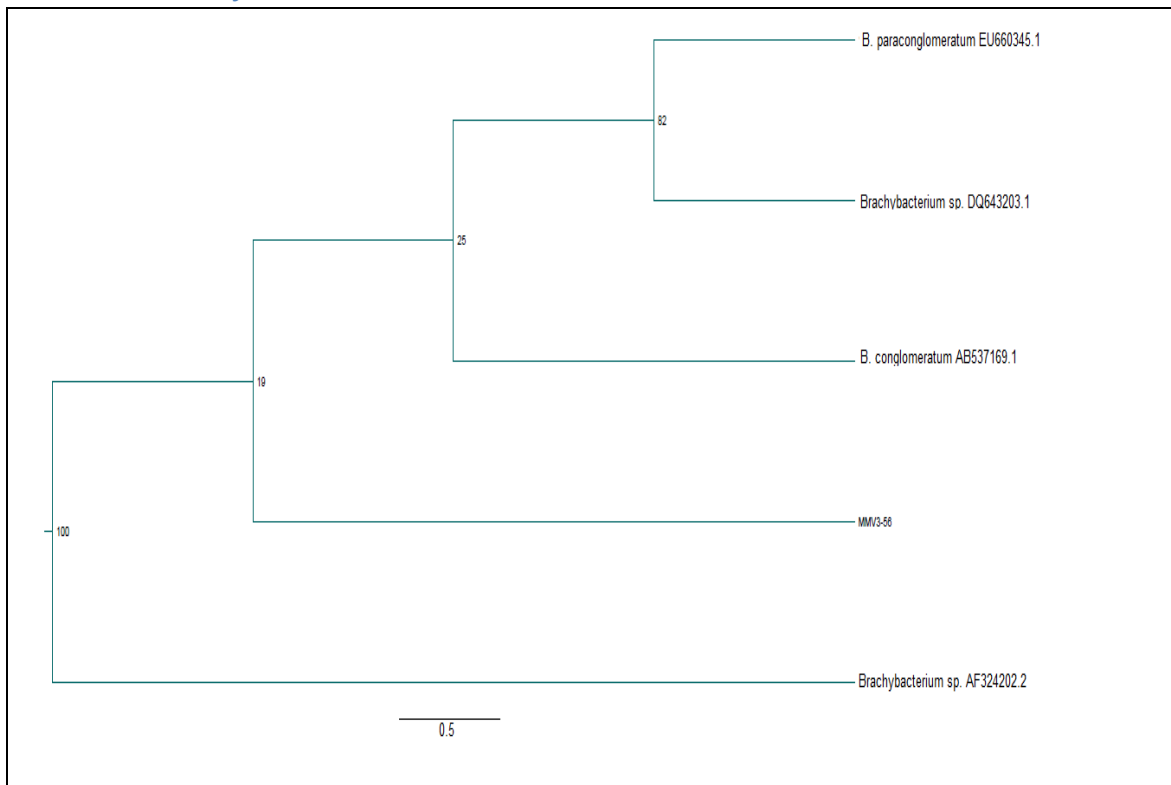
I.VII Rama de *Kocuria*



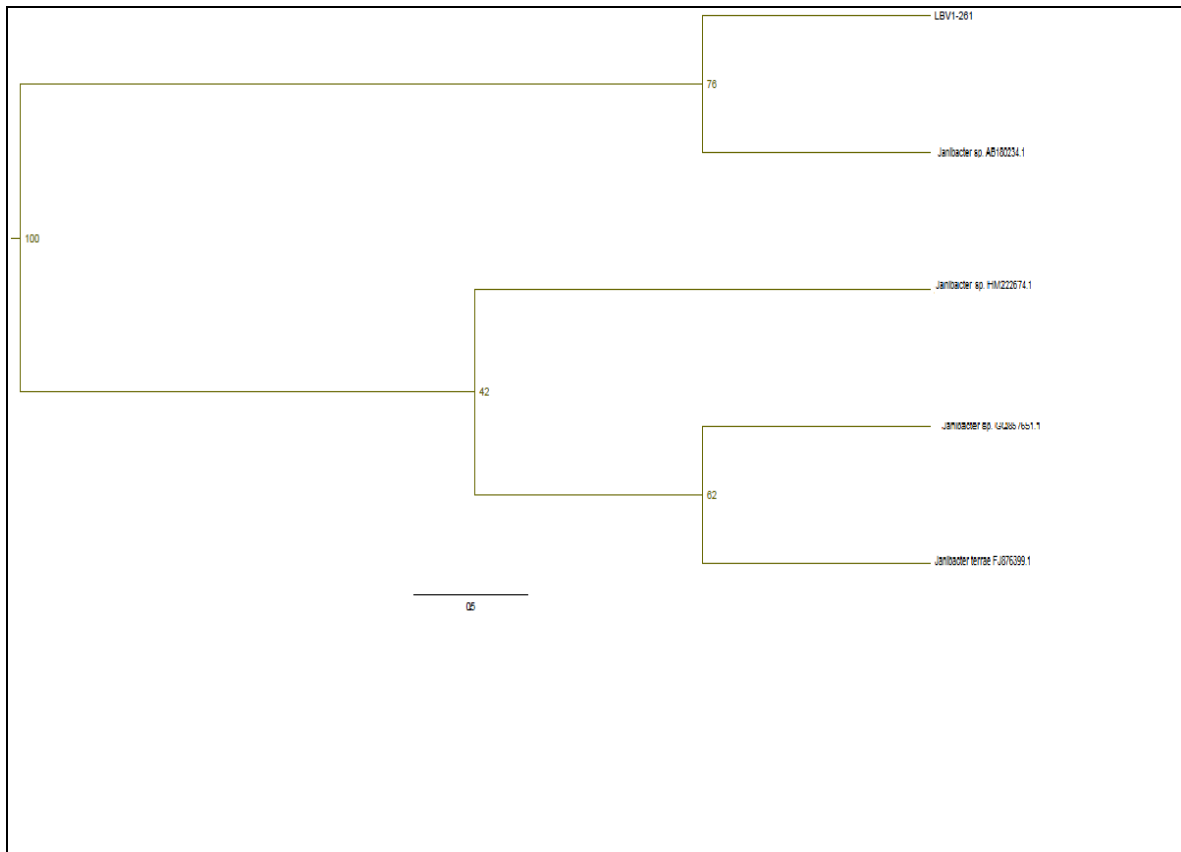
I.VIII Rama de *Williamsia*



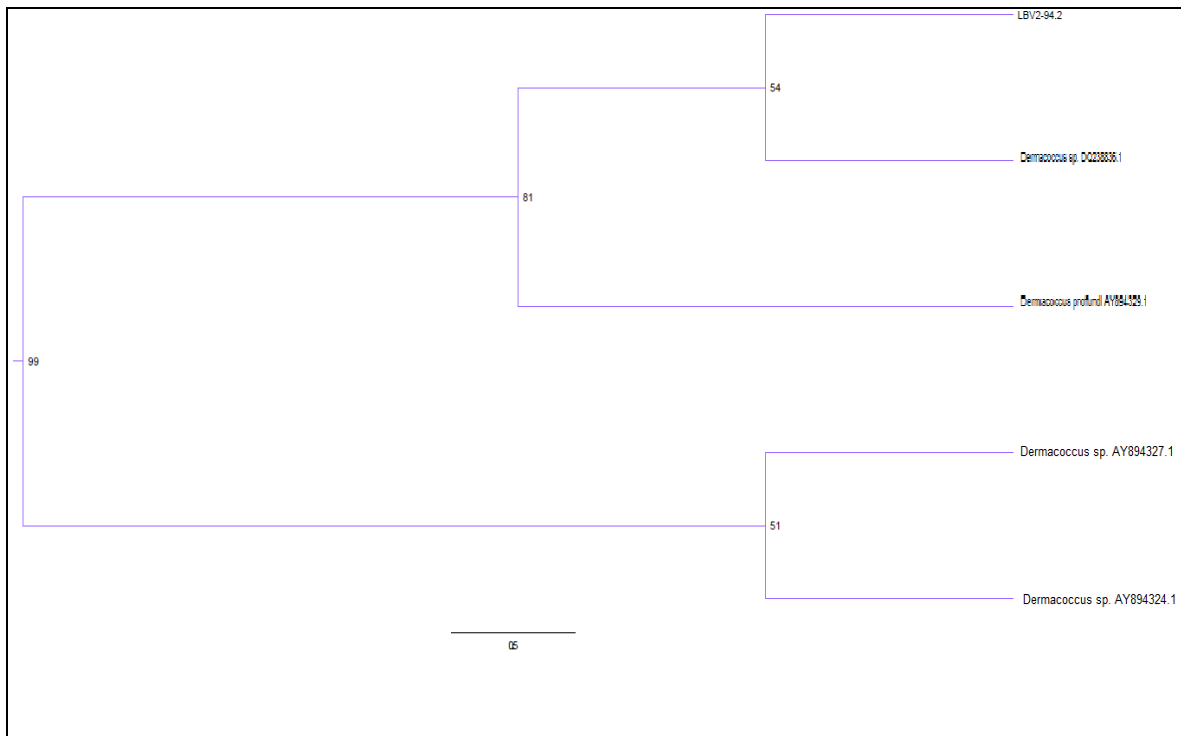
I.IX Rama de *Brachybacterium*



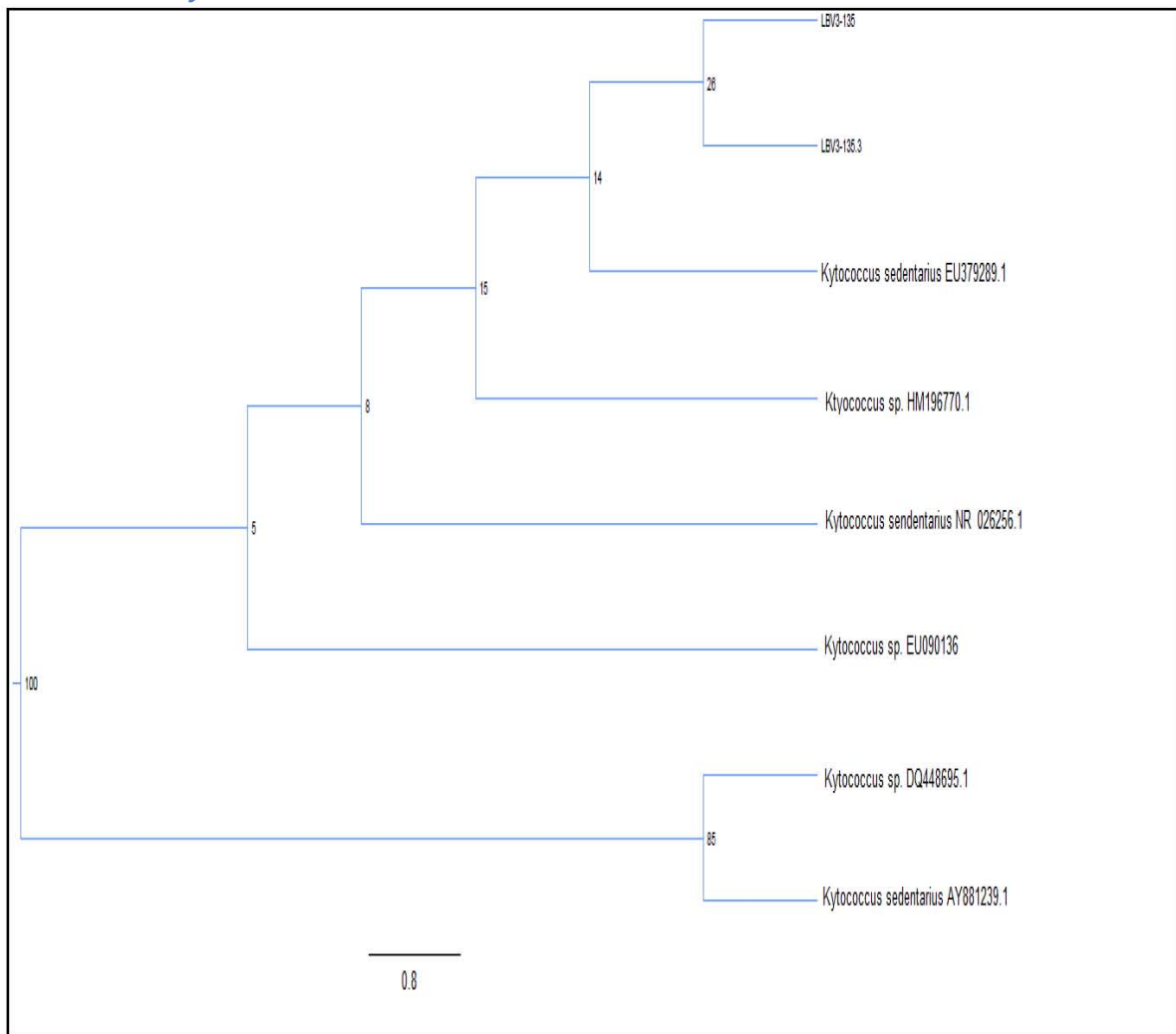
I.X Rama de *Janibacter*



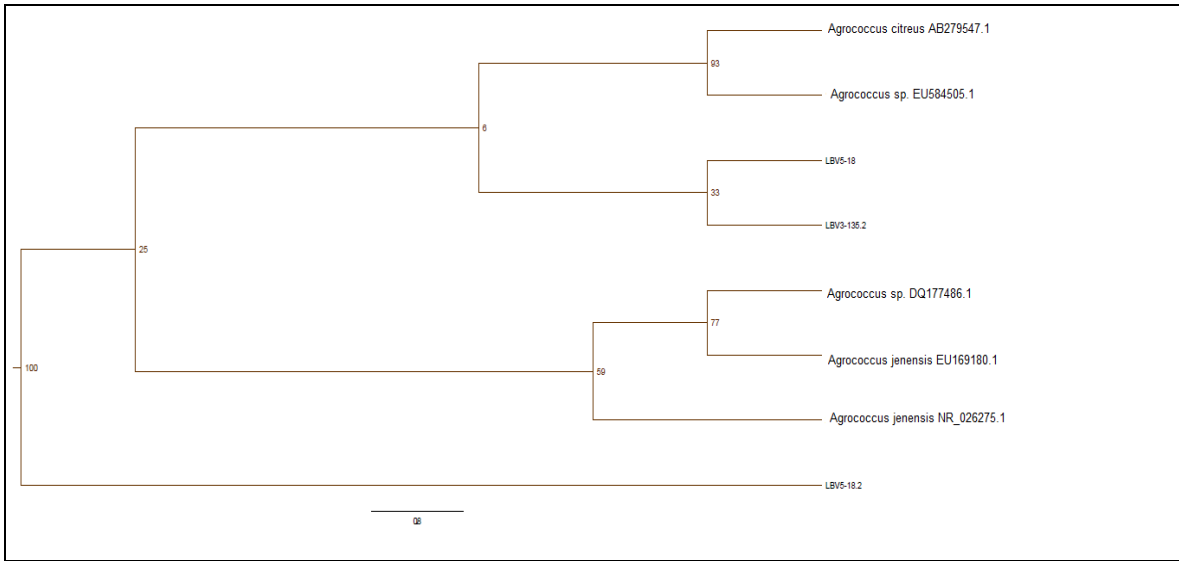
I.XI Rama de *Dermacoccus*



I.XII Rama de *Kytococcus*



I.XIII Rama de *Agrococcus*



I.XIV Rama de *Microbacterium*

