



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

Biología Evolutiva

**Coexistencia de diferentes linajes de *Pseudomonas* en Cuatro Ciénegas,
Coahuila ¿Carrera armamentista o cooperación?**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

Gabriel Yaxal Ponce Soto

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Valeria F. E. L. de M. de G. Souza Saldívar
Instituto de Ecología, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dr. Daniel Ignacio Piñero Dalmau
Instituto de Ecología, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dr. Gloria Soberón Chávez
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, MARZO, 2017.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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

Biología Evolutiva

**Coexistencia de diferentes linajes de *Pseudomonas* en Cuatro Ciénegas,
Coahuila ¿Carrera armamentista o cooperación?**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

Gabriel Yaxal Ponce Soto

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Valeria F. E. L. de M. de G. Souza Saldívar
Instituto de Ecología, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dr. Daniel Ignacio Piñero Dalmau
Instituto de Ecología, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dr. Gloria Soberón Chávez
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

MÉXICO, CIUDAD DE MÉXICO, MARZO, 2017.



Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas, en su sesión ordinaria del día 31 de octubre de 2016, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **DOCTOR EN CIENCIAS**, del Posgrado en Ciencias Biológicas, del alumno **PONCE SOTO GABRIEL YAXAL**, con número de cuenta **509015079** con la tesis titulada: **"COEXISTENCIA DE DIFERENTES LINAJES DE PSEUDOMONAS EN CUATRO CIÉNEGAS, COAHUILA ¿CARRERA ARMAMENTISTA O COOPERACIÓN?"**, bajo la dirección del **DRA. VALERIA FRANCISCA EUGENIA LEOPOLDINA MARÍA DE GUADALUPE SOUZA SALDIVAR**:

Presidente: DR. PABLO VINUESA FLEISCHMANN
Vocal: DR. LUIS DAVID ALCARAZ PERAZA
Secretario: DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU
Suplente: DR. GABRIELA OLMEDO ÁLVAREZ
Suplente: DR. ENRIQUE MERINO PÉREZ

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 13 de marzo de 2017

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT):

Beca CONACyT: CVU 412697; Número de becario 269818

Financiamiento:

Alianza WWF-Fundación Carlos Slim

PAPIIT (IN203712-3)

U. S. National Science Foundation (DEB-0950175)

National Aeronautics and Space Administration (NASA) Astrobiology (NAI5-0018)

Tutora Principal:

Dra. Valeria Francisca Eugenia Leopoldina de María Guadalupe Souza Saldívar, Instituto de Ecología, UNAM

Miembros del Comité Tutor:

Dra. Gloria Soberón Chávez, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dr. Daniel I. Piñero Dalmau, Instituto de Ecología, UNAM

Agradecimientos Personales

A mi familia por su apoyo durante todos estos años.

A la Dra. Valeria Souza por aceptarme en su laboratorio, su paciencia, apoyo y guía durante la realización de esta tesis.

A la Dra. Gloria Soberón por permitirme trabajar en su laboratorio.

A la Dra. Gabriela Olmedo por su energía inagotable durante los muestreos.

Al Dr. James Elser y los miembros de su grupo, Jessica Corman, Jorge Ramos, Zarraz Lee y Laura Steger por su ayuda durante el diseño y realización del experimento de enriquecimiento.

A Abigail González y Victoria Grosso por sus ideas y sugerencias experimentales.

A Mirna Vázquez por apoyo, paciencia y hacerme recordar que hay algo más fuera del laboratorio.

A los miembros del Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental pasados y presentes por su apoyo y comentarios para el enriquecimiento de mi proyecto.

A Valerie de Anda y Mirna Vázquez por hacerme asentar las ideas y perder hasta cierto grado el pánico escénico con sus cursos organizados.

A todas las personas que me apoyaron durante el trabajo de campo y me enseñaron cómo sobrevivir a los muestreos, en particular a Jorge Valdivia, sin su apoyo hubiera sido un caos.

A la señora Silvia Barrientos.

Título

Coexistencia de diferentes linajes de *Pseudomonas* en Cuatro Ciénegas, Coahuilila ¿Carrera armamentista o cooperación?

Capítulo 1. Introducción

1.1 Estudio de la diversidad biológica	1
1.2 Ecología microbiana	2
1.3	
Nutrientes	6
1.4 Interacciones microbianas	11
1.4.1 Competencia – Antibiosis	14
1.4.2 Cooperación – <i>Biofilms</i>	16
1.5 Mesocosmos y enriquecimiento del ambiente	18
1.6 Área de estudio. Cuatro Ciénegas	19
1.6.1 Ubicación geográfica	19
1.6.2 Clima	20
1.6.3 Hidrología	21
1.6.4 Sistema Churince	22

Capítulo 2. El enriquecimiento experimental con fósforo y nitrógeno reduce la diversidad y cambia las interacciones microbianas en un ambiente ultra-oligotrófico

2.1 Resumen	25
2.2 Artículo: Enrichment experiment changes microbiol interactions in an ultra-oligotrophic environment	26

Capítulo 3. Análisis genómico de aislados de obtenidos de un experimento de enriquecimiento *in situ*.

Introducción	40
Métodos	
Muestreo	43
Corte genómico con <i>I-Ceul</i> y electroforesis de campos pulsados.	45
Secuenciación de genomas.	45
Ensamble <i>de novo</i> , predicción de genes y anotación.	45
Comparación de genomas.	48
Análisis comparativo funcional entre genomas de diferentes tratamientos de enriquecimiento.	48
Resultados y Discusión	
Variabilidad en el número de copias del operón <i>rrn</i>	49
Características genómicas generales de las cepas secuenciadas.	49

Identificación y análisis de profagos.	52
Identificación y análisis de CRISPRs.	55
Identificación y análisis de islas genómicas y/o patogénicas.	56
Comparación de genomas.	62
Reconstrucción de vías metabólicas.	66
Material Suplementario.	72
Capítulo 4. Artículo suplementario. Modelo de dos papeles de una red de interacciones de Gamma-Proteobacteria de vida libre en un ambiente oligotrófico.	
4.1 Resumen	78
4.2 Artículo. Two-role model of an interaction network of free-living Gamma-Proteobacteria from an oligotrophic environment	
Capítulo 5. Discusión y conclusiones	97
Perspectivas	106
Referencias	107

Resumen

En este trabajo se estudió la respuesta de la comunidad microbiana en el sistema de flujo Churince del valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila, a un experimento de enriquecimiento con tres tratamientos: (i) enriquecimiento con fósforo a una concentración de 1 μM , (ii) enriquecimiento con nitrógeno y fósforo a una proporción N:P 16:1, y (iii) enriquecimiento con nitrógeno y fósforo a una proporción N:P 75:1. En primer lugar, se presenta un estudio de la comunidad microbiana cultivable previa y posterior al periodo de enriquecimiento, analizando la diversidad del sistema así como características fisiológicas tales como la formación de *biofilms* y resistencia a diversos antibióticos. Los resultados muestran que la composición de la comunidad cultivable se vio afectada por dicho periodo de enriquecimiento, encontrándose no sólo una pérdida en su diversidad, sino también una disminución en la proporción de aislados resistentes a antibióticos. En segundo lugar, se presenta un análisis genómico de siete cepas obtenidas del mismo experimento de enriquecimiento así como de una cepa aislada del sistema Churince en el año 2001. En este análisis se definieron tres clados para las cepas analizadas: (i) clado *P. aeruginosa*, (ii) clado *P. fluorescens*, y (iii) clado *Aeromonas*. Para las cepas analizadas se encontró un tamaño de genoma similar a los reportados en las bases de datos en contraste con la especie endémica *B. coahuilensis* que presenta una reducción de genoma. Así mismo se encontró la presencia de islas genómicas en la totalidad de los aislados, pero ninguna se caracterizó como isla de patogénesis. Finalmente, se presenta el estudio de una red de interacciones entre bacterias acuáticas del sistema Churince aisladas previo al periodo de enriquecimiento. Los resultados muestran una red de interacción determinada principalmente por las cepas antagonistas, donde éstas tienen una mayor influencia en la estructura de la comunidad. Las conclusiones generales de este trabajo son: (i) La entrada de nutrientes en el sistema analizado provocó una disminución en la diversidad de la comunidad microbiana. (ii) La estructura de la comunidad bacteriana está determinada principalmente por las cepas antagonistas. (iii) Dicha estructura se vio afectada al reducirse la proporción de aislados resistentes a antibióticos debido a la entrada de nutrientes. (iv) Las cepas analizadas han seguido una estrategia diferente a la reducción de su genoma en este valle oligotrófico. Aunque no es posible determinar el efecto del enriquecimiento a nivel de genoma, éste estudio abre la puerta para el análisis comparativo de aislados en el valle de Cuatro Ciénegas.

Abstract.

In this work we studied the response of the microbial community in the flow system Churince, in the Cuatro Ciénegas valley, Coahuila, to an enrichment experiment with three treatments: (i) enriched with phosphorus to a 1 μM concentration, (ii) enriched with nitrogen and phosphorus to a N:P ratio of 16:1, and (iii) enriched with nitrogen and phosphorus to a N:P ratio of 75:1. In this thesis, it is firstly presented a study of the culturable microbial community before and after the enrichment period, analyzing the diversity of the system, as well as physiological characteristics such as biofilm formation and resistance to several antibiotics. The results show that the community composition of the cultivable community was affected by the enrichment period, exhibiting as a consequence not only a lower diversity, but also a reduction in the proportion of isolates resistant to antibiotics. In second place, it is presented a genomic analysis of seven strains isolated from the enrichment experiment, as well as a strain isolated from the flowsystem Churince in 2001. In this analysis, three general clades were defined for the analyzed strains: (i) *P. aeruginosa* clade, (ii) *P. fluorescens* clade, and (iii) *Aeromonas* clade. For the analyzed strains, it was found a genome size similar to the reported size in databases for close strains, which contrast with the endemic endemic specie *B. coahuilensis*, which exhibit a genome reduction. In the same way, genomic islands were identified in all the analyzed genomes, however, none of them was characterized as a pathogenic island. Finally, it is presented the study of an interaction network between aquatic bacteria from the flowsystem Churince, isolated before the enrichment period. The results show an interaction network mostly determined by the antagonistic strains, where they have a greater influence in the community structure. The main conclusions of this work are: (i) The nutrient influx into the analyzed flowsystem cause a reduction in the microbial community diversity. (ii) The structure of the bacterial community is mostly determined by the antagonistic strains. (iii) This community structure was affected by the reduction in the proportion of strains resistant to antibiotics due to nutrient influx. (iv) The analyzed strains have followed a different strategy to the genome reduction in this oligotrophic valley. Despite it is not possible to determine the effect of the enrichment at a genomic level, this study pave the way for future comparative analysis of Cuatro Ciénegas isolates.

Capítulo 1. Introducción

1.1 Estudio de la diversidad biológica

Después de un viaje de casi cinco años a bordo del H.M.S. Beagle y otros tantos en los que planteó sus ideas en el libro *On the Origin of Species*, Charles Darwin estableció los fundamentos de lo que hoy llamamos Selección Natural (Darwin, 1876). Previo este trabajo, los naturalistas establecían como única fuente de variación en los organismos aquellas condiciones externas como son el clima, alimento, etc., factores que si bien juegan un papel en el origen de la diversidad existente, no podemos asignarlos como la única fuente de variación.

Diversos autores han intentado explicar las causas de la gran diversidad que observamos hoy en día, abarcando desde cadenas alimenticias hasta la capacidad de dispersión de los organismos (Hutchinson, 1959; Kassen *et al.*, 2000; Kerr *et al.*, 2002; Kassen *et al.*, 2004; Bowen *et al.*, 2013), sin embargo la diversidad de especies está dada por la interacción de una variedad de factores, tanto bióticos como abióticos en un contexto evolutivo.

El término de “especie” es un concepto que ha estado sujeto a mucha controversia pues aún hoy en día no existe consenso en cómo delimitar las especies particularmente en el caso de las bacterias. El concepto biológico normalmente aceptado establece a una especie como un grupo de poblaciones naturales con la capacidad ya sea real o potencial de entrecruzarse y que están reproductivamente aisladas de otro grupo (Mayr, 1942). Esta definición, sin embargo, aún está sujeta a cierta polémica, pues muchos biólogos evolutivos consideran que el proceso de especiación es completo, solamente una vez que se ha dado un aislamiento precigótico en las “nuevas especies”. Como puede observarse, ésta definición está pensada para aquellos organismos que presentan un tipo de reproducción sexual principalmente por razones históricas, sin embargo hoy en día ésta no es suficiente debido a que excluye a aquellos organismos tales como bacterias cuya reproducción no es sexual. Para estos casos se ha propuesto una definición filogenética de especies basada en las diferencias entre *E. coli* y sus parientes más cercanos en donde se incluyen a aquellos individuos (cepas) que presentan un grado de hibridación genómica DNA-DNA mayor al 70% e identidad del 97% a nivel del gen 16S rRNA (Wayne *et al.*, 1987;

Drancourt et al., 2000). Sin embargo, esta definición no parece funcionar para muchos linajes como *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Vibrio* spp. entre muchos otros (Chun et al., 1999; Sacchi et al., 2002; Bodilis et al., 2012; Vos et al., 2012), donde el 16S rRNA es un marcador demasiado conservado para estimar los eventos de diferenciación entre linajes, aunado a que en procariontes la transferencia horizontal de genes puede mezclar linajes muy separados cambiando así su señal filogenética (Ochman et al., 2000; Koonin et al., 2001; Gogarten et al., 2003; Philippe and Douady, 2003; Gogarten and Townsend, 2005; Boussau et al., 2008; Barraclough et al., 2012; Let et al., 2014; Katz et al., 2015).

1.2 Ecología microbiana.

La ecología microbiana se encarga de estudiar las interacciones entre microbios, así como su relación con el ambiente tanto biótico, como abiótico. En años recientes ha habido un interés creciente en el estudio de la ecología microbiana, debido a las características particulares de estos organismos (Rainey et al., 2000; Prosser et al., 2007; Lozupone et al., 2008). Entre las características más notables de los microorganismos está su enorme rango ambiental, es decir, pueden ser encontrados no solo en suelos, cuerpos de agua dulce o ambientes marinos, asociados o plantas o animales, sino también en aquellos ambientes denominados extremos donde los eucariontes no pueden sobrevivir, siendo así los microorganismos los seres dominantes en el planeta (Alberts et al., 2002; Wu et al., 2009; Rinke et al., 2013).

A diferencia de los macroorganismos que junto con su ambiente pueden ser estudiados a simple vista, los microorganismos, así como su ambiente, deben ser analizados a una escala mucho más reducida, los denominados microambientes (Rainey and Travisano, 1998; Hahn and Pockl, 2005; Hunt et al., 2008, Koeppel et al., 2013). Esto, aún hoy en día, representa un reto técnico pues al intentar analizar estas escalas, se corre el riesgo de que las propiedades fisicoquímicas representen más un promedio de la heterogeneidad presente a una micro-escala que constituye el entorno del vecindario normal de una bacteria. Por lo tanto, es a esta micro-escala donde los microorganismos se encuentran interactuando en la naturaleza, no sólo con su entorno abiótico, sino también con la comunidad que le rodea, a esta “burbuja” multidimensional donde habita un microorganismo e interacciona con su comunidad se le denomina nicho, por

supuesto esta es una burbuja conceptual que se conoce también como nicho potencial -todos los sitios donde podría vivir este microorganismo- (Pulliam, 2000; Koza et al. 2011; Nunoura et al. 2015) y el lugar con la condiciones y los vecinos donde realmente se encuentra se le conoce como nicho realizado (Jackson and Overpeck, 2000; Soberón and Nakamura, 2009; Materna et al., 2012; Crotty and Bertness, 2015; Okie et al., 2016).

Para Harpole y Tilman (2007) la alta diversidad de organismos que encontramos en un sitio dado, está determinada por la coexistencia de diversos competidores, esta coexistencia puede ser resultado de una alta dimensionalidad del nicho, dada por ejemplo por un alto número de recursos o de factores limitantes. Alternativamente, esta diversidad puede ser independiente de la dimensionalidad del nicho, ya que es posible que un alto número de especies puedan coexistir cuando se encuentran restringidas por uno o dos factores limitantes siempre y cuando las especies cuenten con *trade-offs* adecuados en aspectos como la habilidad de competencia o colonización. Un ejemplo de éstos *trade-offs* es por ejemplo el destinar nutrientes en la competencia como puede ser la producción de toxinas, pero a consecuencia de éstos invertirá menos recursos en la dispersión. Tomando estas observaciones, la teoría de nichos sugiere que es la combinación entre una disminución en el número de recursos y cambios en la identidad de los factores limitantes lo que permite la coexistencia al angostar el nicho, por lo que más “burbujas” pueden ocupar un mismo espacio (Chesson, 2000). Por lo tanto, para que dos o más especies puedan coexistir en un ambiente se debe cumplir con una serie de prerequisites, siendo los más comunes el uso diferencial de recursos (MacArthur, 1972), diferente susceptibilidad a los depredadores (Leibold, 1996) o el uso diferencial del ambiente abiótico así como sus respuestas a la perturbación o estrés (Kneitel and Chase, 2004). De tal forma que la competencia intra-específica sea mayor que la inter-específica (Amarasekare, 2003).

Amarasekare (2002) desarrolló un modelo de competencia y coexistencia en el cual las especies competidoras explotan un recurso común, recurso que puede ser biótico (cuya disponibilidad está influenciada por los consumidores) o abióticos (con una disponibilidad constante y que no se ve influenciada por los consumidores). Cuando dos especies compiten por un recurso dinámico, no puede ocurrir una coexistencia mientras que la interferencia competitiva involucra un mayor costo que el beneficio otorgado. Sin embargo puede ocurrir un efecto en el

que la especie con la mayor capacidad de interferencia, puede desplazar a la especie con la mayor tasa de explotación de recursos al encontrarse la primera en una abundancia inicial mayor (Amarasekare, 2002). Por otro lado, cuando la interferencia competitiva ofrece un beneficio a ambas especies, se puede lograr una coexistencia mediante un *trade-off* entre la explotación y la interferencia como puede ser por ejemplo el parasitismo o la depredación. Estos resultados se encontraron para ambos tipos de recursos, indicando que el resultado de la explotación y la interferencia no se encuentra influenciado por la naturaleza de los recursos por los que se compiten. (Amarasekare, 2002). Las predicciones de este modelo fueron observadas en un análisis de diversos aislados del género *Streptomyces*. En este trabajo se encontró que la sobrevivencia del organismo más abundante es igualmente frecuente que la sobrevivencia del que presenta una mayor adecuación, además que en competencias pareadas, la especie que presenta una mayor abundancia inicial será la que desplazará a las competidoras (Wright and Vetsigian, 2016). El efecto antagonista resultado de esta interferencia competitiva, por ejemplo la producción y degradación de antibióticos, puede generar un estado de multiestabilidad o coexistencia estable, el cual a su vez depende de pares de especies estables, el cual puede darse por fenómenos de cooperación intra-específica como el *quorum sensing* o la secreción de bienes públicos.

Por otra parte, no cabe la menor duda de que existe una constante retroalimentación entre el ambiente y la vida que lo habita, por ejemplo, se sabe que las propiedades fisicoquímicas del ambiente se encuentran influenciando la riqueza y uniformidad de los organismos (Marini et al., 2007) siendo por ejemplo la salinidad, el pH o la concentración de oxígeno determinantes en los ecosistemas acuáticos, al mismo tiempo que el uso de los nutrientes y minerales por parte de la microbiota pueden alterar a su vez la concentración de oxígeno, el pH y la salinidad (Jones et al., 1993; Jones et al., 1994; McNally et al. 2014) . Asimismo, se sabe que el contenido de nitrógeno (N) y fósforo (P) en el ambiente es un elemento importante en la composición de especies, tanto a escala macro como microscópica (Makino and Cotner, 2005; Jansson et al., 2006; Marini et al., 2007; Christofoli et al., 2010; Nelson and Carlson, 2011). En un trabajo sobre el enriquecimiento de un microcosmos con P y N, al analizar la respuesta particular de distintos taxa bacterianos Nelson y Carlson observaron un cambio rápido en la estructuración de las comunidades de bacterioplancton, encontrándose mayores diferencias al contrastar los tratamientos de P y el control, que los tratamientos de N y el control. Ésta misma observación se encontró para el caso

de Actinobacteria (Nelson and Carlson, 2011). Estos cambios en la estructuración de la comunidad nos indican que la modificación en las condiciones del ambiente, en este caso por una adición de nutrientes va a influir de manera importante en su composición. Estos cambios van a estar guiados por la forma en que los organismos respondan a la entrada de nuevos nutrientes, como afecte sus tasas de crecimiento, el consumo de materia orgánica entre otros factores.

Paradójicamente como respuesta a la competencia por los nutrientes fundamentales, una característica importante de las comunidades microbianas, es su redundancia metabólica, es decir, una comunidad presenta diferentes poblaciones que pueden metabolizar el mismo sustrato, lo cual incrementa la resiliencia a las perturbaciones del ambiente, pues es poco probable que un cambio drástico en el ambiente llegue a extinguir a todas las especies que se encuentran realizando una función ecológica particular (Naeem et al., 1998). Desde el punto de vista del nicho fundamental determinado por el uso de los recursos esto puede sonar absurdo, sin embargo, la clave está en el uso diferencial de este mismo recurso. En este punto, es importante resaltar la relación entre la biodiversidad y la función y estabilidad del ecosistema. En un ecosistema, cada nueva especie que es incorporada, aportará una nueva función a dicho ecosistema, sin embargo, en algún punto, las nuevas especies comenzarán a ser redundantes, pues una especie existente será capaz de realizar las funciones que las nuevas especies puedan llevar a cabo, esto recibe el nombre de redundancia funcional. Esta redundancia funcional, asociada con una alta diversidad, es de gran relevancia para un ecosistema que se encuentra expuesto a fluctuaciones en sus condiciones ambientales tales como cambios en pH o desecación (Figura 1.1). En un ecosistema con una alta redundancia funcional, la probabilidad de que al menos una especie sea tolerante a las nuevas condiciones ambientales es mayor, y por consiguiente éste retiene su función, lo que lo presenta como funcionalmente estable (Loreau, 2000; Tilman et al., 2006). Al enmarcar una comunidad microbiana en un contexto temporal, podemos definir tres propiedades importantes para considerar a esta comunidad como estable frente a perturbaciones. Por un lado, si ésta no cambia en su composición se dice que es una comunidad “resistente”. Si posterior a la perturbación vuelve a su composición inicial, hablamos de una comunidad “resiliente”, pero por otro lado, si a pesar de presentar cambios en su composición, mantiene sus funciones iniciales, como se mencionó anteriormente, podemos también hablar de “redundancia funcional” (Moya and Ferrer, 2016).

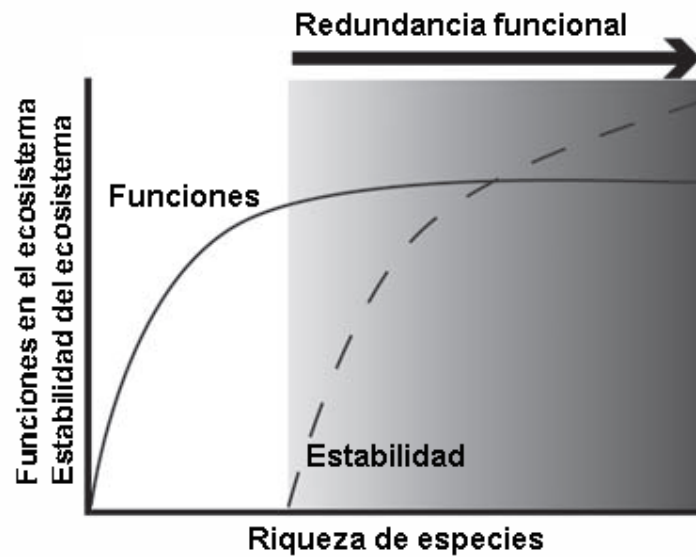


Figura 1.1. Modelo conceptual de la relación entre la redundancia funcional y la estabilidad del ecosistema. Al incrementar el número de taxa en un ecosistema, el número de funciones presentes se ve incrementado, sin embargo, en un punto, los nuevos taxa no aportan nuevas funciones pero incrementan la redundancia. En un sistema redundante es más factible la conservación de una función dada posterior a un evento de estrés (Modificado de Konopka, 2009).

1.3 Nutrientes

Como ya mencionamos desde el punto de vista del nicho, para un organismo, un recurso es todo aquello que puede ser consumido por él, y cuya disponibilidad se ve afectada por la actividad de otros organismos (Tilman, 1982), esto incluye entre otros no sólo nutrientes minerales o agua, sino también el espacio que habitan y la radiación solar. Debido a esto, los organismos deben competir entre ellos para obtener, o en su defecto compartir, un recurso limitado. A grandes rasgos, la competencia puede dividirse en dos categorías: interferencia competitiva y competencia por explotación (Begon et al., 2006).

En el segundo caso, la hipótesis de la proporción de recursos planteada por Tilman (1988) propone que tanto la disponibilidad como la demanda individual por nutrientes, así como la velocidad en que los consumen, determinará la predominancia de los diferentes taxa, siendo

aquellos taxa que consumen el recurso limitante mas rápido los que ganan. Esta predicción ha sido probada en diversos experimentos de competencia con bacterias (Smith, 1993), fitoplancton (van Donk and Kilham, 1990), zooplancton (Ciros-Pérez et al., 2001) y plantas (Dybzinski and Tilman, 2007). Por otra parte, el primer caso es mas complejo, ya que la interferencia competitiva ocurre mediante la interacción directa de los dos individuos para evitar que el otro pueda consumir el recurso. Esta interacción se puede ver ejemplificada en la producción de antibióticos en bacterias (Begon et al., 2006), los cuales pueden inhibir o de plano destruir, al competidor que se encuentra dentro del área donde el antibiótico se difunde o en contacto directo como por ejemplo para inhibir la formación de la pared celular en el caso de los betalactámicos. En contraparte, la competencia por explotación se caracteriza por la falta de una interacción directa entre los individuos y se enfoca más en el consumo del mismo recurso. De esta manera, un individuo al consumir un recurso compartido, disminuye la disponibilidad de éste y afecta a todos aquellos individuos que requieren dicho recurso para sobrevivir. La intensidad de la competencia por explotación está fuertemente ligada a la relación entre la disponibilidad y la demanda del recurso, mientras que la interferencia competitiva puede ser intensa aún cuando el recurso no sea limitante en un momento dado (Amarasekare, 2002; Begon et al., 2006, Nedialkova et al., 2014).

De acuerdo a la disponibilidad de nutrientes y su productividad, los ambientes pueden clasificarse como, mesotrófico (productividad moderada), eutrófico (alta productividad) y oligotrófico (baja productividad) (Simpson, 2002). Los rangos generales utilizados para definir estas clases pueden ser encontradas en la Tabla 1.1. Es muy interesante que dentro de “la burbuja multidimensional” que constituye el nicho, los nutrientes limitantes son centrales, por lo que los ambientes pobres o extremadamente pobres en nutrientes constituyen un tipo de estrés muy particular para la vida que no se “resuelve” con soluciones fisiológicas como otros, este es el caso de hábitats donde las condiciones de temperatura, pH, salinidad o presión son extremas, donde los organismos que los colonizan poseen características únicas respecto a sus membranas, metabolismo o su genoma. En el caso de los microorganismos de ambientes oligótrofos o inclusive en los ultraoligotróficos, las células son similares en gran medida en sus características estructurales, metabólicas y genéticas a otros organismos, sin embargo, estos organismos enfocan sus esfuerzos en la diversificación en el uso de ese elemento limitante y muchas veces se

observa una complementación metabólica con los miembros de su comunidad que sonaría paradójica desde el punto de vista de la exclusión competitiva (Morris et al., 2012; Sachs and Hollowell, 2012; D'Souza et al., 2014; Fullmer et al., 2015, Mas et al., 2016).

Con base en su origen, los nutrientes que se incorporan a un hábitat pueden clasificarse de dos maneras: autóctonos, generados dentro del hábitat, y alóctonos, generados en otro sitio y posteriormente transportados. Entre las principales fuentes de nutrientes alóctonos se encuentran la atmósfera, la actividad volcánica y los cuerpos de agua interconectados entre ellos. Hoy en día, sin embargo, la actividad antropogénica juega un papel importante en la incorporación de este tipo de nutrientes en el ambiente principalmente a partir de la emisión de contaminantes a la atmósfera, el drenaje doméstico, la entrada de los desechos industriales al aire y agua, un exceso en el uso de agroquímicos en la producción agrícola, entre otros. La cantidad e identidad de los nutrientes de estas fuentes alóctonas que son incorporados al ecosistema, están fuertemente influenciados por la geología, clima, así como por los tipos y diversidad de la biota presente (Poindexter, 2009).

Tabla 1.1. Características de ambientes acuáticos. (Adaptada de Sigeo, 2005)

Habitat	Flujo de C ($\mu\text{g C l}^{-1}\text{dia}^{-1}$)	Productividad ($\mu\text{g C m}^{-2}\text{año}^{-1}$)	Chl a ($\mu\text{g l}^{-1}$)	DOC ^b ($\mu\text{gC l}^{-1}$)	Fosfato ($\mu\text{g P l}^{-1}$)	N total ($\mu\text{gN l}^{-1}$)	Bacteria (CFU/ml)
Ultraoligotrófico			< 1		< 4	< 100	
Oligotrófico	10-100	< 150	1-2.5	< 0.5	4-10	100-200	$10^2 - 10^5$
Mesotrófico			2.5-8		10-35 ^a	380-480	
Eutrófico			8-25		35-100 ^a	580-750	
Hypertrófico			> 25		> 100	> 750	

^a Condiciones correspondientes al Lago Washington, Seattle, USA; 1963-1966 corresponde a un período de eutrofización. 1971-1979 fueron los años correspondientes a la recuperación de las condiciones mesotróficas (Poindexter, 2009).

^b Carbón orgánico disuelto.

La llegada de nutrientes alóctonos a un ecosistema tiende a ser no continua, con variación en la cantidad y frecuencia. En ambientes ultra-oligotróficos se ha observado que entre mas limitante sea un nutriente la comunidad es más susceptible a una perturbación por la entrada de nutrientes (Edmonson and Lehman, 1981; Carlson et al., 2002; Makino and Cotner, 2005; Jansson et al., 2006; Donohue et al., 2009; Nelson and Carlson, 2011; Ponce-Soto et al., 2015). Sin embargo, cuerpos grandes de agua tienden a ser resilientes, por lo que la prevención y reducción en la frecuencia de estas entradas de nutrientes pueden ayudar a restaurar las condiciones de oligotrofia (Edmonson and Lehman, 1981). Por otra parte, cuando en un ambiente oligotrófico, los períodos de abundancia relativa de nutrientes son cortos y esporádicos, existe una ventaja para aquellos organismos que son capaces de asimilar nutrientes a bajas concentraciones, así mismo resulta ventajoso presentar un sistema de transporte con alta afinidad y baja especificidad, para que de esta manera sea sencillo captar cualquier nutriente que llegue al ambiente. Estudios fisiológicos con bacterias aisladas de ambientes oligotróficos han encontrado que éstas presentan sistemas de transporte con una alta afinidad, mientras que estudios a nivel genómico muestran números relativamente grandes de genes involucrados en actividades de transporte tales como el sistema TonB. Como se mencionó anteriormente, la adición de nutrientes en un ambiente determinado tiene repercusiones sobre la estructura de la comunidad microbiana, los cuales pueden variar dependiendo de la biodiversidad previa al incremento de la disponibilidad de nutrientes, tal como se observó en un experimento de enriquecimiento en el lago Owasso (Minnesota, USA). La comunidad bacteriana encontrada en el lago Owasso ha sido reportada como una de las menos diversas comunidades bacterianas conocidas (Makino and Cotner, 2005). La comunidad bacteriana de este lago, al ser enriquecida con nitrógeno, fósforo y carbón, mostró una respuesta más cercana a lo esperado para una sola cepa que al de una comunidad, lo que sugiere que si la diversidad bacteriana en un ambiente determinado es bajo, esta diversidad se mantendrá baja debido al bajo potencial de la comunidad de responder a los cambios en su ambiente. Por otro lado, en ambientes más diversos, un enriquecimiento con nutrientes se ha observado que homogeniza la composición del ensamble de la comunidad (Carlson et al., 2002; Donohue et al., 2009).

Zhou y colaboradores (2014) han propuesto dos modelos para el comportamiento de un ecosistema posterior a una entrada de nutrientes (Figura 1.2). En el primer escenario, posterior a

la entrada de nutrientes en un ambiente fluido o no estructurado, se espera que la composición estocástica de la comunidad se incremente por diversos factores (Figura 1.2A). Primero, los nutrientes pueden ser utilizados por diversos microorganismos para estimular su crecimiento. Este crecimiento puede estimular los procesos estocásticos de muerte, colonización y extinción en una población bacteriana. Esta adición de nutrientes puede así mismo reducir la selección de nicho al reducir la competencia por los recursos. Finalmente, posterior al agotamiento de los nutrientes los procesos determinísticos (i.e. condiciones ambientales, control local de la composición de la comunidad o interacciones entre especies como competencia y depredación) van a jugar un papel relevante, esto debido a que una proporción de la población original va a ser reemplazada por otras especies. En la fase tardía de esta sucesión, debido a los procesos determinísticos, las comunidades finales pueden ser iguales, muy similares, o significativamente diferentes de las comunidades originales (Zhou et al., 2014). Por otro lado, en el segundo escenario, en un ambiente estructurado o no fluido, después del enriquecimiento de nutrientes, la estocasticidad de igual manera se verá incrementada, sin embargo posterior al agotamiento de nutrientes, dicha estocasticidad se mantendrá elevada (Figura 1.2B). Esta diferencia se debe a la reducida capacidad de dispersión de un ambiente estructurado. Al igual que en el primer escenario, la comunidad se verá afectada con lo que habrá un intercambio de especies representantes, sin embargo, a un nivel local las comunidades no convergerán nuevamente a su composición original.

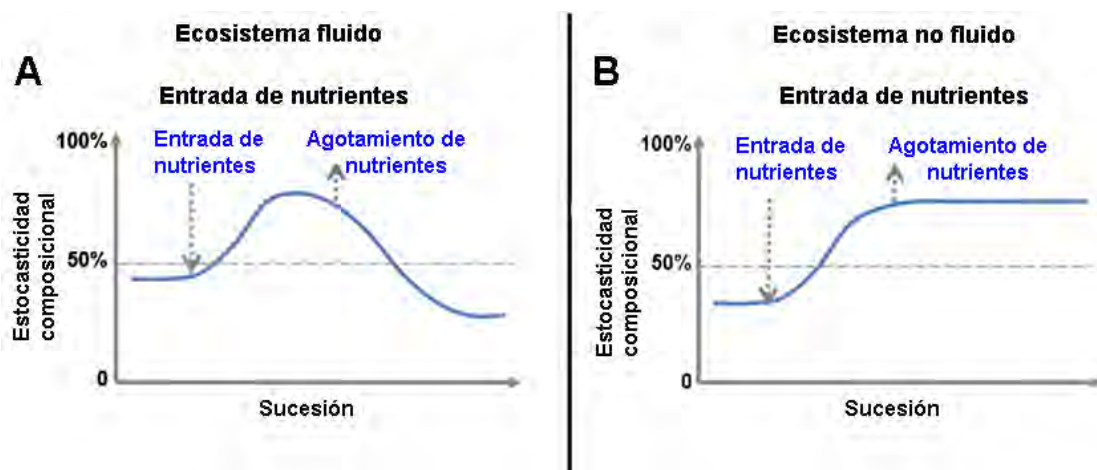


Figura 1.2. Modelo de la relación entre estocasticidad composicional (variación en la composición de especies de la comunidad debido a procesos estocásticos) y las perturbaciones ambientales. (A) Sistema fluido con entrada de nutrientes. (B) Sistema no fluido con entrada de nutrientes. (Modificada de Zhou et al., 2014).

1.4 Interacciones microbianas.

La competencia y cooperación son dos de los más importantes procesos ecológicos, los cuales frecuentemente se encuentran mediados por la disponibilidad de recursos. La competencia basada en recursos se caracteriza por que dos o más especies consumen el mismo recurso, lo cual tiene como resultado una potencial inhibición en el crecimiento de las especies involucradas. Por otro lado, la cooperación basada en recursos promueve el crecimiento y la persistencia de los organismos involucrados mediante el consumo diferencial de productos metabólicos derivado del consumo de dichos recursos. La cooperación basada en recursos puede a su vez clasificarse en dos tipos, una cascada de interacciones o una cooperación recíproca. La cascada de interacciones, como su nombre lo indica, involucra el consumo unidireccional de recursos, donde una especie consume los recursos metabólicos de otra especie. La cooperación recíproca en contraste con la cascada de interacciones, involucra el consumo de productos metabólicos por todas aquellas especies involucradas en la interacción (Freilich et al., 2011; Momeni et al., 2013; Grosskopf and Soyer, 2014). En aquellas interacciones por cooperación recíproca, la estructura espacial limita el potencial de aparición y dispersión de los denominados *cheaters*, individuos no cooperativos que sin embargo se ven beneficiados por el resto de la comunidad, por lo tanto ha sido propuesto como un elemento esencial para una coexistencia estable (Momeni et al., 2013). En contraparte, en las interacciones no recíprocas, el acceso a los recursos es un factor crítico, por lo que el restringir el flujo de los recursos no va a contribuir en la estabilidad de la coexistencia en los modelos de interacciones (Momeni et al., 2013).

Por otra parte vivir en un sedimento o suelo (ambiente estructurado) contrasta con vivir en el agua (ambiente no estructurado), ya que la coexistencia microbiana puede ser promovida y mantenida por cambios tanto en la estructura física como por la disponibilidad de nutrientes (Rainey et al., 2000). Debido a la naturaleza de esta estructura física, se puede provocar un agotamiento local de nutrientes que afectará el crecimiento de los competidores; sin embargo estas condiciones pueden dar origen a una variedad de nuevos nichos que serán colonizados por nuevos fenotipos al abrirse esta nueva oportunidad ecológica (Rainey and Travisano, 1998). Para que una comunidad pueda persistir a lo largo del tiempo, las funciones biológicas asociadas con las interacciones deben proporcionar un beneficio mayor que sus costos, por lo tanto, al evaluar

el efecto de las interacciones ecológicas y la estructura espacial, es necesario considerar tanto los costos como los beneficios de los fenotipos que producen antibióticos y de aquellos que los resisten o escapan; así como son los costos y los beneficios de aquellos que establecen relaciones de cooperación.

El por qué un organismo proporciona un beneficio a otros individuos a costa propia ha sido una pregunta recurrente en los estudios de mutualismo (Hamilton, 1963; Hamilton, 1964; Smith and Szathmary, 1995; Frank, 1998; West et al., 2006; West et al., 2007), pregunta que intriga aún más en aquellas interacciones de cooperación entre individuos de diferentes especies dentro de una comunidad. Se ha propuesto que un factor de gran relevancia para mantener una relación de mutualismo, es el grado en el que un individuo puede mantener el control de la adecuación de su socio (Edward et al., 2006). Cuando en una relación ambos socios mantienen el control y pueden activamente elegir el cooperar o no hacerlo, este proceso se asemeja más a un mercado humano, donde el intercambio juega un papel más importante que la fuerza (Werner et al., 2014). Para poder considerar un mercado biológico, se deben de cumplir una serie de condiciones: (i) intercambio de bienes y servicios entre individuos; (ii) deben de existir al menos dos distintas clases de negociantes; (iii) individuos de al menos una clase negociante debe tener la capacidad de cambiar de socio; (iv) deben existir diferencias entre los precios de los bienes, para que pueda darse así una competencia de precios; finalmente, debe ocurrir (v) una variación en la oferta y demanda de los bienes, que tendrá como consecuencia, una fluctuación en los precios (Werner et al., 2014). Los llamados bienes públicos que se “negocian” en este mercado son compuestos producidos por un individuo que pueden ser utilizados tanto por él mismo, como por sus vecinos. Existe una gran variedad de bienes públicos que son producidos y liberados por bacterias (Tabla 1.2), sin embargo, como se mencionó anteriormente, la producción de estos bienes es metabólicamente costosa para el individuo que la produce pero proporciona un beneficio a la comunidad vecina, misma que también le puede dar numerosos beneficios al donador del bien común.

Tabla 1.2. Bienes públicos (Adaptada de West et al., 2007)

Bienes públicos	Función
Sideróforos	Búsqueda de moléculas de hierro (West and Buckling, 2003)
Invertasas	Enzima para la digestión de sacarosa (Greig and Travisano, 2004)
β -lactamasa	Inactiva y otorga resistencia a antibióticos (Ciofu et al., 2000)
Biosufractantes	Matrices extracelulares que facilitan el movimiento sobre superficies, i.e. Rhamnolípidos (Daniels et al., 2004)
Exopolisacáridos	Proporcionan una estructura para crecimiento, y la habilidad para colonizar diferentes hábitats (Rainey and Rainey, 2003)
Metabolitos secundarios tóxicos y líticos	Matar y degradar a los organismos presa
Moléculas de <i>quorum-sensing</i>	Señalización célula-célula (Williams et al., 2007), biosufractantes (Daniels et al., 2006), quelación de hierro (Diggle et al., 2007)
Proteasas	Proteínas de digestión extracelular (Hase and Finkelstein 1993)
DNA extracelular	Componente estructural de <i>biofilms</i> (Spoering and Gilmore 2006)
Antibióticos	Eliminar la competencia
Vesículas de membrana	Componente de <i>biofilms</i> (Schooling and Beveridge 2006), transporte de señales célula-célula (Mashburn and Whiteley, 2005)
Rhamnolípidos	Mecanismo de defensa contra protozoarios (Cosson et al., 2002),
Repelentes microbianos	Repele a los competidores (Burgess et al., 2003)
Recursos proporcionados por simbioses a sus hospederos, tales como fijación de nitrógeno	Auxiliares en el crecimiento del hospedero (Kiers et al., 2003)

1.4.1 Competencia – Antibiosis.

Como se ha referido anteriormente, la interferencia competitiva ocurre cuando dos individuos interactúan directamente para inhibir el consumo de los recursos por parte del otro. Una de las formas más distribuidas de este tipo de interferencia competitiva es la producción de antibióticos o bacteriocinas.

Las bacteriocinas son el grupo más abundante de compuestos antimicrobianos, y pueden ser encontradas en la gran mayoría de linajes bacterianos (Riley and Gordon, 1999; Riley and Wertz, 2002). La diferencia principal entre bacteriocinas y un antibiótico reside en el espectro de acción, pues las bacteriocinas presentan un rango menor de acción y son tóxicas sólo para bacterias relativamente cercanas a la cepa productora (Riley and Wertz, 2002). Entre los mecanismos de acción de este grupo de compuestos se encuentran la inhibición enzimática, actividad de nucleasa y la formación de poros en la membrana (Riley and Wertz, 2002). Las bacteriocinas son producidas generalmente durante condiciones de estrés, y tienen como resultado la eliminación de aquellas células vecinas que no presentan resistencia o inmunidad hacia estas toxinas (Riley and Gordon, 1999). El papel ecológico que se ha propuesto para las bacteriocinas es el de actuar como mecanismo que facilita la invasión de una cepa hacia una comunidad bacteriana establecida. Estas toxinas así mismo pueden jugar un papel defensivo y actuar en este caso como un mecanismo para inhibir la invasión hacia un nicho ya ocupado. El resultado de esta interacción de los microorganismos con las bacteriocinas es no solo frecuencia dependiente sino también ambiente dependiente (Riley and Wertz, 2002). Por ejemplo, en un ambiente no estructurado, una población pequeña de productores no puede invadir una población ya establecida de células sensibles. Esta imposibilidad en la invasión radica en que las células productoras deben pagar el costo de producción de la toxina, pero los beneficios generados al matar a las células sensibles, se distribuye aleatoriamente. Por el contrario, en un ambiente estructurado, las toxinas se difundirán en torno a la colonia de los organismos productores, matando a los vecinos sensibles. Los recursos disponibles por este medio serán utilizados por la colonia productora, por lo cual los productores pueden incrementar su frecuencia aún al iniciar en una baja proporción.

En este tipo de casos, donde se cuenta con una cepa productora de una toxina y su contraparte sensible, el resultado final será la exclusión de una de ellas dependiendo de sus frecuencias iniciales, sin embargo es posible incorporar a estos modelos un tercer elemento, que es la existencia de cepas resistentes pero no productoras de toxinas. Debido a este tercer elemento, las interacciones pareadas entre las cepas presentan una estructura no transitiva similar a la encontrada en el juego de Piedra, Papel y Tijeras (RPS); este modelo depende de dos dimensiones: crecimiento y antagonismo. En el modelo RPS, una cepa resistente (R) es inmune a la toxina correspondiente pero sin producirla. Debido a que la producción de la toxina involucra un costo metabólico, la cepa R será una mejor competidora por los recursos que la cepa productora (K). De igual manera, la cepa sensible (S) será mejor competidora que R al no pagar el costo propio de la resistencia. En lo que respecta a la interacción entre K y S, la interacción es una interferencia competitiva debido al efecto de la toxina (Tabla 1.3; Czarán et al., 2002; Riley and Wertz, 2002). A este modelo se le llama no transitivo ya que la que paga menor costo no gana en todas las circunstancias; tanto la producción de toxinas como de resistencias van a presentar un costo metabólico, este costo para el modelo RPS estaría ordenado de la siguiente manera: $S < R < K$.

Tabla 1.3. Modelo no transitivo de guerra química entre microbios.

Cepa	Gana contra	Pierde contra
Productora	Sensitiva	Resistente
Sensitiva	Resistente	Productora
Resistente	Productora	Sensitiva

A partir de la expresión de un gen, éste tendrá un costo asociado a su replicación, mantenimiento y expresión, su costo metabólico, el cual debe ser menor que la ventaja obtenida para proporcionarle una ventaja selectiva (Lynch and Marinov, 2015). Dicho costo puede ser estimado de manera experimental a partir de las tasas de crecimiento derivados de estudios en quimiostatos en medios definidos (Lynch and Marinov, 2015) o del análisis de microarreglos y

transcriptomas, tanto de comunidades microbianas como de cepas en diversas condiciones, tales como antes y después de un proceso de estrés (Händel et al., 2013; Kaleta et al. 2013). Dependiendo del costo metabólico asociado a una resistencia, es posible encontrar una alta diversidad de toxinas. Para aquellas resistencias con un alto costo metabólico, las cepas presentarán un rango de diferentes combinaciones de genes para la producción de toxinas. Caso contrario para las resistencias con un costo metabólico bajo, donde la comunidad se acercará a un estado de “híper inmunidad”, en donde la mayoría de las bacterias son inmunes a gran parte de las toxinas, pero sólo unas pocas son productoras (Czarán et al., 2002; Riley and Wetz, 2002).

1.4.2 Cooperación – *Biofilms*

El término *biofilm* o biopelícula se refiere a una comunidad bacteriana unida a una superficie, que está contenida dentro de una matriz de exopolisacáridos y que funciona como una comunidad fisiológicamente integrada (O’Toole et al., 2000). Los *biofilm* juegan un papel de gran relevancia, tanto benéfico como perjudicial, en los ámbitos clínicos, ambientales e industriales. Debido a la ubiquidad de este tipo de ensamblajes bacterianos y a su capacidad metabólica, parece ser que se encuentran involucrados en los ciclos biogeoquímicos de prácticamente todos los elementos debido a su capacidad para captar los nutrientes disueltos y utilizarlos para la generación de nueva biomasa, de ahí la importancia en su estudio. Hasta ahora se sabe que los *biofilm* pueden estar conformados por una o varias especies microbianas, y pueden pegarse tanto a superficies bióticas como abióticas, de hecho parece que la mayor parte de las superficies del planeta los contienen. En la naturaleza la mayor parte de los *biofilms* están conformados por más de una especie, sin embargo *biofilms* de una sola especie pueden ser encontrados sobre todo en el ámbito clínico donde generan problemas de salud serios al ser muchos de ellos resistentes a los tratamientos (Archibald and Gaynes, 1997). El proceso de desarrollo de un *biofilm* está conformado por las fases de iniciación, maduración, mantenimiento y disolución. La iniciación de la formación del *biofilm* comienza con la transición de la bacteria de un estilo de vida planctónico a uno estático, al adherirse a una superficie. Este cambio en el estilo de vida se ha encontrado que está guiado por cambios en las condiciones ambientales tales como la falta de nutrientes, cambios en la temperatura, pH, entre otros (Danhorn et al., 2004; Caiazza et al., 2007; Cai et al., 2013; Al-Beloshei et al., 2015). Se sabe que una vez que los

microorganismos se han establecido sobre una superficie, sufren una serie de adaptaciones para la vida dentro del *biofilm*. Hay dos propiedades principales que se han asociado a las bacterias unidas a superficie: un incremento en la síntesis de exopolisacáridos (EPS) y la resistencia a antibióticos. Los cambios asociados a la resistencia a antibióticos, se ha propuesto que están relacionados con cambios fenotípicos, tales como una menor tasa de crecimiento, la expresión de bombas de resistencia a múltiples drogas, la expresión o el incremento de enzimas degradadoras de antibióticos, así como la alteración en los blancos de los antibióticos (Anwar et al., 1992; Wu et al., 1995; O'Toole et al., 2000; Drenkard and Ausubel, 2002). Por su parte, el incremento en la producción de EPS, además de dar estructura al *biofilm* proporciona protección. Adicionalmente a la síntesis de EPS y resistencia a antibióticos, se ha reportado así mismo un incremento en la resistencia a luz UV, en las tasas de intercambio genético y en la producción de metabolitos secundarios (Goodman et al., 1994; Asco-Cabrera et al., 1995; Moller et al., 1998; Garret et al., 2008). Para la fase final en el ciclo de desarrollo del *biofilm*, la disolución o desprendimiento, a pesar de no estar estudiada tan a fondo, se han propuesto diversas categorías: erosión, desprendimiento, intervención humana, depredación y abrasión (Stewart, 1992). La erosión se refiere a la remoción de células individuales, o pequeños grupos de células, de la superficie del *biofilm* y es parte constante y normal de un biofilm. Sin embargo, el desprendimiento, involucra pérdidas grandes de biomasa en el *biofilm* y no siempre ocurre ya que puede deberse tanto a un estrés interno tal como cambios en el gradiente de oxígeno a nivel muy fino, o por estrés mecánico producido por movimiento súbito del líquido circundante al pasar a través del *biofilm* (O'Toole, 2000; Piciooreanu et al., 2001). Aunque en algunos casos, puede ser parte del ciclo natural de “envejecimiento” de la comunidad del biofilm, Boyd y Chakrabarty reportaron en *Pseudomonas aeruginosa* la importancia de la enzima alginato liasa en esta fase de desprendimiento; en este trabajo se mostró que la sobreexpresión de la enzima puede acelerar el desprendimiento de las células del *biofilm* (Boyd and Chakrabarty, 1994). A pesar de estos trabajos, poco se sabe en la función o vías regulatorias involucradas en la liberación de las bacterias del *biofilm*.

1.5 Mesocosmos y enriquecimiento del ambiente

Para poder estudiar a las interacciones microbianas en su ambiente se pueden hacer experimentos tanto *in situ* como *ex situ*, a estos experimentos se les llama mesocosmos ya que incluyen, a diferencia de la evolución experimental donde se trabaja con una sola clona de inicio, comunidades microbianas. Un ejemplo del uso experimental de estos mesocosmos son los experimentos con nutrientes. Debido a que se sabe que las abundancias y las proporciones de nitrógeno y fósforo en el ambiente tienen un papel importante en la composición de especies tanto a escalas macro, como microscópicas (Makino and Cotner, 2005; Jansson et al., 2006; Marini et al., 2007; Christofoli et al., 2010; Nelson and Carlson, 2011), experimentalmente se espera que los cambios en la estructura de las comunidades bacterianas puedan estar guiados por los efectos de estos nutrientes en las tasas de crecimiento (Smith, 1993). Sin embargo en la naturaleza se sabe que otros factores tales como los cambios estacionales, pueden de igual manera jugar un papel en dichos cambios (Peura et al., 2012; Rodríguez-Verdugo et al., 2012; Bevivino et al., 2014), por lo que los experimentos de mesocosmos buscan reducir variables.

Se han llevado a cabo diversos trabajos para analizar los efectos de la llegada de nutrientes a un ambiente acuático en la composición de la comunidad (Berman et al., 1994; Lebaron et al., 1999; Schäfer et al., 2001; Carlson et al., 2002; Makino and Cotner, 2005; Nelson and Carlson, 2011; Peura et al., 2012; Lee et al., 2015). Carbón, nitrógeno y fósforo son los nutrientes más comúnmente empleados para estudios de enriquecimiento en mesocosmos, debido a que las proporciones de estos nutrientes tienen una influencia directa sobre la biomasa y la tasa de crecimiento (Lebaron et al., 1999; Carlson et al., 2002; Makino and Cotner, 2005; Nelson and Carlson, 2011; Peura et al., 2012; Lee et al., 2015). Sin embargo, la respuesta observada en las comunidades bacterianas acuáticas al enriquecimiento con nutrientes no es uniforme, pues ésta se encuentra influenciada por las condiciones iniciales del ambiente. Un ejemplo de esto, es el trabajo de Peura y colaboradores (2012), quienes al analizar la respuesta a la adición de nutrientes en un lago boreal encontraron que las diferencias entre la composición de la comunidad bacteriana estaba explicada principalmente por las diferencias a la estacionalidad y no tanto por los nutrientes, observación que contrasta con otros trabajos en los cuales se vio una disminución en la heterogeneidad de la comunidad bacteriana como respuesta al enriquecimiento

de nutrientes (Schäfer et al., 2001; Carlson et al., 2002; Makino and Cotner, 2005; Nelson and Carlson, 2011).

1.6 Área de estudio

El proyecto desarrollado en esta tesis, se encuentra enfocado en el estudio de la respuesta a nutrientes de la comunidad bacteriana en el sistema acuático del oasis en Cuatro Ciénegas. Este humedal consistía hace menos de 150 años en 4 grandes lagunas, ahora, debido al desvío del agua por medio de canales que lo drenan para llevar su agua a parcelas de riego a casi 100 km de distancia fuera del valle, Cuatro Ciénegas ya no tiene a estos grandes humedales, pero contiene cientos de pozas, ríos, y manantiales. Minckley clasificó siete sistemas de flujo en el valle: Churince, Becerra/Garabatal, Río Mesquites, Río Puente Chiquito, Tío Cándido/Escobeda, Santa Tecla y Río Salado/Río Grande (Minckley, 1969). Las muestras de agua y sedimento analizadas en este trabajo, se tomaron del sistema de flujo Churince. El valle de Cuatro Ciénegas se encuentra localizado dentro del desierto Chihuahuense en el estado de Coahuila. Este valle, es uno de los pocos humedales en Norteamérica y ha sido reportado como una de las regiones con el mayor número de endemismos en Norteamérica (Stein et al., 2000). Se estima que poco más de 70 especies son endémicas, siendo de éstas 9 reptiles, 10 peces, 13 moluscos, 7 crustáceos, 4 escorpiones, 3 insectos y 26 plantas de diferentes familias (Desert Fishes Council Web, 2015). En el año de 1994 se decretó el establecimiento del Área de Protección de Flora y Fauna de Cuatro Ciénegas con una superficie de 84,347 hectáreas, además de ser también considerada ésta área como un sitio prioritario para la conservación (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), World Wildlife Fund (WWF), PRONATURA) (Souza et al., 2006).

1.6.1 Ubicación geográfica.

El valle de Cuatro Ciénegas está localizado en la zona central del estado de Coahuila (26° 59' N, 102° 04' W), México y cuenta con una extensión de aproximadamente 40 kilómetros de longitud de este a oeste, y 30 kilómetros de longitud de norte a sur (Figura 1.3). Este valle localizado a una altitud promedio de 740 metros sobre el nivel del mar se encuentra flanqueado

al norte por la Sierra de la Madera con una altitud de hasta 3,000 metros; al sur se encuentra localizada la Sierra de San Marcos con una altitud de 2,500 metros y al oeste por la Sierra de la Fragua con una altitud de hasta 1,800 metros (Minckley, 1969).

1.6.2 Clima.

El clima de la región de Cuatro Ciénegas es árido con una precipitación anual menor a los 200 mm (Müller, 1947) y una evapotranspiración mayor a los 2,000 mm/año (Johannesson et al., 2004). El período de lluvias se da principalmente entre los meses de Mayo y Octubre, con un ligero incremento en la precipitación en el mes de Diciembre. Las temperaturas en Cuatro Ciénegas oscilan de más de 44 °C en verano, a temperaturas bajo 0 °C en invierno cuando se da una acumulación de nieve en las montañas (Minckley, 1969).

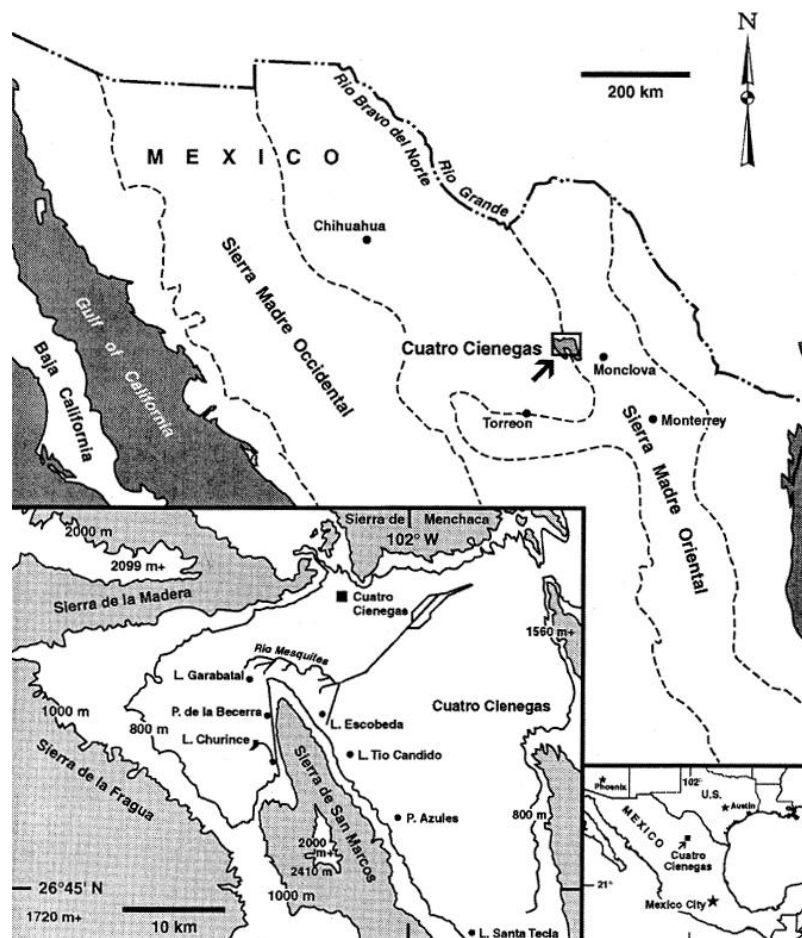


Figura 1.3. Mapa del área de Cuatro Ciénegas, Coahuila. (Modificado de Johannesson et al., 2004)

1.6.3 Hidrología.

El acuífero de Cuatro Ciénegas se encuentra dentro de la denominada región hidrológica Río Bravo-Conchos, cuenca Presa Falcón-Río Salado y Subcuenca Río Salado-Nadadores. En el valle, los sistemas acuáticos presentes van desde pozas efímeras a lagunas permanentes, ríos y manantiales. El valle tiene una densidad de entre 12 a 15 pozas por kilómetro cuadrado, concentrándose la mayoría de ellas en las cercanías de la Sierra de San Marcos. El río más importante dentro del valle es el denominado Río Mesquites, el cual presenta temperaturas que oscilan entre los 31 °C y 16.3 °C. En lo que respecta a los ambientes lénticos o semi lénticos, es decir, cuerpos cerrados de agua sin flujo o flujo reducido, se encuentran tanto los lagos y pozas permanentes alimentados mediante canales subterráneos, como las pozas temporales dependientes de la temporada de lluvia. Estos cuerpos de agua oscilan de varios centímetros de diámetro hasta aproximadamente 1 kilómetro de longitud, y de menos de 1 metro hasta más de 10 metros de profundidad (Minckley, 1969), sin embargo hoy en día debido a la sobre explotación de agua en esta región, muchos de estos cuerpos de agua se encuentran en peligro o han desaparecido, tal es el caso de Laguna Grande, uno de los mayores cuerpos de agua descritos por Minckley, el cuál para el año 2006 presentaba una notable reducción en su tamaño (Souza et al., 2007) y hacia el año 2012 estaba seco en su totalidad.

Las aguas de Cuatro Ciénegas se caracterizan por un pH cercano a la neutralidad (6.9-7.7) y una alcalinidad relativamente baja. A partir de un análisis de las aguas subterráneas, se sugiere que una fracción del agua subterránea del valle proviene mayormente de la precipitación sobre las montañas circundantes al valle, principalmente por las sierras de San Marcos y La Madera (Johannesson, et al., 2004) las cuales al infiltrarse entre las rocas adquieren una gran cantidad de minerales y son regresadas a la superficie al entrar en contacto con el calor del magma que se encuentra de manera mas superficial bajo la Sierra de San Marcos y Pinos (Wolaver and Diehl, 2011). Los resultados de un análisis de Carbono-14 indican que el flujo subterráneo en la región de Los Hundidos tiene un tiempo de residencia, desde que se infiltra el agua de lluvia hasta el momento de su captación, del orden de las decenas de miles de años, mientras que en el área de las pozas de Cuatro Ciénegas el tiempo de residencia es del orden de mil años (IMTA-SEMARNAT), ya que es un sistema más dinámico debido a la influencia

magmática sobre sus aguas subterráneas, la cual es predominante en el Churince (Wolaver et al., 2013).

Las pozas del valle presentan una gran variabilidad en temperatura, salinidad y condiciones químicas (Minckley, 1969). Las aguas son duras y contienen una gran cantidad de sales de calcio y magnesio. Estos cuerpos de agua presentan además, un bajo contenido de fósforo; esta falta de nutrientes no permite el desarrollo importante de algas, sin embargo se ha reportado una alta diversidad bacteriana, por lo que se ha sugerido que la base trófica del ecosistema está formado por bacterias (Souza et al., 2006; 2012).

1.6.4 Sistema Churince

El sistema Churince está compuesto por cuatro cuerpos de agua, la Poza Churince y Poza Bonita como manantiales, la Laguna Intermedia como lago intermedio y Laguna Grande como lago terminal o de desecación. Este sistema, al igual que el Río Mesquites, tiene su origen en el extremo oeste de la Sierra de San Marcos, sin embargo es un sistema aislado. Se ha propuesto la posibilidad de que ambos sistemas se encuentren conectados mediante conductos subterráneos, pero no hay evidencia de esto (Evans, 2005). La composición química entre la Poza Churince y la Laguna Intermedia presenta cambios poco notables. El flujo de agua entre estos dos cuerpos es principalmente superficial. Entre las diferencias químicas observadas están un decremento en la alcalinidad y en las concentraciones de hierro y nitrógeno, así como un incremento en pH y en las concentraciones de magnesio, sodio, azufre y sólidos totales disueltos (Tabla 1.4; Evans, 2005). Adyacente a la Laguna Intermedia, se encuentra una poza somera denominada Lagunita ($26^{\circ} 50'53.19''$ N, $102^{\circ} 8'29.98''$ W). El agua de esta poza es alta en conductividad y está dominada por Ca^{2+} , SO_4^{2-} y CO_3^{2-} . La poza Lagunita está sujeta a altos niveles de evaporación (Lee et al., 2015).

Debido a los efectos de entrada de nutrientes en los cuerpos de agua, se han observado cambios en la composición de las comunidades bacterianas, cambios que pueden tener un efecto en la totalidad de la comunidad acuática (Makino and Cotner, 2005). Por este motivo es de gran importancia entender cómo éstas perturbaciones en el ecosistema afectan la homeostasis de la

comunidad para de esta forma tener un mayor entendimiento no sólo de la estructura e interacciones dentro de la comunidad, si no también de los flujos de energía dentro de ésta.

Tabla 1.4. Química del Sistema Churince en Enero 2005. Las concentraciones se encuentran representadas en ppm. ND – No detectable. (Modificado de Evans, 2005).

	Poza Churince	Laguna Intermedia
Temperatura (°C)	25.5	13.6
pH	7.26	8.28
Conductividad (µS)	2447	4724
Sólidos Totales Disueltos (ppm)	1760	3712
Alcalinidad (HCO₃)	164.7	110.532
Na	151.43	163.79
Si	8.15	7.48
Mg	97.39	106.32
K	7.2	7.48
Ca	319.6	369.31
Sr	13.0449	14.0587
F	2.592	2.7565
Cl	133.55	112.25
Br	0.46	0.481
NO₃ - N	1.249	0.596
SO₄	1210	1402
Li	0.0907	0.0833
B	0.3308	0.2894
Fe	0.0038	ND

En esta tesis se planteó el entender cómo se ven modificadas tanto la estructura como las interacciones de una comunidad microbiana en respuesta a una perturbación en su ambiente, en este caso por una entrada de nutrientes. Así mismo se quiere entender qué efectos tienen estas perturbaciones a nivel genómico en miembros de ésta comunidad perturbada. Para contestar

éstas pregunta, en este trabajo se planteó lo siguiente: (i) analizar los cambios en la composición de la comunidad microbiana en respuesta a una entrada controlada de nutrientes; (ii) identificar posibles cambios en las interacciones tanto mutualistas como antagonistas dentro de la comunidad microbiana; y (iii) analizar a un nivel genómico aquellos cambios identificados entre representantes de la comunidad microbiana antes y después del periodo de enriquecimiento.

Capítulo 2. El enriquecimiento experimental con fósforo y nitrógeno reduce la diversidad y cambia las interacciones microbianas en un ambiente ultra-oligotrófico.

2.1 Resumen

El incremento de nutrientes en los cuerpos de agua, en particular nitrógeno (N) y fósforo (P) debido a la reciente expansión de la agricultura y otras actividades humanas está acelerando la degradación ambiental de estos cuerpos de agua, elevando el riesgo de eventos de eutrofización y reducción de la biodiversidad. Para evaluar los efectos ecológicos de la entrada de nutrientes en un ambiente oligotrófico y estequiométricamente desbalanceado, se llevó a cabo un experimento replicado de mesocosmos *in situ*. En este trabajo se analizaron los efectos de un enriquecimiento con N y P en las interacciones bacterianas inter específicas en un experimento realizado en el valle de Cuatro Ciénegas, México. Cuatro Ciénegas es un ecosistema desértico compuesto de diversos sistemas acuáticos con un alto número de especies microbianas endémicas. La abundancia de nutrientes esenciales en este valle presenta un alto desbalance estequiométrico (altas proporciones N:P), lo que sugiere que la diversidad de especies está mantenida principalmente por la competencia por los recursos.

En este estudio se analizó la formación de *biofilms* o biopelículas y la resistencia a antibióticos de 960 cepas de bacterias cultivables provenientes de dos hábitats, agua y sedimento, antes y después de un periodo de 3 semanas de fertilización. El hábitat del agua estuvo dominado por *Pseudomonas*, mientras que *Halomonas* dominó el sedimento. Una fuerte resistencia a antibióticos se encontró entre los aislados del tiempo cero en las comunidades bacterianas con bajos nutrientes, pero dicha resistencia disminuyó en las bacterias aisladas de los ambientes ricos en nutrientes, sugiriendo que en el ambiente original bajo en nutrientes, las interacciones de competencia no son muy importantes. En los aislados de agua se observó un incremento significativo en el porcentaje de bacterias formadoras de *biofilms* para todos los tratamientos enriquecidos con nutrientes.

Enrichment experiment changes microbial interactions in an ultra-oligotrophic environment

Gabriel Y. Ponce-Soto¹, Eneas Aguirre-von-Wobeser², Luis E. Eguiarte¹, James J. Elser³, Zarraz M.-P. Lee³ and Valeria Souza^{1*}

¹ Laboratorio de Ecología Molecular y Experimental, Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, México, ² Red de Estudios Moleculares Avanzados, Instituto de Ecología A.C., Xalapa, México, ³ School of Life Sciences, Arizona State University, Tempe, AZ, USA

OPEN ACCESS

Edited by:

Michael Travisano,
University of Minnesota, USA

Reviewed by:

Scott Clingenpeel,
Department of Energy Joint Genome
Institute, USA
Jillian Petersen,
Max Planck Institute for Marine
Microbiology, Germany

*Correspondence:

Valeria Souza,
Laboratorio de Ecología Molecular y
Experimental, Departamento de
Ecología Evolutiva, Instituto de
Ecología, Universidad Nacional
Autónoma de México, Circuito Exterior
S/N, AP 70-275, Coyoacán
DF 04510, México
souza@unam.mx

Specialty section:

This article was submitted to *Microbial Symbioses*, a section of the journal *Frontiers in Microbiology*

Received: 15 October 2014

Accepted: 13 March 2015

Published: 01 April 2015

Citation:

Ponce-Soto GY, Aguirre-von-Wobeser E, Eguiarte LE, Elser JJ, Lee ZM-P and Souza V (2015) Enrichment experiment changes microbial interactions in an ultra-oligotrophic environment. *Front. Microbiol.* 6:246. doi: 10.3389/fmicb.2015.00246

The increase of nutrients in water bodies, in particular nitrogen (N) and phosphorus (P) due to the recent expansion of agricultural and other human activities is accelerating environmental degradation of these water bodies, elevating the risk of eutrophication and reducing biodiversity. To evaluate the ecological effects of the influx of nutrients in an oligotrophic and stoichiometrically imbalanced environment, we performed a replicated *in situ* mesocosm experiment. We analyzed the effects of a N- and P-enrichment on the bacterial interspecific interactions in an experiment conducted in the Cuatro Ciénegas Basin (CCB) in Mexico. This is a desert ecosystem comprised of several aquatic systems with a large number of microbial endemic species. The abundance of key nutrients in this basin exhibits strong stoichiometric imbalance (high N:P ratios), suggesting that species diversity is maintained mostly by competition for resources. We focused on the biofilm formation and antibiotic resistance of 960 strains of cultivated bacteria in two habitats, water and sediment, before and after 3 weeks of fertilization. The water habitat was dominated by *Pseudomonas*, while *Halomonas* dominated the sediment. Strong antibiotic resistance was found among the isolates at time zero in the nutrient-poor bacterial communities, but resistance declined in the bacteria isolated in the nutrient-rich environments, suggesting that in the nutrient-poor original environment, negative inter-specific interactions were important, while in the nutrient-rich environments, competitive interactions are not so important. In water, a significant increase in the percentage of biofilm-forming strains was observed for all treatments involving nutrient addition.

Keywords: mesocosm, nutrient enrichment, Cuatro Ciénegas Basin, proteobacteria interactions, community structure

Introduction

A central goal of ecology is the understanding of the driving principles underpinning biodiversity (Gaston, 2000). Several lines of research have tried to explain the differences in diversity among local communities, focusing on approaches ranging from network interactions in food webs to random assemblages resulting from the dispersion capacity of organisms (Hutchinson, 1959; Dykhuizen, 1998; Kassen et al., 2000; Bennie et al., 2006; Marini et al., 2007). These

theories, as well as other more complex explanations of biodiversity (such as chaotic interactions between competing strains; Huisman and Weissing, 1999) are partially successful, depending on the system studied and are frequently complementary. The patterns of biodiversity are determined by the combined impacts of interactions of several biotic and abiotic environmental factors, and cost-benefit strategies followed by each species can change according to the complexity of the community and its nutrient availability (Marini et al., 2007; Werner et al., 2014).

For instance, it is known that the abundances and proportions of nitrogen and phosphorus in the environment have a major influence in the composition of species at macro and microscopic scales (Makino and Cotner, 2005; Jansson et al., 2006; Marini et al., 2007; Christofoli et al., 2010; Nelson and Carlson, 2011). Classic trade-off competition theory places resource availability at the center of the processes that influence community structure (Tilman et al., 1981; Smith, 1993; Brauer et al., 2012). MacArthur and Wilson (1967) coined the terms “r-selection” and “K-selection.” This theory takes into account biotic and abiotic factors such as climate, mortality, survivorship, population size, intra and interspecific competition, relative abundance and length of life. Under this theory, r-strategists are adapted to abundant nutrients, which are rapidly exploited. On the other hand, K-strategists are adapted to a long-term survival on limited resources (Pianka, 1970; Fuchs et al., 2000; Singer et al., 2011). Experimental evidence from different microcosm experiments shows that nitrogen and phosphorus enrichments result in significant changes in community structure in terms of uniformity and species richness (Schäfer et al., 2001; Nelson and Carlson, 2011).

The changes in community structure are probably driven mainly by the effects of nutrients on the growth rates of individual strains (Smith, 1993), but other factors could also play a role such as seasonal changes (Rodríguez-Verdugo et al., 2012; Bevivino et al., 2014), as well as changes in mutualistic interactions due to fluctuations in the supply and demand of “public goods” by cause of the entrance of nutrients to the ecosystem (Morris et al., 2012; Sachs and Hollowell, 2012; Werner et al., 2014).

The release of chemical compounds into the environment, which are toxic or inhibitory to the competitors, is one of the commonly observed antagonistic interactions (Riley and Gordon, 1999; Lenski and Riley, 2002; Riley and Wertz, 2002; Kirkup and Riley, 2004; Hibbing et al., 2010; Kohanski et al., 2010; Majeed et al., 2011, 2013; Pérez-Gutiérrez et al., 2013; Aguirre-von-Wobeser et al., 2014). These secretions highly influence community structure and maintain cohesion of bacterial populations by leading to the extinction of sensitive strains in liquid media, but to coexistence in a structured media (Validov et al., 2005; Greig and Travisano, 2008; Rypien et al., 2010; Cordero et al., 2012). In the non-transitive model rock-paper-scissors (RPS), one antagonist, one sensitive and one resistant strain coexist in structured media (Czarán et al., 2002; Kerr et al., 2002; Kirkup and Riley, 2004). In a natural environment, this non-transitive relation may occur if toxic production is costly, both sensitive and resistant strains exist and costs associated with resistance are less than those of toxin production. However, the relative magnitude of each of these features is critical for coexistence (Kerr et al., 2002).

The effects of nutrient addition in microbial community structure can also depend on the extant biodiversity prior to the increase of nutrient availability, as shown by an experiment performed on the bacterial community of Owasso Lake (Minnesota, USA), which has been reported as one of the least diverse bacterial communities known (Makino and Cotner, 2005). When this lake was enriched with nitrogen, phosphorus and carbon, the community showed a response that would be expected from a single strain, rather than from a community (Jürgens and Güde, 1990), suggesting that if bacterial diversity in a given environment is low, this diversity will remain low, because of its low potential to respond at a community level to changes in its environment. In contrast, in more diverse environments, nutrient enrichment usually homogenizes the composition of the community assemblage (Donohue et al., 2009).

The Cuatro Ciénegas Basin (CCB) located at the Chihuahuan desert of north central Mexico is a good system to study the effects of the addition of nutrients on bacterial communities. CCB harbors a number of highly oligotrophic aquatic ecosystems that have very low available phosphorus levels, as well as a stoichiometric disequilibrium with nitrogen and thus are strongly limited by phosphorus (Elser et al., 2005, 2006). We have suggested that the high microbial species diversity in CCB is strongly shaped by the stress of low nutrient supplies and the impacts of interspecific competition (Souza et al., 2008). Previous studies indicate that CCB bacterial communities display strategies to cope with this lack of nutrients, including a high representation of genes involved in phosphorus assimilation (e.g., *pho* and *pst* in Mesquites river; Breitbart et al., 2009) and the presence of a large number of genes related to the production and resistance to antibiotics (in Pozas Rojas; Bonilla-Rosso et al., 2012; Peimbert et al., 2012).

Pseudomonas and other cultivable proteobacteria are abundant in different aquatic systems in CCB, including the Churince system (Escalante et al., 2009) and in the Los Hundidos region (Bonilla-Rosso et al., 2012; Peimbert et al., 2012). In a different study in the flow system Churince, it was found that the *Pseudomonas* genus exhibited a seasonal variation across summer and winter (Rodríguez-Verdugo et al., 2012).

In this paper, we analyze the seasonal response of bacteria cultivable in *Pseudomonas* Isolation Agar (PIA; Difco¹, Detroit, MI) in response to the nutrient amendment. Our study seeks to understand the effects of nitrogen and phosphorus fertilization on the interaction potential of the cultivable gamma-proteobacteria community in two different habitats, water and sediment, by determining how nutrient enrichment affected various features related to microbial species interactions, such as the tendency to form biofilms and resistance to antibiotic compounds. We are clearly aware of the limitations of culture media in order to capture the diversity of a site, as we have described elsewhere (see Souza et al., 2006, 2012), nevertheless, only in culture we can study the physiology and sociology of particular strains, which is the particular aim of this study. Our findings shed light on how the supplies of key nutrients, such as N

¹Difco™ and BBL™ Manual, 2nd Edition. *Pseudomonas* Isolation Agar.

and P modulate community structure, as well as the nature and intensity of interspecific interactions.

Materials and Methods

Study Site

The nutrient enrichment experiment was conducted *in situ* in a small shallow evaporitic pond, Lagunita (26.84810° N, 102.14160° W), lateral to the main Churince flow system. The Churince flow system, located at the western region of CCB is dominated by gypsum sediments and has a strong longitudinal gradient of salinity, temperature, pH and dissolved oxygen (Cerritos et al., 2011). Lagunita is characterized by low phosphorus concentrations (PO_4 as low as 0.1 μM and often below detection) (Elser et al., 2005), but relatively high concentrations of inorganic N and thus high N:P ratios (>200:1 for total nutrients; Lee et al., *in press*). Lagunita is subjected to strong evaporation, the greatest water depth at the beginning of the experiment was 32 cm and decreased to as low as 12 cm by the end of the experiment.

Experimental Design of Mesocosm

The mesocosm experiment was conducted from May to June 2011. Each mesocosm consisted of a round clear plastic tube with a diameter of 40 cm. The tube had a depth of 20 cm into the sediment and approximately 20 cm above the water surface. The mesocosms were arranged in a randomized complete block with a total of 5 blocks, separated about 2–4 m from each other. Each block consisted of four treatments. A non enriched control treatment, a phosphorus enrichment treatment (P), amended with KH_2PO_4 and maintained at 2 day intervals at a final concentration of 1 μM ; a nitrogen and phosphorus enrichment (NP), amended as above with KH_2PO_4 to 1 μM but also with NH_4NO_3 , to achieve N:P of 16:1; and a nitrogen and phosphorus enrichment with extra nitrogen (NNP), amended as above with 1 μM KH_2PO_4 but also with NH_4NO_3 at an N:P ratio = 75:1.

Methodology for Chemical Analyses

For the chemical analyses, water was collected in acid-washed 2 L cubitainers. Water samples were filtered through pre-combusted (24 h at 450°C) GF/F filters (Whatman, Piscataway, NJ) for seston elementary analysis and stored at -20°C . To measure total dissolved nutrients, water samples were filtered through 0.2 μm polyethersulfone membrane filters. Samples for dissolved organic carbon (DOC), and total dissolved nitrogen (TDN) were acidified with 12 N HCL to $\text{pH} < 2$ and stored in the dark at room temperature, while the remaining filtrate was frozen for total dissolved phosphorus (TDP) and soluble reactive phosphorus (SRP) analyses.

GF/F with seston were thawed, dried at 60°C and packed into tin disks (Elemental Microanalysis, U.K.) for N analyses with a Perkin Elmer™ PE 2400 CHN Analyzer at the Arizona State University Goldwater Environmental Laboratory (ASU GEL). Another set of dried GF/F filters from the same water samples was used in order to estimate seston P content. These filters were digested in persulfate followed by a colorimetric analysis to determine PO_4^{3-} (APHA, 2005). TDP concentrations were determined using the colorimetric assay after persulfate digestion

as previously described; SRP was measured without the persulfate digestion. DOC and TDN were analyzed using the Shimadzu TOC-VC/TN analyzer at the ASU GEL. Total Phosphorus (TP) concentration was calculated as the sum of the seston and total dissolved pools.

Sample Collection and Processing

Water and sediment samples were taken for each one of the four treatments for each experimental block (20 samples total). Initial samples were obtained from surface water and top of sediment prior to the application of the treatments (T0; 14 May 2011) and after 21 days of enrichment (4 June 2011) using sterile BD Falcon vials (BD Biosciences, San Jose, CA). Cultivable bacteria were obtained by plating 100 μl of each water sample or 100 μl of a 1:10 sediment dilution, prepared with 0.9% NaCl solution. Strains were isolated from water and sediment using PIA medium. Strains were incubated on agar plates at room temperature for 2 days at the field, and then were kept at 4°C until isolation in the laboratory. Individual colonies were transferred to new PIA plates and then were grown at 30°C. A total of 960 isolates were obtained.

DNA Extraction and PCR Amplification

Phylogenetic identification of the strains was performed using the 16S rRNA gene. For the isolates, DNA extraction was very complicated, and thus several methods were tested (Chen and Kuo, 1993; Aljanabi and Martinez, 1997; Reischl et al., 2000, and DNeasy Blood and Tissue kits, Qiagen, Hilden, Germany). Ultimately, the DNeasy Blood and Tissue kit was the method used, and from the 960 isolates, good quality DNA was obtained for 152 strains. 16S rRNA genes were amplified using universal primers 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') and 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') (Lane, 1991) and high fidelity *Phusion* hot start DNA polymerase (Finnzymes, Espoo, Finland). All reactions were carried out in a Techne TC-3000 thermal cycler (Barloworld Scientific, Staffordshire, UK) with the following program: 94°C for 5 min, followed by 30 cycles consisting of 94°C for 1 min, 50°C for 30 s, 72°C for 1 min and 72°C for 5 min. Polymerase chain reaction (PCR) amplification products were electrophoresed on 1% agarose gels. Sanger sequencing was performed at the University of Washington High Throughput Genomics Center. The sequences have been uploaded to GenBank with accession numbers (KF317734-KF317770, KM352505-KM352636).

Phylogenetic Analysis

The 16S rRNA sequences were aligned with CLUSTALW (Larkin et al., 2007) and MUSCLE (Edgar, 2004), and the alignments were manually revised. For the reconstruction of the phylogenetic tree, a maximum likelihood analysis was done with PhyML version 3.0 (Guindon et al., 2010) with the TrN+G model. The substitution model was calculated with jModelTest 2.1.3 (Darriba et al., 2012). The degree of statistical support for the branches was determined with 1000 bootstrap replicates. Genera level identification of the strains was made using the classifier tool (Wang et al., 2007) from the Ribosomal Database Project (RDP) Release 10, update 30 (Cole et al., 2009; **Table 1**). We performed a local

TABLE 1 | Summary of nutrient-induced shifts in relative abundance of dominant bacterial lineages.

Class	Consensus clade	Total Count	T0		Control		NP		NNP		P	
			H ₂ O	Sed	H ₂ O	Sed	H ₂ O	Sed	H ₂ O	Sed	H ₂ O	Sed
α-Proteobacteria	<i>Rhizobium</i>	8	0	6	0	0	0	0	0	0	0	2
γ-Proteobacteria	<i>Stenotrophomonas</i>	9	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0
γ-Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	54	20	0	9	0	0	4	0	21	0	0
γ-Proteobacteria	<i>Shewanella</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
γ-Proteobacteria	<i>Aeromonas</i>	20	5	0	0	3	10	0	2	0	0	0
γ-Proteobacteria	<i>Citrobacter</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
γ-Proteobacteria	<i>Rheinheimera</i>	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
γ-Proteobacteria	<i>Halomonas</i>	47	7	0	0	0	0	18	0	22	0	0
Actinobacteria	<i>Kocuria</i>	4	0	0	0	0	0	1	0	0	0	3
Actinobacteria	<i>Brachybacterium</i>	3	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0

BLAST search (Altschul et al., 1990) to find the nearest neighbors using the 16S ribosomal RNA. These analyses were performed with 700 bp from the 5' end of all the sequences.

Antibiotic Resistance Assays

The 960 isolates were grown on LB plates supplemented with the following antibiotic concentrations: Carbenicillin 500 µg/ml, Kanamycin, 200 µg/ml, Tetracycline, 150 µg/ml, Streptomycin, 200 µg/ml and Gentamicin 150 µg/ml. Isolates were labeled as resistant to an antibiotic if we observed bacterial growth; otherwise, they were considered as nonresistant.

For statistical inference, the antibiotics data were organized as contingency tables, and Barnard's exact test (Barnard, 1945) was performed. Independent tests were conducted for each treatment against the initial time, for water and sediment data. Since several treatments were compared to the initial condition, a Bonferroni correction was applied for multiple tests.

Biofilm Formation Assay

A microtiter dish assay was performed for the same 960 isolates as described by O'Toole (2011) with the following modifications. The overnight culture was grown in LB medium. The microtiter plates were incubated for 18 h at 30°C. Each strain was analyzed by triplicate and we used the strains *P. aeruginosa* PAO1 and *E. coli* MC4100 as positive and negative controls, respectively. After incubation, plates were gently washed with water, and subsequently 125 µl of a 0.1% solution of crystal violet in water was added to each well. The plates were incubated at room temperature for 15 min and then washed with water. 125 µl of 30% acetic acid in water was added to each well to solubilize the crystal violet and it was incubated for 15 min. The volume was transferred to a new flat-bottomed microtiter dish. Absorbance was read with a Synergy HT plate reader (BioTek, Winooski, VT) at 550 nm.

To determine the statistical significance of differences in biofilm formation between the different treatments and the initial condition, we organized the data as contingency tables including the number of positive and negative strains for biofilm formation for the initial time and each treatment, and applied Barnard's exact tests. To correct multiple testing, a Bonferroni correction was applied.

Results

To characterize the changes in diversity of cultivated Proteobacteria related to pseudomonads associated with nutrient enrichment in a water system, we performed an *in situ* mesocosm experiment with three experimental manipulations, adding phosphate (P), phosphate and nitrogen (NP), and phosphate and excess nitrogen (NNP), as well as an un-enriched control. The experiment is part of a bigger project that is described in detail elsewhere (Lee et al., in press). Cultures were obtained from surface water and sediment in two sampling events, prior to the experimental manipulations, and after 21 days, and a total of 960 isolates were analyzed for interaction phenotypes such as biofilm formation, and antibiotic resistance. A subsample of the isolates was characterized by 16S rRNA sequence.

Nutrient Concentrations

Nutrient conditions during the experiment were characterized by low concentrations of P but relatively high concentrations of N that increased in NP and NNP treatments. Despite nutrient enrichment, N:P ratios remained quite stoichiometrically imbalanced. Except for the NNP treatment, total dissolved phosphorus and soluble reactive phosphorus were significantly different respect to control. Total phosphorus, total dissolved phosphorus and the N:P ratio were significantly different in all enriched treatments. Total dissolved nitrogen was significantly different only in the nitrogen amended treatments (Table 2). Details of dynamics and fate of N and P in the mesocosms are given elsewhere (Lee et al., in press).

Phylogenetic Diversity and Responses to Treatments

The phylogenetic relationships of partial 16S rRNA gene sequences (700 bases) of the 152 strains were determined by queries against the Ribosomal Database Project (Cole et al., 2009) using SeqMatch and Classifier (Wang et al., 2007). The phylogenetic results showed that the strain collection was dominated by Proteobacteria (145 isolates/95.4%), with members from the gamma- (137/90.1%) and alpha- (8/5.3%) subdivisions (Table 1), consistent with the use of the PIA medium for isolation. We

TABLE 2 | Nutrient concentrations.

Treatment	DOC	TDN	Seston P	TP	TDP	SRP	N:P
T0	2177 ± 51.84	130 ± 5.98	1.21 ± 0.08	1.79 ± 0.20	0.58 ± 0.17	0.06 ± 0.02	47.26 ± 1.95
Control	2799.17 ± 212.81	182.77 ± 9.51	1.09 ± 0.11	2.47 ± 0.24	1.39 ± 0.25	0.31 ± 0.09	49.12 ± 6.04
NP	3005 ± 227.63	202.48 ± 12.11*	3.03 ± 0.26*	4.17 ± 0.62*	1.15 ± 0.40	0.27 ± 0.12	36.39 ± 6.34*
NNP	3198.81 ± 144.87*	226.32 ± 25.63*	3.29 ± 0.68*	4.15 ± 0.71*	0.86 ± 0.25*	0.19 ± 0.08*	36.25 ± 6.20*
P	3010.65 ± 227.30	192.05 ± 17.88	2.71 ± 0.33*	3.95 ± 0.59*	1.24 ± 0.28	0.33 ± 0.10	28.26 ± 3.75*

Dissolved organic carbon (DOC), total dissolved nitrogen (TDN), total phosphorus (TP), total dissolved phosphorus (TDP) and soluble reactive phosphorus (SRP) concentrations in the pond's water and in each treatment after the nutrient enrichment. All values are in $\mu\text{M L}^{-1}$ with the exception of N:P which represents the elemental stoichiometry of seston. Each value represents the average and one standard deviation. The "*" symbol denotes significant change from the control.

also found several Actinobacteria (7/4.6%). As described by King et al. (1954), this medium includes Irgasan[®], a broad spectrum antimicrobial substance that is not active against *Pseudomonas* spp. The medium also enhances the formation of pigments by *Pseudomonas* by adding magnesium chloride and potassium sulfate. *Pseudomonas* species were found in all un-enriched water cultures as well as in almost all enriched samples, with the exception of the NP treatment. *Pseudomonas* was the most abundant genus for the water isolates and overall for all samples (35.5% of the isolates). *Halomonas* was the most abundant genus among the sediment strains, representing 30.9% of the isolates.

Using the aligned sequences, a maximum likelihood tree was constructed (Figure 1). For any given treatment, groups of closely related, almost identical strains dominated the samples, even though they were obtained from different replicate mesocosms. Previous to the experimental manipulations, only gamma-proteobacteria were retrieved from the water samples, which were dominated by *Pseudomonas*. Other genera were present, including *Aeromonas*, *Shewanella*, *Citrobacter*, *Rheinheimera*, and *Halomonas*. With the addition of phosphorus (P treatment), many closely related *Pseudomonas* were retrieved. In the NP treatment, all the obtained isolates belonged to the genus *Aeromonas*. For the high N:P treatment (NNP), a group of *Pseudomonas* became abundant and two *Aeromonas* isolates were obtained.

Phylogenetic differences were observed between the abundant strains obtained from the different habitats (water vs. sediment) but also between the strains corresponding to the different treatments. At the beginning of the experiment, the sediment samples were dominated by another gamma-proteobacterium, *Stenotrophomonas*, as well as an alpha-proteobacterium, *Rhizobium*. Some Actinobacteria were also isolated from these initial samples, belonging to the genus *Brachybacterium*. With P enrichment, *Rhizobium* was also found, as well as an Actinobacterium, from the genus, *Kocuria*. However, a larger change in the sampled community was found in all treatments including nitrogen along with P (NP and NNP), where *Halomonas* (gamma-proteobacteria) was largely dominant.

Antibiotic Resistance

We analyzed the prevalence of antibiotic resistances among the 960 isolates. The antibiotics analyzed were Carbenicillin, Kanamycin, Tetracycline, Streptomycin and Gentamicin

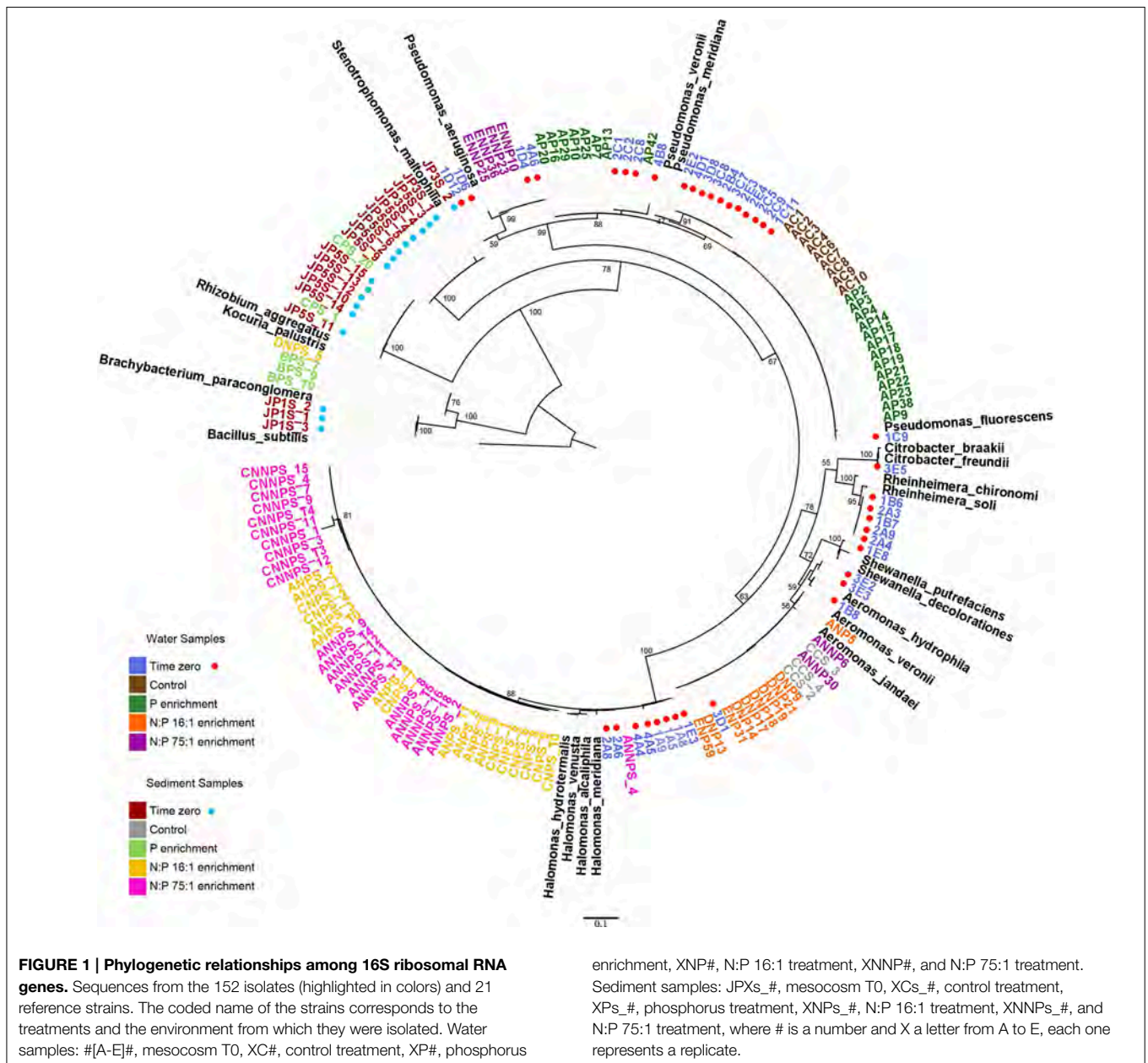
(Supplementary Table 1; Supplementary Figures 1, 2). Carbenicillin was the most common form of resistance among the isolates. The Carbenicillin resistance was found in 55.2% of the water isolates at time zero and in 68.3% of the total water isolates after the experiment, and in 28.6 and 90.5% of the total sediment isolates, at time zero and after the experiment, respectively. Tetracycline was the least common form of resistance, being represented in 10.4 and 0.8% of the water isolates and 7.1 and 1.0% of the sediment isolates before and after the experiment, respectively. Kanamycin resistance was not observed in sediment samples after the experiment. Overall, there was a statistically significant decrease in the number of resistant strains after the experiment (Bernard's exact test; $p < 0.05$; Figure 2; Table 3), in all three fertilization treatments and in the control, with the marked exception of Carbenicillin, for which resistance increased significantly in NNP and P treatments in water and in all treatments in sediment.

Biofilm Formation

To further characterize the ecological traits of the studied strains, biofilm formation was analyzed for 923 isolates. In the water samples, the enriched isolates exhibited an increase in the proportion of the ability to form biofilm (Figure 3; Supplementary Figure 1). In a structured environment, interactions can be enhanced by biofilm formation. As expected, sediment strains generally had a greater tendency to produce biofilm that those isolated from water. However, in sediment, differences between before and after the treatments were not significant (Barnard's exact test; $p > 0.05$; Table 4), except for the NNP treatment, for which no biofilm-producing strains were detected (Figure 3; Supplementary Figure 2). In the case of water, a significant increase in the percentage of biofilm-producing strains was observed for all treatments involving nutrient additions, namely P, NP, and NNP (Barnard's exact test; $p < 0.05$; Table 4).

Discussion

In this study, the effect of experimental nutrient enrichment in a shallow, nutrient-deficient pond was analyzed to assess changes in the composition of the cultivable microbial community as a function of the N:P ratio of enrichment, as well as the modifications in the interaction network among cultivable isolates. The selective medium PIA was found to be highly selective to gamma-proteobacteria, a class previously reported as abundant



at Churince as well as other sites at CCB (Souza et al., 2006; Escalante et al., 2009; Bonilla-Rosso et al., 2012) and it has not been analyzed in detail. Unfortunately, a great amount of the isolates could not be identified, as it seems that Cuatro Ciénegas bacteria produce compounds that inhibit the PCR reaction, compounds that remain despite the use of several DNA extraction methods. To analyze the community response to the nutrient enrichment without the cultivation bias, 16S libraries from water and sediment samples, from May to June 2011, were also sequenced. The analysis of the community showed, in agreement with this study, a shift in the community composition with the disappearance of several bacterial genera after the increased nutrient availability (Elser et al., 2014, in preparation).

Our hypothesis that Lagunita is P-limited was supported, as it was found that all added P that remained in the water column was immobilized into seston (Table 2). This is reflected by the fact that TDP and SRP were not significantly different respect to the control, but TP and phosphorus in seston were. This difference was also observed in the N:P ratio. With respect to total dissolved nitrogen, it was found that both nitrogen-amended treatments were significantly different but the phosphorus-amended treatment was not. This supports that our observations were not due to an isolation bias.

Based on the 16S rRNA sequences from the cultivated strains, we found that two different groups of gamma-proteobacteria responded to increases of nutrient availability in water and

sediment environments, *Pseudomonas* and *Halomonas*, respectively. The strains characterized differed among the different treatments in the physiological characteristics analyzed, biofilm

formation and antibiotic resistance. In contrast, genera such as *Shewanella*, *Citrobacter*, and *Rheinheimera* in water, as well as *Stenotrophomonas* and *Brachybacterium* in sediment were not isolated from the fertilized mesocosms, although they were present at time zero. Moreover, some rare genera, such as *Kocuria*, which was not documented at time zero, was found after the enrichment. However, we note that this rare genus of Actinobacteria has been obtained in past work at CCB (Cerritos et al., 2011), so it is not foreign to this environment. Several genera isolated in this study, had not been previously reported to grow in PIA medium (McCaig et al., 2001; Rajkowski and Rice, 2001; Falcone-Dias et al., 2012; Weiser et al., 2014).

All these changes in bacterial groups, which were isolated during different times in the experiment, suggest that an important community change at the bacterial level took place after the enrichment, however it should be taken carefully given the sampling method. It can be speculated that the original community in Lagunita was dominated by *K*-strategists, which rely on long-term survival on limited resources (Pianka, 1970; Fuchs et al., 2000; Singer et al., 2011). After the enrichment, the microbial community was dominated by faster-growing gamma-proteobacteria, which can be considered *r*-strategists, rapidly exploiting nutrient patches and then dying or becoming dormant after substrate exhaustion. Indeed, *Pseudomonas* has been previously characterized in general as a *r*-strategist, as pseudomonads rapidly colonize and grow on nutrient-rich environments (Juteau et al., 1999; Margesin et al., 2003), due to its metabolic versatility (Clarke, 1982; Hallsworth et al., 2003; Domínguez-Cuevas et al., 2006). This shift is important as it has been reported that *K*-strategists are expected to allocate more energy and interact in a broader way with their environment, for example developing strategies to cope with their environment, than to grow (Fontaine et al., 2003).

Although the experiment showed a reduction in diversity of the isolated strains and interactions as a whole, details of these responses of strains to the individual treatments were largely idiosyncratic and seemed independent of their phylum. For example, the group that includes strain AP29, affiliated with

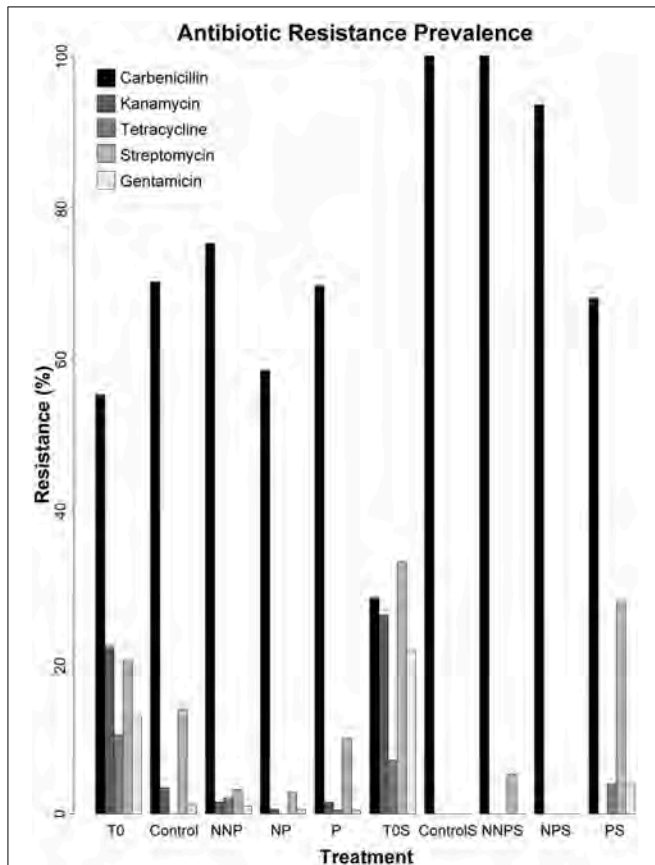
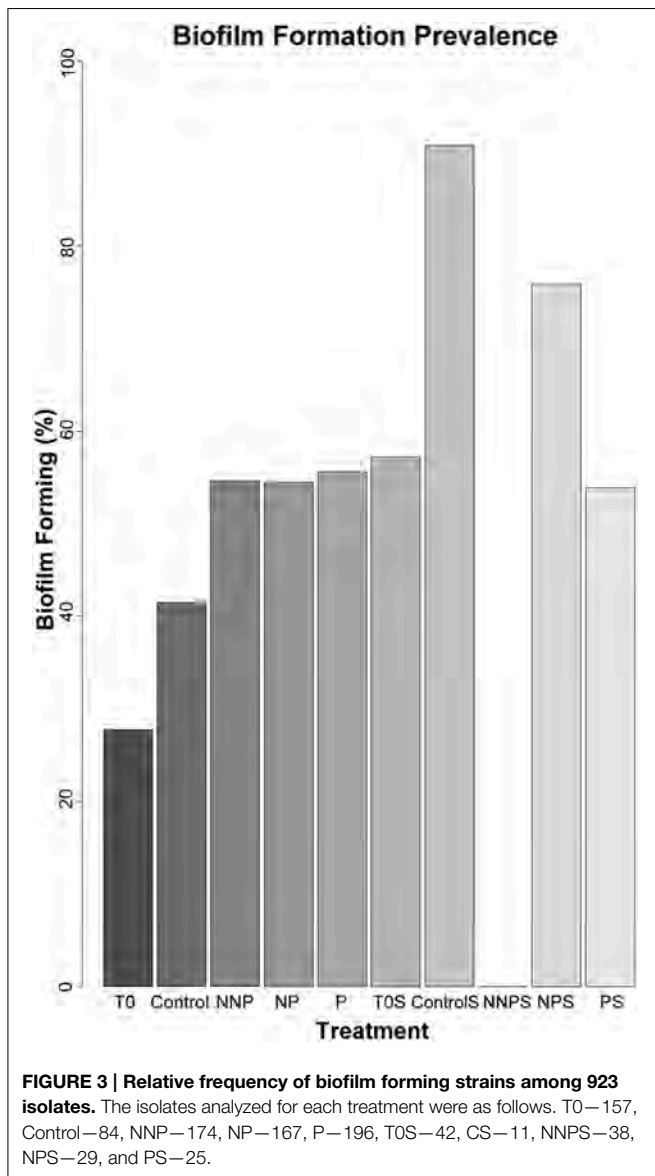


FIGURE 2 | Prevalence of antibiotic resistance among 960 isolates. The isolates analyzed for each treatment were as follows. T0—163, Control—87, NNP—186, NP—176, P—201, TOS—42, CS—11, NNPS—38, NPS—31, and PS—25.

TABLE 3 | Antibiotic resistance.

Treatment	n	Carbenicillin		Kanamycin		Tetracycline		Streptomycin		Gentamicin	
		Resistant (%)	p	Resistant (%)	P	Resistant (%)	p	Resistant (%)	p	Resistant (%)	p
Water T0	163	55.21		22.09		10.43		20.25		12.88	
Water Control	87	70.11	0.09	3.45	4.60E-4	0.00	7.23E-3	13.79	0.93	1.15	7.23E-3
Water NNP	186	75.27	3.30E-4	1.61	4.30E-9	2.15	4.94E-3	3.23	1.81E-6	1.08	3.00E-5
Water NP	176	58.52	1.00	0.57	6.04E-10	0.00	4.00E-5	2.84	1.40E-6	0.57	2.00E-5
Water P	201	69.62	0.02	1.49	7.91E-10	0.50	5.00E-5	9.95	0.02	0.50	2.97E-6
Sediment T0	42	28.57		26.19		7.14		33.33		21.43	
Sediment Control	11	100	3.00E-4	0.00	0.38	0.00	1.00	0.00	0.10	0.00	0.38
Sediment NNP	38	100	1.53E-11	0.00	2.54E-3	0.00	0.41	5.26	6.99E-3	0.00	0.01
Sediment NP	31	93.55	4.38E-8	0.00	8.15E-3	0.00	0.63	0.00	1.31E-3	0.00	0.02
Sediment P	25	68.00	6.64E-3	0.00	0.02	4.00	1.00	28.00	1.00	4.00	0.27

Percentages of strain resistant for different antibiotics, and their significance with respect to the initial condition (T0) in both water and sediment, according to Barnard's exact tests, with Bonferroni correction for multiple tests. Percentages with p-values less than 0.05 are considered significantly different than the corresponding to T0 values.



Pseudomonas, responded to the P treatment, while another group of *Pseudomonas*, which includes strain ENNP10, responded to the NNP treatment. However, another *Pseudomonas* group was abundant at the beginning of the experiment and remained abundant in the control, as well as in the P treatment (group including strains AP9, AC10, and 1C11) (Figure 1). The sudden availability of P in P-deficient environment could favor the dominance of the *Pseudomonas* genus, which has been reported to solubilize phosphate (Park et al., 2009; Parani and Saha, 2012). In sediment samples it was observed in both N+P treatments that *Halomonas* exhibited the greatest response. This observation is consistent with the fact that the *Halomonas* genus has been identified as capable of denitrification and may have taken advantage of the added NO₃ in the NP and NNP treatments (Mormille et al., 1999; Guo et al., 2013).

The production of chemical compounds as bacteriocins and/or antibiotics is a common mechanism of antagonism

TABLE 4 | Biofilm formation.

Treatment	n	Biofilm forming (%)	P
Water T0	155	27.74	
Water Control	82	41.46	0.13
Water NNP	174	54.60	3.07E-6
Water NP	167	54.49	4.37E-6
Water P	196	55.61	5.78E-7
Sediment T0	43	57.14	
Sediment Control	11	90.91	0.16
Sediment NNP	38	0.00	5.82E-8
Sediment NP	31	75.86	0.50
Sediment P	26	53.85	1.00

Percentages of strain forming biofilm, and their significance with respect to the initial condition (T0) in both water and sediment, according to Barnard's exact tests, with Bonferroni correction for multiple tests. Percentages with p-values less than 0.05 are considered significantly different than the corresponding to T0 values.

among microorganisms (Riley and Gordon, 1999; Lenski and Riley, 2002; Riley and Wertz, 2002; Kirkup and Riley, 2004; Hibbing et al., 2010; Kohanski et al., 2010; Majeed et al., 2011, 2013; Pérez-Gutiérrez et al., 2013; Aguirre-von-Wobeser et al., 2014). In this study, we observed a general decrease in the antibiotic resistance in both the water and sediment environment, for all antibiotics except Carbenicillin, after the experiment (Table 3). This decrease likely reflects modifications in microbial survival strategies under different conditions, including the control were wind movement of both water and sediment, was restricted by the mesocosm tubes. Given the antagonistic network previously documented among *Pseudomonas* bacterial isolates from CCB (Aguirre-von-Wobeser et al., 2014), this antagonism could be due to the competition for resources. Following “microbial market logic” (Werner et al., 2014), without the acute nutrient limitation, the cost of producing antibiotics to repel competitors for a scarce resource is no longer beneficial in the case of increased P and the ideal N:P ratio, while in the NNP treatment, the community is so perturbed by the further limitation of P in relation to N that antagonism or cooperation through biofilm formation is no longer an economic option. On the other hand, in a rock—paper—scissors (RPS) model behavior scenario, that can be applied only for structured environment (Kirkup and Riley, 2004; Nahum et al., 2011) such as sediment or biofilm, the strains that produce toxins (C) kill sensitive strains (S), which outcompete resistant strains (R), which in turn outcompete C (Czarán et al., 2002; Kirkup and Riley, 2004). In this RPS game, the resistant and producer strains spend resources to keep the resistance, which in an enriched environment may be no longer needed, thus those strains are outcompeted by the sensitive strains (Kerr et al., 2002). Interestingly, this shift from a collection of isolates with a high prevalence of resistance to several antibiotic tested, to a collection dominated by sensitive strains was observed in both habitats: water and sediment (Figure 2), suggesting that the fact of predicting the neighborhood, as required for the rock-paper-scissor model, is not a requisite for antagonism, at least in the analyzed system.

Market logic suggests that local environments determine trade connections (Werner et al., 2014), and biofilm formation is a way to ensure a local environment both in water and sediment. The mechanisms of bacterial biofilm formation are processes by which single cells coordinate and implement the formation of complex surface-attached communities (Davey and O'Toole, 2000). Bacteria that reside within the biofilm are to some extent isolated from environmental stresses, such as desiccation or nutrient limitation (Danhorn et al., 2004). Complex interactions, in particular mutualistic behaviors, are expected in a biofilm, since the secretion of the matrix that forms the biofilm is a form of public good that will increase the survival of the coexisting partners and will avoid the presence of cheaters (Werner et al., 2014).

Biofilm-forming strains were found in our experiment in both habitats at time zero and in most of the enrichment treatments, suggesting that this cooperation strategy is more ingrained in the whole CCB microbial community than antagonistic interactions promoted by antibiotics, where rare species cannot afford to pay its costs. Biofilm formation was not present only in the sediments of the NNP treatment where P was further limited in relation to N. This treatment was dominated by strain of *Halomonas*. The NP treatment was also dominated by closely related strains of *Halomonas* that were biofilm-forming (Supplementary Figure 2). This differential response suggests that a wide range of strategies to cope with environmental limitations is present in CCB microbes, even within a single genus.

As the Black Queen Hypothesis (BQH) suggests, certain biological functions are not only expensive, but are also broadly distributed in the community, since they are public goods. Hence, the majority of the community can afford to lose those functions if they are at least a proportion of helpers that produce such public good (Morris et al., 2012). As a consequence, for a microbial market, we also need “price” differences and supply, as well as “demand” variation. In this study, we observed a shift in the composition of the bacterial community, from a diverse community prior the enrichment to a community dominated by few genera such as *Pseudomonas* in water or *Halomonas* in sediment after the addition of N+P. As previously stated, the change was not only related to the community composition, but also to its physiological characteristics as antibiotic resistances and the ability of biofilm formation. These changes could be explained with this microbial market theory as the supplies changed with the experiment the balance between cost and benefit.

References

- APHA. (2005). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Washington, DC: American Publish Health Association.
- Aguirre-von-Wobeser, E., Soberón-Chávez, G., Eguiarte, L. E., Ponce-Soto, G. Y., Vázquez-Rosas-Landa, M., and Souza, V. (2014). Two-role model of an interaction network of free-living γ -proteobacteria from an oligotrophic environment. *Environ. Microbiol.* 16, 1366–1377. doi: 10.1111/1462-2920.12305
- Aljanabi, S. M., and Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res.* 25, 4692–4693. doi: 10.1093/nar/25.22.4692
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Barnard, G. A. (1945). A new test for 2×2 tables. *Nature* 156, 177 doi: 10.1038/156783b0
- Bennie, J., Hill, M., Baxter, R., and Huntley, B. (2006). Influence of slope aspect on long-term vegetation change in British chalk grasslands. *J. Ecol.* 94, 355–368. doi: 10.1111/j.1365-2745.2006.01104.x
- Bevino, A., Paganin, P., Bacci, G., Florio, A., Pellicer, M. S., Pappaleo, M. C., et al. (2014). Soil Bacterial community response to differences in agricultural management along with seasonal changes in a
- According to the market theory, the benefit of trade depends not only on the interacting partners but also on the available supply of commodities from other sources and it is expected that biotic or abiotic conditions influence the demand for a particular service (Werner et al., 2014). Based on an analysis of Illumina tags of 16S rRNA (Elser et al., 2014, in preparation), our study site exhibits a large bacterial diversity dominated by alpha-proteobacteria and bacteroidetes. In the original community, we expected to find a strong competition among the members of this community. Under the original condition of extreme low P and N availabilities, it is predicted that specialization will be favored. All this considering, it is not surprising that when this particularly diverse and fragile network of interactions was perturbed by the mesocosm conditions and the nutrient input, the community structure and its biological market equilibrium changed, reducing its overall diversity, not only in the few cultured genera that we could follow, but in the overall community (Elser et al., 2014), suggesting that the resilience of this extremely oligotrophic oasis depends precisely on the permanence of such unbalanced stoichiometry.

Acknowledgments

This paper constitutes a partial fulfillment of the Graduate Program in Biological Sciences of the National Autonomous University of México (UNAM). GYP-S acknowledges the scholarship and financial support provided by the National Council of Science and Technology (CONACyT; Grant no. 412697/269818), and UNAM. This study was conducted with financial support from PAPIIT project IN203712-3, FCS-Alianza WWF and CONACYT. We thank Abigail González-Valdéz, Victoria Grosso-Becerra, Mirna Vázquez-Rosas-Landa, Erika Aguirre-Planter and Laura Espinosa-Asuar for technical assistance. JJE acknowledges support from the U. S. National Science Foundation (DEB-0950175) and National Aeronautics and Space Administration Astrobiology (NAI5-0018). All samples were collected under the permit SGPA/DGVS/00614/13 FAUT – 0230 granted to VS by the “Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT).”

Supplementary Material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://www.frontiersin.org/journal/10.3389/fmicb.2015.00246/abstract>

- mediterranean region. *PLoS ONE* 9:e105515. doi: 10.1371/journal.pone.0105515
- Bonilla-Rosso, G., Peimbert, M., Alcaraz, L. D., Hernández, I., Eguiarte, L. E., Olmedo-Alvarez, G., et al. (2012). Comparative metagenomics of two microbial mats at Cuatro Ciénegas Basin II: community structure and composition in oligotrophic environments. *Astrobiology* 12, 659–673. doi: 10.1089/ast.2011.0724
- Brauer, V. S., Stomp, M., and Huisman, J. (2012). The nutrient-load hypothesis: patterns of resource limitation and community structure driven by competition for nutrients and light. *Am. Nat.* 179, 721–740. doi: 10.1086/665650
- Breitbart, M., Hoare, A., and Nitti, A. (2009). Metagenomic and stable isotopic analyses of modern freshwater microbialites in Cuatro Ciénegas, Mexico. *Environ. Microbiol.* 11, 16–34. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01725.x
- Cerritos, R., Eguiarte, L. E., Avitia, M., Siefert, J., Travisano, M., Rodríguez-Verdugo, A., et al. (2011). Diversity of culturable thermo-resistant aquatic bacteria along and environmental gradient in Cuatro Ciénegas, Coahuila, México. *Antonie Van Leeuwenhoek* 99, 303–318. doi: 10.1007/s10482-010-9490-9
- Chen, W., and Kuo, T. (1993). A simple rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 21:2260 doi: 10.1093/nar/21.9.2260
- Christofoli, S., Monty, A., and Mahy, G. (2010). Historical landscape structure affects plant species richness in wet heathlands with complex landscape dynamics. *Landsc. Urban Plann.* 98, 92–98. doi: 10.1016/j.landurbplan.2010.07.014
- Clarke, P. H. (1982). The metabolic versatility of pseudomonads. *Antonie Van Leeuwenhoek* 48, 105–130. doi: 10.1007/BF00405197
- Cole, J. R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R. J., et al. (2009). The Ribosomal Database project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 37 D141–D145. doi: 10.1093/nar/gkn879
- Cordero, O. X., Wildschutte, H., Kirkup, B., Proehl, S., Ngo, L., Hussain, F., et al. (2012). Ecological populations of bacteria act as socially cohesive units of antibiotic production and resistance. *Science* 337, 1228–1231. doi: 10.1126/science.1219385
- Czarán, T. L., Hoekstra, R. L., and Pagie, L. (2002). Chemical warfare between microbes promotes biodiversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 786–790. doi: 10.1073/pnas.012399899
- Danhorn, T., Hentzer, M., Givskov, M., Parsek, M. R., and Fuqua, C. (2004). Phosphorus limitation enhances biofilm formation of the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens* through the PhoR-PhoB regulatory system. *J. Bacteriol.* 186, 4492–4501. doi: 10.1128/JB.186.14.4492-4501.2004
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., and Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* 9, 772. doi: 10.1038/nmeth.2109
- Davey, M. E., and O'Toole, G. A. (2000). Microbial biofilms: form ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 847–867. doi: 10.1128/MMBR.64.4.847-867.2000
- Domínguez-Cuevas, P., González-Pastor, J. E., Marqués, S., Ramos, J. L., and de Lorenzo, V. (2006). Transcriptional tradeoff between metabolic and stress-response programs in *Pseudomonas putida* KT2440 cells exposed to toluene. *J. Biol. Chem.* 281, 11981–11991. doi: 10.1074/jbc.M509848200
- Donohue, I., Jackson, A. L., Pusch, M. T., and Irvine, K. (2009). Nutrient enrichment homogenizes lake benthic assemblages at local and regional scales. *Ecology* 90, 3470–3477. doi: 10.1890/09-0415.1
- Dykhuizen, D. E. (1998). Santa Rosalia revisited: why are there so many species of bacteria? *Antonie Van Leeuwenhoek* 73, 25–33. doi: 10.1023/A:1000665216662
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797. doi: 10.1093/nar/gkh340
- Elser, J. J., Elser, T. J., Carpenter, S. R., and Brock, W. A. (2014). Regime shift in fertilizer commodities indicates more turbulence ahead for food security. *PLoS ONE* 9:e93998. doi: 10.1371/journal.pone.0093998
- Elser, J. J., Schampel, J. H., Garcia-Pichel, F., Wade, B. D., Souza, V., Eguiarte, L., et al. (2005). Effects of phosphorus enrichment and grazing snails on modern stromatolitic communities. *Freshw. Biol.* 50, 1808–1825. doi: 10.1111/j.1365-2427.2005.01451.x
- Elser, J. J., Watts, J., Schampel, J. H., and Farmer, J. (2006). Early food webs on a trophic knife-edge? Experimental data from modern microbialite-based ecosystem. *Ecol. Lett.* 9, 295–303. doi: 10.1111/j.1461-0248.2005.00873.x
- Escalante, A., Caballero-Mellado, J., Martínez-Aguilar, L., Rodríguez-Verdugo, A., González-González, A., Toribio-Jiménez, J., et al. (2009). *Pseudomonas cuatrocienegasensis* sp. nov., isolated from an evaporating lagoon in the Cuatro Ciénegas valley in Coahuila, Mexico. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 1416–1420. doi: 10.1099/ijs.0.006189-0
- Falcone-Dias, M. F., Vaz-Moreira, I., and Manaia, C. M. (2012). Bottled mineral water as a potential source of antibiotic resistant bacteria. *Water Res.* 46, 3612–3622. doi: 10.1016/j.watres.2012.04.007
- Fontaine, S., Mariotti, A., and Abbadie, L. (2003). The priming effect of organic matter: a question to microbial competition? *Soil Biol. Biochem.* 35, 837–843. doi: 10.1016/S0038-0717(03)00123-8
- Fuchs, B. M., Zubkov, M. V., Sahn, K., Burkill, P. H., and Amann, R. (2000). Changes in community composition during dilution cultures of marine bacterioplankton as assessed by flow cytometric and molecular biological techniques. *Environ. Microbiol.* 2, 190–201. doi: 10.1046/j.1462-2920.2000.00092.x
- Gaston, K. J. (2000). Global patterns in biodiversity. *Nature* 405, 220–227. doi: 10.1038/35012228
- Greig, D., and Travisano, M. (2008). Density-dependent effects on allelopathic interactions in yeast. *Evolution* 62, 521–527. doi: 10.1111/j.1558-5646.2007.00292.x
- Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., and Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59, 307–321. doi: 10.1093/sysbio/syq010
- Guo, Y., Zhou, X., and Yuguang, L. (2013). Heterophilic nitrification and aerobic denitrification by a novel *Halomonas campisalis*. *Biotechnol. Lett.* 35, 2045–2049. doi: 10.1007/s10529-013-1294-3
- Hallsworth, J. E., Heim, S., and Timmis, K. N. (2003). Chaotropic solutes cause water stress in *Pseudomonas putida*. *Environ. Microbiol.* 5, 1270–1280. doi: 10.1111/j.1462-2920.2003.00478.x
- Hibbing, M. E., Fuqua, C., Parsek, M. R., and Peterson, S. B. (2010). Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 15–25. doi: 10.1038/nrmicro2259
- Huisman, J., and Weissing, F. J. (1999). Biodiversity of plankton by species oscillations and chaos. *Nature* 42, 407–410. doi: 10.1038/46540
- Hutchinson, G. E. (1959). Homage to Santa Rosalia or why are there so many kinds of animals? *Am. Nat.* 93, 145–159. doi: 10.1086/282070
- Jansson, M., Bergstöm, A.-K., Lymer, D., Vrede, K., and Karlsson, J. (2006). Bacterioplankton growth and nutrient use efficiencies under variable organic carbon and inorganic phosphorus ratios. *Microb. Ecol.* 52, 358–364. doi: 10.1007/s00248-006-9013-4
- Jürgens, K., and Güde, H. (1990). Incorporation and release of phosphorus by planktonic bacteria and phagotrophic flagellates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 59, 271–284. doi: 10.3354/meps059271
- Juteau, P., Larocque, R., Rho, D., and LeDuy, A. (1999). Analysis of the relative abundance of different types of bacteria capable of toluene degradation in a compost biofilter. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52, 863–868. doi: 10.1007/s002530051604
- Kassen, R., Buckling, A., Bell, G., and Rainey, P. B. (2000). Diversity peaks at intermediate productivity in laboratory microcosm. *Nature* 406, 508–512. doi: 10.1038/35020060
- Kerr, B., Riley, M. A., Feldman, M. W., and Bohannan, B. J. M. (2002). Local dispersal promotes biodiversity in a real-life game of rock-paper-scissors. *Nature* 418, 171–174. doi: 10.1038/nature00823
- King, E. O., Ward, M. K., and Raney, E. E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44, 301–307.
- Kirkup, B. C., and Riley, M. A. (2004). Antibiotic-mediated antagonism leads to a bacterial game of rock-paper-scissors *in vivo*. *Nature* 428, 412–414. doi: 10.1038/nature02429
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., and Collins, J. J. (2010). How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 423–435. doi: 10.1038/nrmicro2333
- Lane, D. J. (1991). “16S/23S rRNA sequencing,” in *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, eds E. Stackebrandt and M. Goodfellow (New York, NY: John Wiley and Sons), 115–175.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., et al. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947–2948. doi: 10.1093/bioinformatics/btm404

- Lee, Z. M.-P., Steger, L., Corman, J. R., Neveu, M., Poret-Peterson, A., Souza, V., et al. (in press). Stoichiometrically imbalanced shallow pond in the Cuatro Ciénegas Basin, Mexico, is highly sensitive to nutrient enrichment. *PLoS ONE*.
- MacArthur, R. H., and Wilson, E. O. (1967). *The Theory of Island Biogeography*. Princeton, NJ: Princeton University Press.
- Majeed, H., Gillor, O., Kerr, B., and Riley, M. A. (2011). Competitive interactions in *Escherichia coli* populations: the role of bacteriocins. *ISME J.* 5, 71–81. doi: 10.1038/ismej.2010.90
- Majeed, H., Lampert, A., Ghazaryan, L., and Gillor, O. (2013). The weak shall inherit: bacteriocin-mediated interactions in bacterial populations. *PLoS ONE* 8:e63837. doi: 10.1371/journal.pone.0063837
- Makino, W., and Cotner, J. B. (2005). Elemental stoichiometry of a heterotrophic bacterial community in a freshwater lake: implications for growth- and resource-dependent variations. *Aquat. Microbiol. Ecol.* 34, 33–41. doi: 10.3354/ame034033
- Margesin, R., Labbé, D., Schinner, F., Greer, C. W., and Whyte, L. G. (2003). Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine alpine soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3085–3092. doi: 10.1128/AEM.69.6.3085-3092.2003
- Marini, L., Scotton, M., Klimek, S., Isselstein, J., and Pecile, A. (2007). Effects of local factors on plant species richness and composition of Alpine meadows. *Agric. Ecosyst. Environ.* 119, 281–288. doi: 10.1016/j.agee.2006.07.015
- McCaig, A. E., Grayston, S. J., Prosser, J. I., and Glover, A. (2001). Impact of cultivation on characterisation of species composition of soil bacterial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35, 37–48. doi: 10.1111/j.1574-6941.2001.tb00786.x
- Mormille, M. R., Romine, M. F., Garcia, M. T., Ventosa, A., Bailey, T. J., and Peyton, B. M. (1999). *Halomonas campisalis* sp. nov. a denitrifying moderately haloalkaliphilic bacterium. *Syst. Appl. Microbiol.* 22, 551–558. doi: 10.1016/S0723-2020(99)80008-3
- Morris, J. J., Lenski, R. E., and Zinser, E. R. (2012). The black queen hypothesis: evolution of dependencies through adaptive gene loss. *MBio* 3, e00036–e00012. doi: 10.1128/mBio.00036-12
- Nahum, J. R., Hardigan, B. N., and Kerr, B. (2011). Evolution of restraint in a structured rock-paper-scissors community. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 10831–10838. doi: 10.1073/pnas.1100296108
- Nelson, C. E., and Carlson, C. A. (2011). Differential response of high-elevation planktonic bacterial community structure and metabolism to experimental nutrient enrichment. *PLoS ONE* 6:e18320. doi: 10.1371/journal.pone.0018320
- O'Toole, G. A. (2011). Microtiter dish biofilm formation assay. *J. Vis. Exp.* doi: 10.3791/2437
- Parani, K., and Saha, B. K. (2012). Prospects of using phosphate solubilizing *Pseudomonas* as bio fertilizers. *Eur. J. Biol. Sci.* 4, 40–44. doi: 10.5829/idosi.ejbs.2012.4.2.63117
- Park, K. H., Lee, C. Y., and Son, H.-J. (2009). Mechanisms of insoluble phosphate solubilization by *Pseudomonas fluorescens* RAF15 isolated from ginseng rhizosphere and its plant growth-promoting activities. *Lett. Appl. Microbiol.* 49, 222–228. doi: 10.1111/j.1472-765X.2009.02642.x
- Peimbert, M., Alcaraz, L. D., Bonilla-Rosso, G., Olmedo-Alvarez, G., García-Oliva, F., Segovia, L., et al. (2012). Comparative metagenomics of two microbial mats at Cuatro Ciénegas Basin I: ancient lessons on how to cope with an environment under severe nutrient stress. *Astrobiology* 12, 648–658. doi: 10.1089/ast.2011.0694
- Pérez-Gutiérrez, R. A., López-Ramírez, V., Islas, Á., Alcaraz, L. D., Hernández-González, I., Olivera, B. C., et al. (2013). Antagonism influences assembly of a *Bacillus* guild in a local community and is depicted as a food-chain network. *ISME J.* 7, 487–497. doi: 10.1038/ismej.2012.119
- Pianka, E. R. (1970). On *r* and *K* selection. *Am. Nat.* 104, 592–597. doi: 10.1086/282697
- Rajkowsky, K. T., and Rice, E. W. (2001). Growth and recovery of selected gram-negative bacteria in reconditioned wastewater. *J. Food Prot.* 64, 1761–1767.
- Reischl, U., Linde, H. J., Metz, M., Leppmeier, B., and Lehn, N. (2000). Rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous species confirmation using real-time fluorescence PCR. *J. Clin. Microbiol.* 38, 2429–2433. doi: 10.1128/JCM.40.7.2392-2397.2002
- Lenski, R. E., and Riley, M. A. (2002). Chemical warfare from an ecological perspective. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 556–558. doi: 10.1073/pnas.022641999
- Riley, M. A., and Gordon, D. M. (1999). The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends Microbiol.* 7, 129–133. doi: 10.1016/S0966-842X(99)01459-6
- Riley, M. A., and Wertz, J. E. (2002). Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 117–137. doi: 10.1146/annurev.micro.56.012302.161024
- Rodríguez-Verdugo, A., Souza, V., Eguiarte, L. E., and Escalante, A. E. (2012). Diversity across seasons of culturable *Pseudomonas* from a desiccation lagoon in Cuatro Ciénegas, México. *Int. J. Microbiol.* 2012:201389. doi: 10.1155/2012/201389
- Rypien, K. L., Ward, J. R., and Azam, F. (2010). Antagonistic interactions among coral-associated bacteria. *Environ. Microbiol.* 12, 28–39. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.02027.x
- Sachs, J. L., and Hollowell, A. C. (2012). The origins of cooperative bacterial communities. *MBio* 3:e00099-12. doi: 10.1128/mBio.00099-12
- Schäfer, H., Bernard, L., Courties, C., Lebaron, P., Servais, P., Pukall, R., et al. (2001). Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient-enriched seawater mesocosms: changes in the genetic diversity of bacterial populations. *FEMS Microbiol. Ecol.* 34, 243–253. doi: 10.1111/j.1574-6941.2001.tb00775.x
- Singer, E., Webb, E. A., Nelson, W. C., Heidelberg, J. F., Ivanova, N., Pati, A., et al. (2011). Genomic potential of *Marinobacter aquaeolei*, a geochemical “Opportunotroph.” *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2763–2771. doi: 10.1128/AEM.01866-10
- Smith, V. H. (1993). Applicability of resource-ratio theory to microbial ecology. *Limnol. Oceanogr.* 38, 239–249. doi: 10.4319/lo.1993.38.1.0239
- Souza, V., Eguiarte, L. E., Siefert, J., and Elser, J. J. (2008). Microbial endemism: does phosphorus limitation enhance speciation? *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 559–564. doi: 10.1038/nrmicro1917
- Souza, V., Espinosa-Asuar, L., Escalante, A. E., Eguiarte, L. E., Farmer, J., Forney, L., et al. (2006). An endangered oasis of aquatic microbial biodiversity in the Chihuahuan desert. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 6565–6570. doi: 10.1073/pnas.0601434103
- Souza, V., Siefert, J. L., Escalante, A. E., Elser, J. J., and Eguiarte, L. E. (2012). The Cuatro Ciénegas Basin in Coahuila, Mexico: an astrobiological Precambrian Park. *Astrobiology* 12, 641–647. doi: 10.1089/ast.2011.0675
- Tilman, D., Mattson, M., and Langer, S. (1981). Competition and nutrient kinetics along a temperature gradient: an experimental test of a mechanistic approach to niche theory. *Limnol. Oceanogr.* 26, 1020–1033. doi: 10.4319/lo.1981.26.6.1020
- Validov, S., Mavrodi, O., De La Fuente, L., Boronin, A., Weller, D., Thomashow, L., et al. (2005). Antagonistic activity among 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. *FEMS Microbiol. Lett.* 242, 249–256. doi: 10.1016/j.femsle.2004.11.013
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., and Cole, J. R. (2007). Naive bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5261–5267. doi: 10.1128/AEM.00062-07
- Weiser, R., Donoghue, D., Weightman, A., and Mahenthiralingam, E. (2014). Evaluation of five selective media for the detection of *Pseudomonas aeruginosa* using a strain panel from clinical, environmental and industrial sources. *J. Microbiol. Methods.* 99, 8–14. doi: 10.1016/j.mimet.2014.01.010
- Werner, G. D. A., Strassmann, J. E., Ivins, A. B., Engelmoer, D. J., Verbruggen, E., Queller, D. C., et al. (2014). Evolution of microbial markets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 1237–1244. doi: 10.1073/pnas.1315980111

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2015 Ponce-Soto, Aguirre-von-Wobeser, Eguiarte, Elser, Lee and Souza. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Supplementary Material

Enrichment experiment reduce diversity and changes microbial interactions in an ultra-oligotrophic environment

Gabriel Yaxal Ponce-Soto¹, Eneas Aguirre-von-Wobeser², Luis E. Eguiarte¹, James J. Elser³, Zarraz M.-P. Lee³, Valeria Souza^{1*}

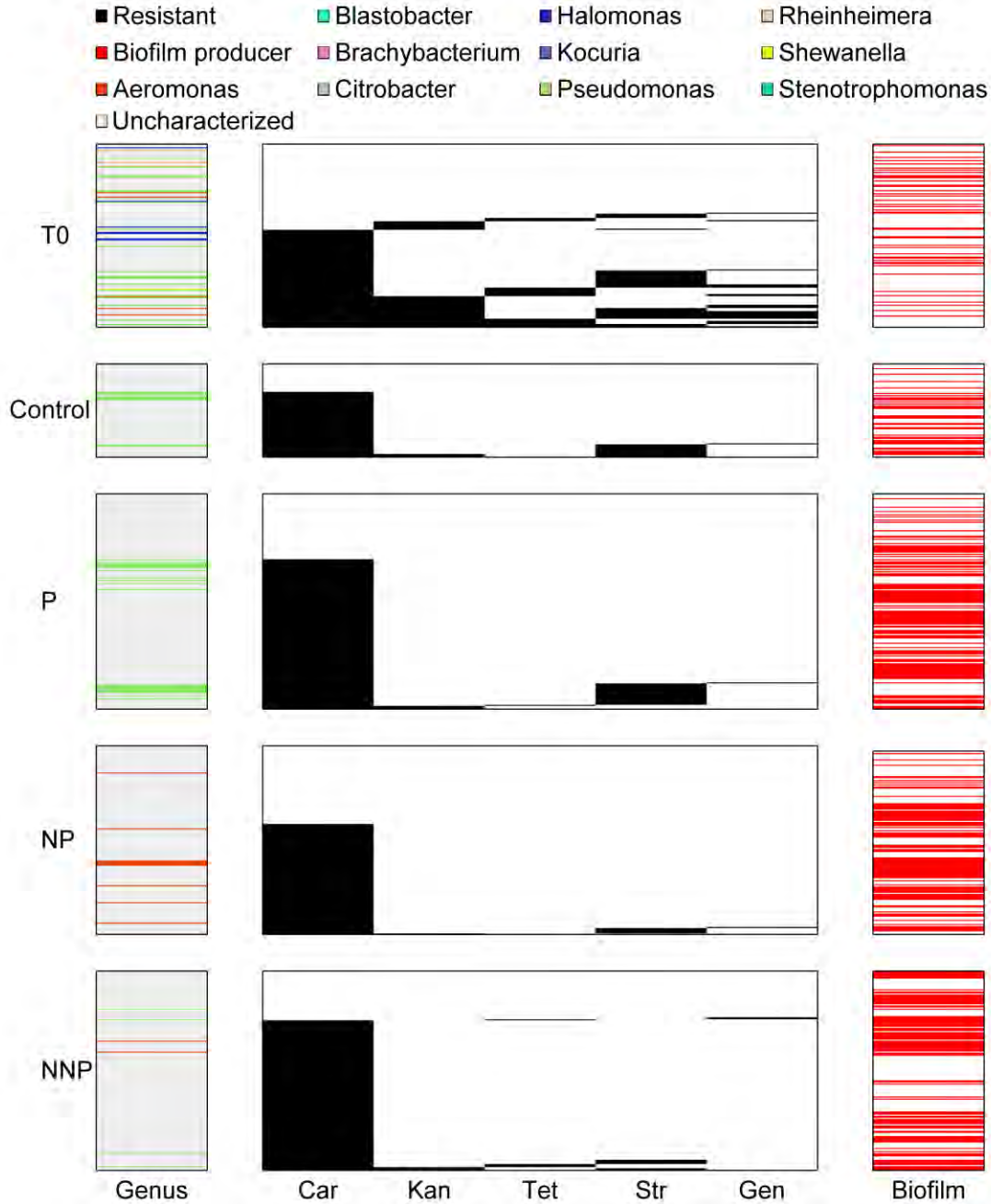
¹Laboratorio de Ecología Molecular y Experimental, Instituto de Ecología, Departamento de Ecología Evolutiva, Universidad Nacional Autónoma de México, México

²Red de Estudios Moleculares Avanzados, Instituto de Ecología A.C., México

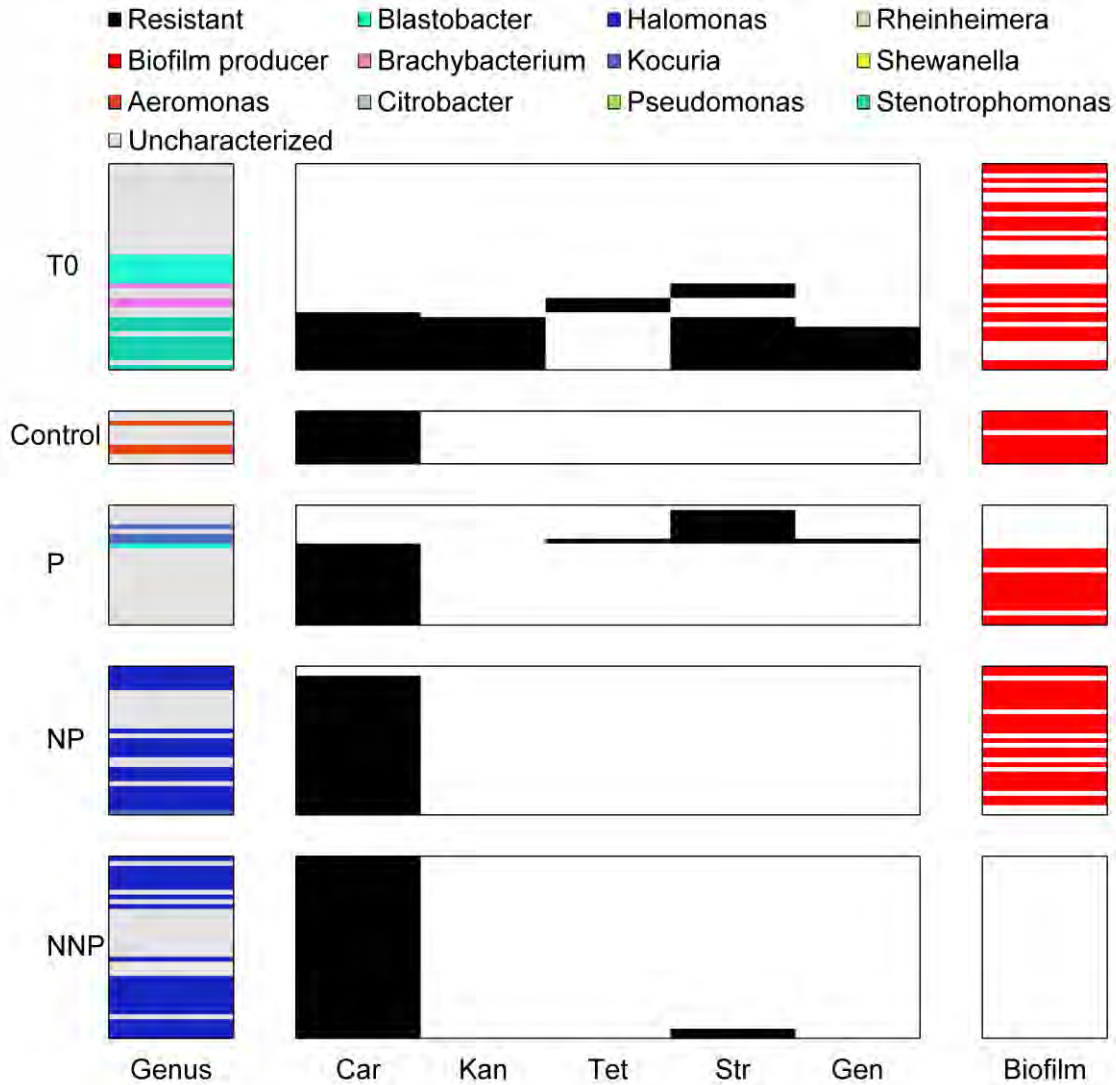
³School of Life Sciences, Arizona State University, Arizona, USA

* **Correspondence:** Valeria Souza, Laboratorio de Ecología Molecular y Experimental, Instituto de Ecología, Departamento de Ecología Evolutiva, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70-275, Coyoacán, DF, 04510, México
souza@unam.mx

1. Supplementary Figures



Supplementary Figure 1 | Antibiotic resistance and biofilm production in water isolates. Antibiotic resistance and biofilm production assays from 863 water isolates, where each line represents one isolate. Each box, from left to right, represents the taxonomic affiliation of all the isolates and its corresponding antibiotic resistance and biofilm formation ability, respectively. The antibiotics tested were carbenicillin (Car), kanamycin (Kan), tetracycline (Tet), streptomycin (Str) and gentamycin (Gen).



Supplementary Figure 2 | Antibiotic resistance and biofilm production in sediment isolates. Antibiotic resistance and biofilm formation assays from 125 sediment isolates, where each line represents one isolate. Each box, from left to right, represents the taxonomic affiliation of all the isolates and its corresponding antibiotic resistance and biofilm formation ability, respectively. The antibiotics tested were carbenicillin (Car), kanamycin (Kan), tetracycline (Tet), streptomycin (Str) and gentamycin (Gen).

Capítulo 3. Análisis genómico de aislados obtenidos de un experimento de enriquecimiento *in situ*.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la disponibilidad de datos de secuencias biológicas se ha visto incrementada en varios órdenes de magnitud, y la capacidad para obtener la secuencia de genomas completos está cada día más al alcance de un mayor número de estudios (Bergman, 2007). Las técnicas para el análisis de dichas secuencias han sufrido así mismo una rápida evolución. Sin embargo, las técnicas para el análisis de múltiples genomas, es decir la genómica comparada, sigue aún en refinamiento (Hardison, 2003). Sin lugar a dudas, la actual secuenciación de un gran número de genomas tanto procariontes como eucariontes, proporciona una gran oportunidad para estudiar la evolución de especies individuales, diferencias y similitudes entre varias especies, así como características funcionales que pueden estar bajo diferentes regímenes de selección en la evolución de los organismos cuyos genomas han sido secuenciados (Koonin et al., 2000).

La genómica comparada está basada en el principio de que características comunes entre dos organismos, generalmente van a ser codificadas por una secuencia de DNA conservada, desde un ancestro común, entre las especies. De la misma manera, las secuencias de DNA que controlan la expresión de genes que son regulados de manera similar en dos especies relacionadas deben estar conservados, mientras que las secuencias que codifican o controlan la expresión de las proteínas responsables de las diferencias entre las especies serán divergentes (Hardison, 2003). El alineamiento de secuencias de DNA es un requisito fundamental en la genómica comparada. En la mayoría de los casos, posterior al alineamiento, sigue un análisis en el nivel de conservación de la secuencia y la búsqueda de señales de conservación o selección para una función genómica particular. Es por esto que analizar genomas en el contexto de otros (i.e. filogenéticamente relacionados) es sustancialmente más eficiente que analizar cada genoma por separado (Koonin et al., 2000; Hardison, 2003). Cuando genomas cercanos son comparados, los genes homólogos pueden ser identificados más fácilmente debido a su alta similitud en secuencia, mientras que aquellos marcos de lectura abiertos (ORFs) que no presenten un

homólogo en una de las secuencias pueden sugerir particularidades de dicho genoma. Este análisis puede a su vez ser más poderoso al incluir otros elementos como la sintenia o conservación en el orden de los genes. Si bien cada genoma presenta particularidades propias de su evolución, van a poder encontrarse regiones conservadas en lo que a su orden respecta, en aquellos genomas relacionados. Un par de genes homólogos por regla general no van a presentar una secuencia nucleotídica idéntica, esto debido a que cada uno de éstos va a sufrir cambios aleatorios por mutación, sin embargo las secuencias serán similares porque dichos cambios recaerán sobre una misma secuencia ancestral. La base de este tipo de análisis es que si la secuencia de un nuevo gen es similar a una previamente reportada, la relación evolutiva y su función pueden ser inferidas (Brown, 2007).

El sistema de flujo Churince dentro del valle de Cuatro Ciénegas ha sido caracterizado en su diversidad microbiológica principalmente mediante la secuenciación del gen 16S rRNA, encontrándose una alta diversidad de Firmicutes y Proteobacteria (Escalante et al., 2008; Cerritos et al., 2011; Rodríguez-Verdugo et al., 2012; Pérez-Gutiérrez et al., 2013; Aguirre-von-Wobeser et al., 2014; Avitia et al., 2014; Rebollar et al., 2014; Ponce-Soto et al., 2015). Dentro de la clase Gamma-Proteobacteria, los géneros *Pseudomonas* y *Aeromonas* son géneros cultivables que han sido encontrados consistentemente a lo largo del tiempo, lo cual nos indica su alta capacidad de distribución y adaptación para este ecosistema, además que ambos han sido reportados como géneros comúnmente presentes en sistemas acuáticos con una alta riqueza y diversidad (Munguía-Fragozo, et al., 2015). A pesar de esto el género *Aeromonas* no ha sido estudiado en el valle de Cuatro Ciénegas, y mucho menos se cuenta con un análisis a nivel genómico de éste. Por considerar estos dos géneros, *Pseudomonas* y *Aeromonas*, como indicadores del estado del ecosistema, y como el primer paso para la secuenciación y análisis de genomas en el Laboratorio de Evolucion Molecular y Experimental, se decidió analizar la secuencia de estos dos géneros en el contexto de un experimento de perturbación ambiental, para buscar de esta manera “pistas”, tales como estrategias de utilización de nutrientes o distintos tipos de interacciones, que nos puedan ayudar a entender las adaptaciones que les permiten a estos géneros ser exitosos en este sistema así como lidiar con los cambios que se dan en su ambiente.

A partir de la descripción y discusión de los efectos de un enriquecimiento con nutrientes en las comunidades bacterianas del valle de Cuatro Ciénegas, se contaba con el antecedente de un cambio en la composición de la comunidad bacteriana posterior al periodo de enriquecimiento, pero sin conocer más allá de los géneros que sufrieron algún cambio en sus abundancias (Ponce-Soto et al., 2015). Otro factor de interés para la secuenciación de estos genomas fue el trabajo realizado por Aguirre-von-Wobeser y colaboradores (2014) en el cual se analizó una matriz de interacciones antagónicas entre aislados de este mismo experimento. En este trabajo se encontró que la comunidad analizada en el sistema Churince es altamente antagónica, además que la red de interacciones está determinada principalmente por la cepa emisora, es decir, las cepas antagonistas son las encargadas de moldear la estructura de la comunidad, lo cual nos sugiere que los mecanismos de antagonismo mediante toxinas o antibióticos se encuentran engranados en la comunidad. Debido a estas interrogantes surgió el interés de realizar un estudio a nivel genómico de aislados de esta comunidad, teniendo como ejes principales: (i) analizar la capacidad metabólica, así como las diferencias en lo que respecta a funciones y contenido génico de los aislados previo al periodo de enriquecimiento y contrastarlo con los diferentes tratamientos analizados; (ii) buscar elementos responsables de la plasticidad de los genomas en los organismos analizados que pudieran estar influyendo en la capacidad de adaptación y respuesta a los cambios ambientales en el sistema Churince y (iii) analizar la presencia de elementos involucrados en la competencia y antagonismo.

Para cumplir estos objetivos se tomaron un total de 7 representantes de dos géneros bacterianos representados en agua del experimento de enriquecimiento del mesocosmos, cuatro *Pseudomonas* y tres *Aeromonas*. Para la elección de las cepas se consideraron dos criterios. El primer criterio fue tener representantes de los dos géneros más abundantes en agua. El segundo criterio considerado fue que el género estuviera representado tanto en tiempo cero como en las muestras posteriores al enriquecimiento, donde esperamos que la selección a nivel comunidad haya favorecido a aquellos genotipos que puedan funcionar mejor bajo las nuevas condiciones de nutrientes. Adicionalmente con fines comparativos se incluyó un aislado de *Pseudomonas* obtenido del sistema Churince en el año 2001.

Mediante el análisis de los genomas secuenciados, esperamos observar posibles adaptaciones relacionadas a la historia natural de nuestro sitio de estudio tales como una alta incidencia de genes asociados a la producción de toxinas y antibióticos, la cual, de acuerdo con la teoría del mercado microbiano, se espera verse reducida posterior al enriquecimiento debido a la eliminación de la ventaja otorgada en la obtención de recursos (Werner et al., 2014). De igual manera en relación a los cambios producidos por el enriquecimiento, esperamos debido al corto periodo del tratamiento, una ligera preferencia o sobrerrepresentación de metabolismos asociados a los tratamientos de los cuales se aislaron las cepas, por ejemplo una mayor presencia de genes asociados al metabolismo de fósforo para las cepas pertenecientes al tratamiento enriquecido con P, esto sin tomar en cuenta el género al cual pertenecen los aislados. Finalmente, al igual que con el genoma reportado de *B. coahuilensis* aislado del mismo sistema Churince (Alcaraz et al., 2008), esperamos encontrar diversas islas genómicas adquiridas por eventos de transferencia horizontal (HGT) que pudieran estar jugando un papel en las adaptaciones de estas cepas a su ambiente.

MÉTODOS

Muestreo

Un experimento de mesocosmos se llevó a cabo de Mayo a Junio del año 2011 en la poza Lagunita dentro del sistema Churince. Cada mesocosmos consistió en un tubo de plástico de aproximadamente 40 cm de diámetro con una profundidad en el sedimento de aproximadamente 20 cm, y 20 cm sobre el nivel superficial del agua. Este mesocosmos estuvo constituido por cuatro tratamientos y cinco réplicas: un tratamiento control denominado C, un tratamiento enriquecido con fósforo denominado P, un tratamiento con nitrógeno y fósforo a una proporción de 16:1 (NP) y un tratamiento enriquecido con nitrógeno y fósforo a una proporción de 75:1 (NNP) (Figura 3.1).

Para cada uno de los tratamientos y réplicas se tomaron muestras de agua y sedimento tanto a tiempo cero (14 de Mayo de 2011; Figura 3.1A) como al finalizar el periodo de

enriquecimiento (4 de Junio de 2011; Figura 3.1B), se seleccionaron los siguientes aislados para su secuenciación y posterior análisis: *Pseudomonas* sp. 1D4, *Pseudomonas* sp. AP19, *Pseudomonas* sp. AP42, *Pseudomonas* sp. ENNP23, *Aeromonas* sp. ANP5, *Aeromonas* sp. DNP9 y *Aeromonas* sp. ANNP30. Adicionalmente la cepa endémica *Pseudomonas cuatrocienezensis*. 21C1 aislada de la laguna de desecación en el sistema Churince en el año 2001 fue incluida para este análisis. Este periodo de tiempo se determinó debido a la naturaleza de la poza analizada, la cual experimenta una fuerte evaporación durante las estaciones de primavera y verano, reduciendo el nivel de la columna de agua de un promedio de 26 cm a 20 cm para el día 21 (Lee et al., 2015).

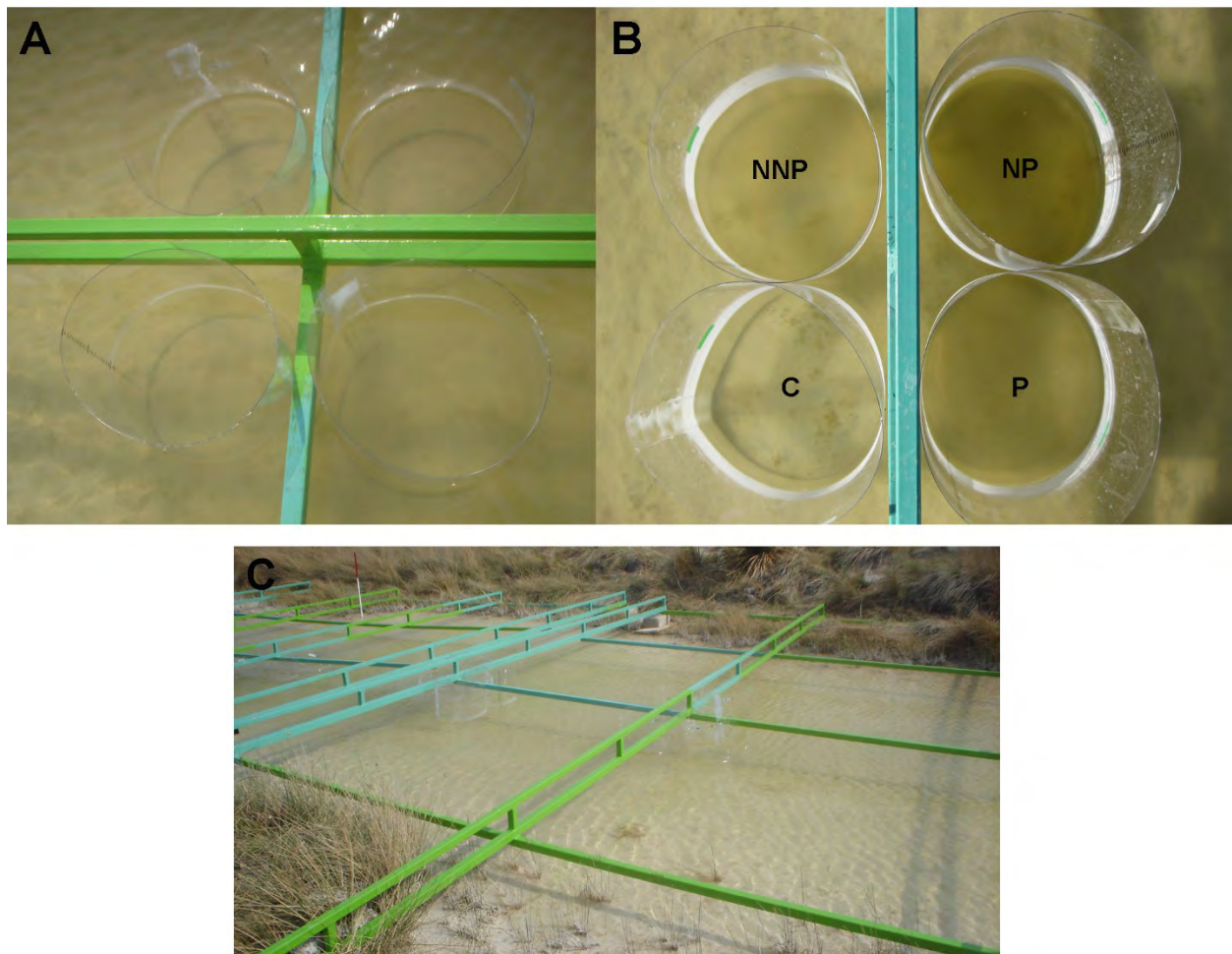


Figura 3.1. Diseño experimental del enriquecimiento del mesocosmos. (A) Fotografía de una réplica previa al inicio del enriquecimiento. Mayo 2011 (B) Fotografía de una réplica al finalizar el periodo de enriquecimiento. (C) Distribución de las diferentes réplicas en la poza Lagunita.

Corte genómico con *I-CeuI* y electroforesis de campos pulsados.

La endonucleasa de restricción *I-CeuI* reconoce una secuencia de 26 pb de las posiciones 1911-1936 del gen 23S rRNA, con el número de fragmentos resultantes representando el número de operones *rrn*. Una electroforesis de campos pulsados (PFGE) fue empleada para reconstruir el perfil de *rrn* del cromosoma para los siguientes aislados del experimento de mesocosmos: *Pseudomonas* sp. 1D4, *Pseudomonas* sp.3D8, *Pseudomonas* sp.AP10, *Pseudomonas* sp.AP42, *Pseudomonas* sp.1C9, *Pseudomonas* sp.AP19, *Rheinheimera* sp. 2A4, *Aeromonas* sp. 1B8, *Aeromonas* sp. ANNP30 y *Citrobacter* sp. 3E3. Los DNA genómicos de *Salmonella entérica* serovar Typhimurium LT2 y *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 fueron usados como marcadores de peso molecular. Los bloques de DNA genómico y la PFGE se llevaron a cabo bajo las condiciones previamente descritas (Morales-Espinisa, et al., 2012).

Secuenciación de genomas.

El DNA genómico para todas las cepas se extrajo a partir de un cultivo *overnight* mediante el kit de extracción DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Hilden, Alemania). El DNA purificado fue enviado al Instituto J. Craig Venter (JCVI) para la preparación de librerías y posterior secuenciación. La secuenciación del genoma completo para cada una de las cepas se llevó a cabo mediante la técnica de *paired end* en un secuenciador MiSeq de Illumina con un tamaño de inserto de 250 bases. Aproximadamente 9.9 Gpb de secuencias fueron obtenidas de un total de 15,173,210 lecturas. La cobertura estimada para los genomas fue de entre 21.87X y 63.12X.

Ensamble *de novo*, predicción de genes y anotación.

La calidad de cada una de las lecturas fue analizada mediante el programa FASTQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), descartando aquellas secuencias de baja calidad. Posterior al corte de calidad, se buscaron y removieron los adaptadores en las secuencias mediante el programa TagCleaner (Schmieder et al., 2010). Este proceso se llevó a

cabo debido a la metodología de secuenciación, pues en ésta varias cepas fueron secuenciadas de manera simultánea, siendo marcadas cada una de ellas con un identificador único.

El ensamble *de novo* para cada uno de los genomas se llevó a cabo con el programa Newbler en su versión 2.9 (Roche) posterior a la comparación con los ensambladores Velvet (Zerbino and Birney, 2008) y Mira (Chevreux et al., 2000). Los *contigs* generados fueron procesados con SSPACE e IMAGE (Tsai et al., 2010) para reducir el número de gaps. DeconSeq (Schmieder and Edwards, 2011) se utilizó para la identificación y eliminación de secuencias contaminantes en los ensambles de los genomas. La evaluación final del ensamble se llevó a cabo con el programa REAPR (Hunt et al., 2013). Posteriormente, cada una de las cepas fue anotada funcionalmente usando el *pipeline* de Prokka (Seemann, 2014) con la base de datos Pfam (Finn et al., 2014). Adicionalmente cada genoma fue así mismo anotado usando el servidor RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology; Overbeek et al., 2014). La opción de *Classic RAST* fue seleccionada como el esquema de anotación, mientras que *RAST gene caller* (FIGfam *release 70*) fue utilizado como identificador de genes. El programa Artemis fue empleado para visualizar las secuencias anotadas y para la edición manual de éstas (Rutherford et al., 2000).

A partir de la anotación funcional revisada, se llevó a cabo la predicción de las vías metabólicas para cada una de las cepas secuenciadas mediante el uso del servidor KAAS (KEGG *Automatic Annotation Server*; Moriya et al., 2007).

Las islas genómicas (GI) y de patogenicidad (PAI) para cada uno de los genomas analizados, fueron predichas mediante el servidor IslandViewer 3 (Dhillon et al., 2015). El cromosoma de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 fue empleado como el genoma de referencia para la identificación de islas genómicas para los aislados 1D4, 21C1 y ENNP23. El cromosoma de *Pseudomonas fluorescens* SBW25 se utilizó como el genoma de referencia para la identificación de las islas genómicas de los aislados AP19 y AP42. En lo que respecta a los aislados ANP5, DNP9 y ANNP30, el cromosoma de *Aeromonas veronii* B565 sirvió como el genoma de referencia.

La predicción de las secuencias de profagos se llevó a cabo con el programa PHAST (Phage Search Tool). La predicción de secuencias de profagos se llevó a cabo mediante la comparación contra dos bases de datos; la primera es la base de datos de fagos del NCBI, la cual incluye aproximadamente 46,000 proteínas de 600 genomas de fago. La segunda base de datos incluye poco más de 9,000 proteínas provenientes de 159 regiones de profagos que no se encuentran representadas en la base de datos del NCBI (Zhuo et al., 2011). Los denominados CRISPRs (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) fueron predichos a través de CRISPRFinder (Grissa et al., 2007). El diagrama de la metodología empleada para el análisis de los genomas se puede encontrar en la Figura 3.2.

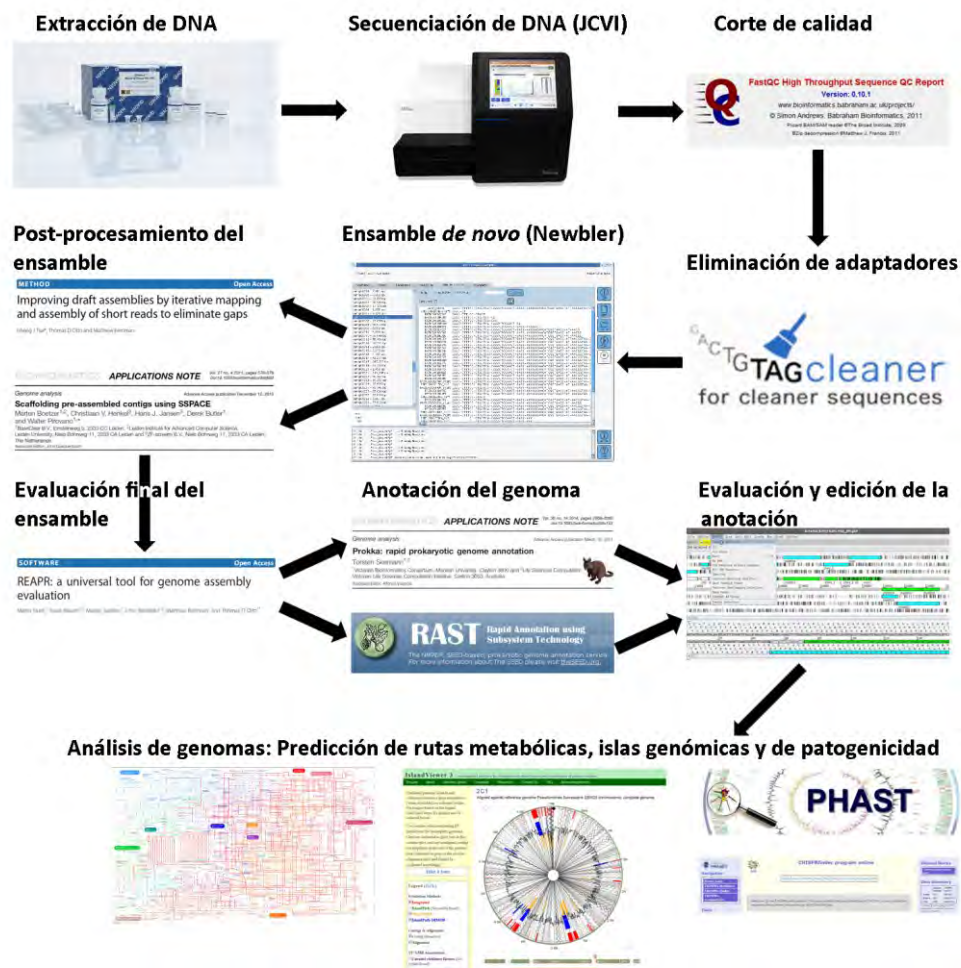


Figura 3.2. Representación esquemática del *pipeline* empleado para el análisis de los genomas.

Comparación de genomas.

Los genomas secuenciados fueron alineados de manera pareada entre representantes clasificados dentro del mismo género, es decir *Pseudomonas* vs. *Pseudomonas* y *Aeromonas* vs. *Aeromonas*, mediante el programa NUCmer de la paquetería MUMmer 3.0 (Kurtz et al., 2004). NUCmer es un script para el alineamiento de secuencias de DNA, el cual consta de tres pasos. En su primera etapa, NUCmer realiza una búsqueda de motivos compartidos entre ambas secuencias, para posteriormente agrupar las secuencias en grupos. En su paso final, las secuencias no idénticas son alineadas con el genoma referencia y los grupos generados en el segundo paso son extendidos para incrementar la cobertura del alineamiento.

Posterior a este análisis los 8 genomas secuenciados, tres secuencias de referencia, *P. fluorescens* SBW25, *P. aeruginosa* PAO1 y *A. veronii* B565, así como el grupo externo *E. coli* K12 fueron alineados mediante el programa Mugsy (Angiuoli and Salzberg, 2011). El programa Mugsy al igual que MUMmer, es un alineador para genomas completos, sin embargo éste permite el alineamiento de múltiples genomas. El alineamiento generado por Mugsy fue convertido a formato fasta mediante la plataforma Galaxy (Blankenberg et al., 2007; Taylor et al., 2007), para posteriormente realizar una reconstrucción filogenética mediante el programa FastTree v.2.1.8 (Price et al., 2010).

Análisis comparativo funcional entre genomas de diferentes tratamientos de enriquecimiento.

A partir de la anotación realizada por RAST, se utilizó la base de datos de SEED Subsystems con un e-value de $1e-5$ y una identidad mínima de 60% para determinar la asignación funcional. El programa STAMP v.2.1.3 (Parks et al., 2014) fue usado para calcular las abundancias relativas y realizar un *clustering* jerárquico mediante el método de UPGMA. Las diferencias en la abundancia de grupos funcionales entre los distintos tratamientos fueron evaluadas mediante una prueba de ANOVA y un test *post-hoc* de Tukey-Kramer en el programa STAMP. De igual manera, el programa STAMP se empleó para determinar diferencias estadísticamente significativas en las características funcionales de los genomas. Esta comparación se realizó con una prueba de Welch a un intervalo de confianza del 95%,

comparando cada uno de los cuatro tratamientos (T0, P, NP y NNP) contra los tres tratamientos restantes. Para el tratamiento NNP no se encontró ninguna función significativamente diferente al comparar contra el resto de los tratamientos. Las funciones diferentes para los tratamientos T0, P y NP se pueden observar en la Figura suplementaria 3.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A pesar de que la comunidad microbiana en el sistema Churince dentro del valle de Cuatro Ciénegas ha sido ampliamente estudiada en los últimos años (Escalante et al., 2008; Cerritos et al., 2011; Rodríguez-Verdugo et al., 2012; Pérez-Gutiérrez et al., 2013; Aguirre-von-Wobeser et al., 2014; Avitia et al., 2014; Rebollar et al., 2014; Ponce-Soto et al., 2015), poco se sabe sobre su composición a nivel genómico, y mucho menos aún sobre los cambios en los genomas en respuesta a perturbaciones ambientales. Por este motivo y para conocer las estrategias de una parte de la comunidad microbiana en el valle para lidiar con los cambios en su ambiente, se secuenciaron y analizaron 8 cepas provenientes del valle de Cuatro Ciénegas pertenecientes a dos géneros, *Pseudomonas* y *Aeromonas*.

Variabilidad en el número de copias del operón *rrn*.

El número de copias del operón *rrn* fue determinado para cada aislado como se describió previamente. Las cepas presentaron un número variable de copias del operón *rrn* que osciló entre 3 y 5 para el género *Pseudomonas*, 4 en *Rheinheimera*, 8 en *Aeromonas* y 9 para el género *Citrobacter* (Figura 3.3). Si bien estos números no se recuperarán al momento de ensamblar los genomas debido a que los algoritmos empleados colapsan todas las copias en un solo operón, éstos nos dan una idea del tamaño aproximado de cada uno de los genomas analizados.

Características genómicas generales de las cepas secuenciadas

Para identificar los posibles cambios a nivel genoma en las cepas de los diferentes tratamientos, el primer paso fue analizar y contrastar las diferencias en el contenido génico y funciones de los aislados antes y después del enriquecimiento. El análisis genómico de los

aislados, mostró en contraste con lo reportado para el genoma de *B. coahuilensis* (Alcaraz et al., 2008), un tamaño y número de regiones codificantes cercanos a lo reportado previamente en las bases de datos para representantes cercanos a su grupo filogenético, a excepción del aislado 21C1 correspondiente al género *Pseudomonas* y descrito como especie nueva (*P. cuatrocienuensis*) al ser aislado en el sistema Churince en el año 2001, antes de las perturbaciones antropogénicas del acuífero. El tamaño de los genomas secuenciados fue de entre 4,668,319 y 4,787,191 pb para las cepas correspondientes al género *Aeromonas*, mientras que para el género *Pseudomonas* el tamaño de los genomas osciló entre 5,353,371 y 7,404,273 pb (Tabla 3.1). Esta observación sugiere que a diferencia de la cepa endémica de *Bacillus coahuilensis*, los géneros *Pseudomonas* y *Aeromonas* han desarrollado una estrategia diferente a la reducción en su tamaño de genoma para lidiar con su ambiente oligotrófico.

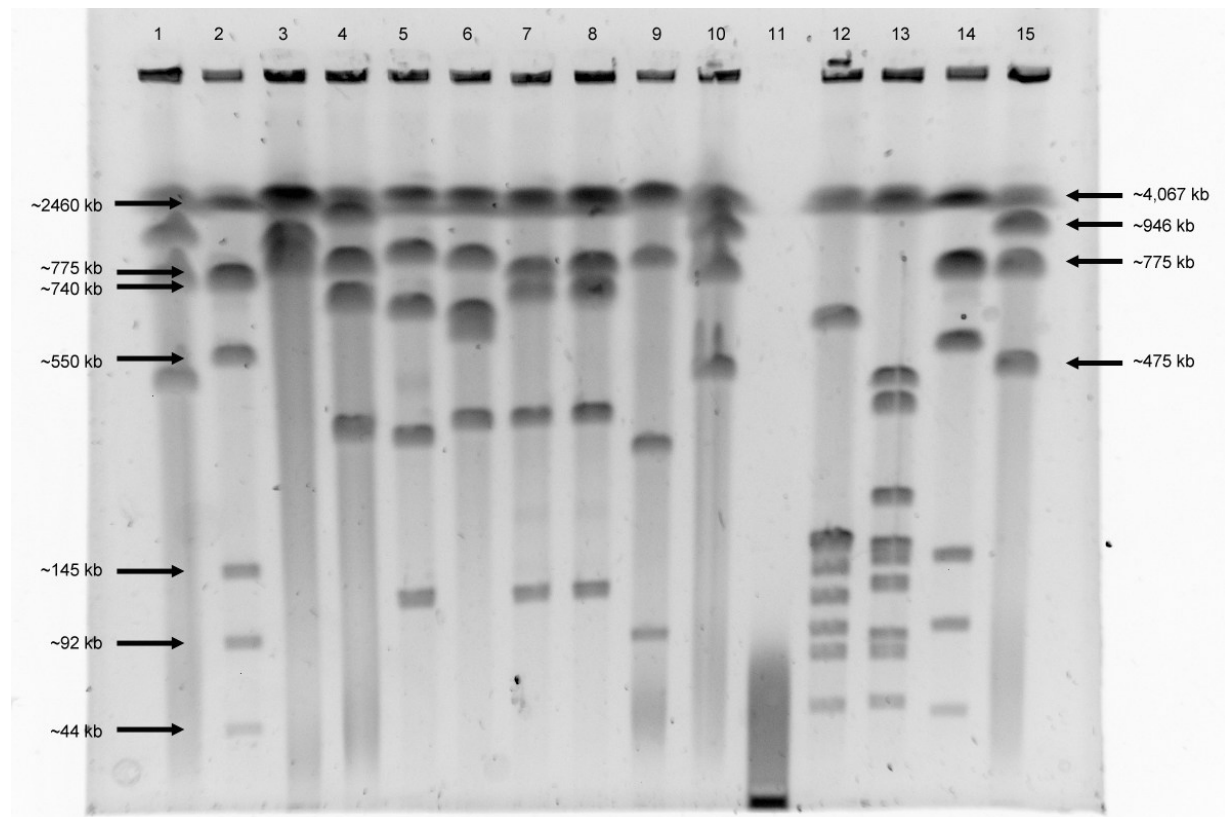


Figura 3.3. Perfil de bandeo con la endonucleasa *I-CeuI* para las cepas: (1) *P. aeruginosa* PAO1, (2) *Salmonella typhimurium* LT2, (3) *Pseudomonas* sp. 1D4, (4) *Pseudomonas* sp. 3D8, (5) *Pseudomonas* sp. AP10, (6) *Pseudomonas* sp. AP42, (7) *Pseudomonas* sp. 1C9, (8) *Pseudomonas* sp. AP19, (9) *Rheinheimera* sp. 2A4, (10) *P. aeruginosa* PAO1, (11) *Aeromonas* sp. 1B8, (12) *Aeromonas* sp. ANNP30, (13) *Citrobacter* sp. 3E3, (14) *S. typhimurium* LT2, (15) *P. aeruginosa* PAO1.

Tabla 3.1. Características de los ensamblados

Cepa		Contigs	N50	Longitud mínima	Longitud máxima	Tamaño total (pb)
<i>Aeromonas sp.</i>	ANNP30	106	88,649	542	269,970	4,787,191
	ANP5	95	94,655	501	276,626	4,786,221
	DNP9	76	138,714	511	247,207	4,668,319
<i>Pseudomonas sp.</i>	1D4	139	86,608	520	252,034	5,877,163
	21C1	111	115,047	529	422,636	5,353,371
	AP19	159	104,901	533	438,645	7,404,273
	AP42	228	49,127	512	206,439	6,774,519
	ENNP23	126	101,504	504	288,619	5,777,558

Posterior al ensamblado, revisión y edición de los genomas, éstos fueron anotados funcionalmente tanto de manera automatizada mediante el servidor RAST (Overbeek et al., 2014), como de manera local a través de Prokka (Seemann, 2014). Para los genomas de *Aeromonas*, un promedio de 4300 secuencias codificantes fueron predichas, mientras que para el caso de *Pseudomonas* éste número varió de entre 4783 hasta 6871 secuencias codificantes. En lo respectivo al contenido de GC, para *Aeromonas* se encontró alrededor de 58%, mientras que para el caso de *Pseudomonas* se encontraron dos grupos, uno con un contenido de GC de 60% y un segundo grupo en 66%. El contenido de GC para los genomas referencia *A. veronii* B565, *P. fluorescens* SBW25 y *P. aeruginosa* PAO1 ha sido reportado de 58.6%, 60.5% y 66.6% respectivamente. A partir de éstas características se definieron grupos para los genomas de *Pseudomonas*: 1D4 y ENNP23 pertenecientes al clado de *P. aeruginosa* y AP19 y AP42 pertenecientes al clado de *P. fluorescens*. El aislado 21C1 presentó un contenido GC distinto a estos dos grupos y a las cepas referencia, sugiriendo que ésta podría pertenecer a un clado distinto a los clados analizados. El resumen de las estadísticas para estos ensamblados y sus anotaciones se presentan en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Estadísticas de los ensamblajes y sus anotaciones. CDS – Secuencia codificadora

Cepa		Longitud total	% GC	CDSs
<i>Aeromonas sp.</i>	ANNP30	4,787,191	58.3	4,361
	ANP5	4,786,221	58.3	4,332
	DNP9	4,668,319	58.5	4,318
<i>Pseudomonas sp.</i>	1D4	5,877,163	66.3	5,352
	21C1	5,353,371	61.9	4,783
	AP19	7,404,273	59.4	6,871
	AP42	6,774,519	59.8	6,111
	ENNP23	5,777,558	66.3	5,344

Identificación y análisis de profagos.

Los virus son la “forma de vida” más abundante en los sistemas acuáticos, debido a esto se ha propuesto que juegan un papel significativo en el flujo de materia y energía en la cadena alimenticia de estos sistemas (Jiang and Paul, 1998; Jiang and Paul, 1998 (2); Weinbauer and Rassoulzadegan, 2004; Lang et al., 2012), sin embargo también se ha encontrado que pueden afectar la composición de la comunidad microbiana por ejemplo al atacar primordialmente a la especie dominante en un hábitat determinado o al transferir genes entre especies (Jiang and Paul, 1998; Weinbauer and Rassoulzadegan 2004; Moon et al, 2016). Recientemente gracias al uso de herramientas metagenómicas se ha permitido realizar análisis ambientales para conocer no sólo la diversidad de especies que se pueden encontrar en un ambiente determinado, sino también la abundancia de funciones (Rusch et al., 2007; Allen et al., 2009; Belda-Ferre, et al., 2011; Bonilla-Rosso et al., 2012; Gajer et al., 2012; Peimbert et al., 2012; Dorador et al., 2013). A pesar de que la gran mayoría de estos estudios están enfocados en microorganismos, también se han realizado algunos estudios con el objetivo de conocer la diversidad y funciones presentes en

los virus (Fancello et al., 2011; Modi et al., 2013; Pérez-Brocal et al., 2013; Hurwitz et al., 2015; Subirats et al., 2016). Una de las más importantes conclusiones que se han obtenido del análisis de metagenomas de virus, es que éstos actúan como reservas de genes adaptativos y que pueden potencialmente ser adquiridos posteriormente por la comunidad microbiana mediante eventos de transferencia horizontal (Fancello et al., 2011; Modi et al., 2013; Subirats et al., 2016). Esta importancia como repositorios de información de genes adaptativos, nos brindará mediante su análisis una perspectiva en la relevancia de estos elementos en la dinámica del valle de Cuatro Ciénegas.

PHAST (Phage Search Tool) es un servidor web diseñado para la identificación de secuencias de profagos dentro de genomas bacterianos mediante la comparación con diversas bases de datos (Zhuo et al., 2011). El número de profagos predichos varió entre las distintas cepas secuenciadas. Nuestro análisis encontró que las cepas de *Pseudomonas* pertenecientes al clado de *P. aeruginosa* presentan entre 1 y 3 profagos intactos, mientras que las del clado *P. fluorescens* presentan entre 4 y 5 (Tabla 3.3; Figura 3.4). En lo que respecta a las cepas de *Aeromonas*, sólo en la cepa ANP5 se predijo un profago intacto (Tabla 3.3; Figura 3.5). En conjunto un total de 10 distintos bacteriófagos fueron encontrados, todos ellos asociados a Gamma-Proteobacteria.

Al llevar a cabo un análisis de las proteínas presentes en los profagos identificados, la gran mayoría fueron caracterizadas como proteínas hipotéticas, así como proteínas de formación de la cápside, del portal de fago y transposasas. Entre las proteínas caracterizadas que no se encontraron en todos los profagos están proteasas, proteínas de la fibra de la cola involucradas en la adsorción a la superficie celular y la penetración en la célula (Scholl et al., 2001) así como la proteína NinG involucrada en la recombinación (Tarkowski et al., 2002). Solamente un profago presente en el genoma de la cepa *Pseudomonas sp.* AP19 presentó una proteína asociada a la quimiotaxis así como a la familia proteica DprA involucrada en la transformación natural de las bacterias. En el caso de los profagos presentes en *Pseudomonas sp.* 1D4 se identificaron las proteínas TraR asociada a la transferencia conjugativa, la proteína rdgC involucrada en la recombinación, así como HicA que es el módulo de toxicidad del sistema toxina-antitoxina *hicAB*, el cual se ha reportado que participa en el arresto del crecimiento (Jørgensen et al. 2009).

Para la cepa *Pseudomonas cuatrocieneensis*. 21C1 se identificó en el profago predicho una adenina metiltransferasa (DAM); estas enzimas han sido reportadas como reguladoras de la expresión de genes y determinantes en la virulencia al alterar mediante la metilación del DNA, el tiempo y nivel de expresión de los genes (Jones and Takai, 2001; Bochow et al. 2012). Otra función que ha sido asociada a la adenina metiltransferasa es el incremento en la tasa de mutación al prevenir la unión de *MutH*, siendo esto causado principalmente en casos de una sobreproducción de DAM codificada por fagos, lo cual puede verse reflejado en una mayor tasa de adaptación en ambientes cambiantes (Bochow et al. 2012); esto es muy interesante ya que esta cepa endémica nos puede dar pistas sobre las adaptaciones “originales” a este ecosistema. Finalmente en lo que respecta a los profagos presentes en el genoma de la cepa *Pseudomonas* sp. ENNP23, en el profago predicho de mayor tamaño, 82.4 Kpb, se identificaron dos elementos asociados al sistema de secreción tipo VI (SST6), el elemento Rhs de la proteína Vgr y el gen ImpA. El SST6 es un sistema de secreción descrito en el año 2006, y que hasta este momento se ha encontrado únicamente en Proteobacteria tanto en cepas patogénicas como no patogénicas (Mougous et al., 2006; Pukatzki et al., 2006; Boyer et al., 2009), sin embargo la función de este sistema y de las proteínas Vgr, componentes de este sistema, aún es especulativa. En este mismo aislado ENNP23 fue identificado también una glutatión S-transferasa; esta familia de enzimas se encuentra presentes tanto en eucariontes como en procariontes y está involucrada con el crecimiento en compuestos químicos recalcitrantes así como la degradación de compuestos aromáticos (Vuilleumier and Pagni 2002). Al comparar el número de elementos génicos presentes en los fagos que no fueron clasificados como proteínas hipotéticas y a los cuales se les pudo asignar una función distinta a la de elementos propios de fagos, encontramos una baja representación de elementos adaptativos, esto nos sugiere que los profagos en la comunidad muestreada no juegan un papel primordial en la transferencia horizontal de genes en los grupos analizados, sin embargo hay que tomar en consideración el número reducido de muestras analizadas lo cual podría sesgar esta observación.

Al realizar una predicción en este servidor para los genomas de *P. fluorescens* SBW25, *P. aeruginosa* PA7 y *A. veronii* B565 se predijeron 2 profagos intactos para *P. fluorescens* SBW25, 4 para *P. aeruginosa* PA7 y 4 profagos intactos en *A. veronii* B565; a partir de esta

predicción se encontró que los genomas analizados presentan en general un menor número de profagos integrados en los genomas, a excepción de los representantes del clado *P. fluorescens*.

Identificación y análisis de CRISPRs.

De manera complementaria se realizó la predicción de regiones CRISPRs. Los CRISPRs (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) son pequeñas secuencias derivadas de fagos separadas por una serie de secuencias repetidas, y las cuales se han propuesto que confieren resistencia al huésped contra dichos fagos así como contra otros elementos foráneos como plásmidos. Esta inmunidad se da mediante la transcripción de los espaciadores y secuencias repetidas presentes en la región CRISPR en un transcrito CRISPR, el pre-crRNA. Este pre-crRNA posteriormente es procesado en pequeñas moléculas de RNA específicas que corresponden a los espaciadores flanqueados por las secuencias repetidas (crRNA), las cuales son empleadas posteriormente como guía para el complejo Cas para interferir e inactivar los ácidos nucleicos invasores (Horvath et al., 2010). Al igual que la predicción de fagos, la identificación de éstas regiones, nos brindan una ventana para entender mejor el papel no solo de los virus, si no también de otros elementos móviles en las comunidades microbianas del Cuatro Ciénegas. CRISPRFinder (Grissa et al., 2007) se basa para la identificación en la comparación contra una base de datos conformada por 2762 genomas y 4065 secuencias CRISPRs caracterizados tanto en Bacteria como en Archaea. De manera interesante, sólo los genomas de *Aeromonas* sp. DNP9 y *Pseudomonas* sp. AP19, AP42 y ENNP23 presentaron secuencias CRISPRs confirmadas, con un número de espaciadores variable entre 3 y 20 para *Pseudomonas* y entre 18 y 42 para *Aeromonas*. En el género *Aeromonas* se identificaron un total de 60 secuencias espaciadoras (Tabla Suplementaria 1) entretanto que para *Pseudomonas* se identificaron 38 secuencias espaciadoras (Tabla Suplementaria 2), de las cuáles sólo dos estuvieron compartidas entre los aislados AP19 y AP42, ambas pertenecientes al clado de *Pseudomonas fluorescens*. En lo que respecta a los genomas de *Pseudomonas* de tiempo cero o los aislados de *Aeromonas* ANP5 y ANNP30 no se identificó ninguna secuencia CRISPR (Tabla 3.3). Es importante resaltar que en ninguna de las cepas referencia se encontró una región CRISPR. Al analizar las secuencias espaciadoras de los CRISPRs se encontró que prácticamente cada cepa analizada presenta secuencias únicas, lo que nos indica que aún dentro de cepas

pertenecientes al mismo clado, cada una tiene una historia evolutiva independiente con una presión por parte de los fagos única entre sí.

Esto es notable ya que recientemente se ha propuesto una correlación negativa entre la presencia de regiones CRISPR y sus repeticiones con la presencia de elementos de transferencia horizontal y factores de virulencia (García-Gutiérrez et al., 2015, Sheludchenki et al., 2015). Dicha relación se observó al realizar una predicción de éstas regiones para *P. aeruginosa* PAO1, *P. fluorescens* SBW25 y *A. veronii* B565, cepas aisladas de ambientes clínicos o como patógenos de sus huéspedes (Stover et al., 2000; Li et al., 2011) y, como se mencionó anteriormente, en ninguno de éstos se encontró una región CRISPR. Los autores proponen que esto podría deberse a que los espaciadores de los CRISPR están actuando como una barrera contra los elementos de inserción al ser reconocidos como elementos ajenos al genoma. Al comparar las cepas de *Aeromonas* y del clado de *P. aeruginosa* en las cuales se identificaron regiones CRISPR contra aquellas en las que no fueron identificadas, se encontró que en las cepas sin CRISPR el porcentaje del genoma que está más representado por elementos de inserción, lo cual es congruente con lo reportado previamente (García-Gutiérrez et al., 2015). El hecho de que no se hayan encontrado regiones CRISPR en los genomas de las cepas previas al enriquecimiento puede sugerir que en este ambiente no perturbado, el permitir la entrada de información mediante eventos de transferencia horizontal tiene un impacto positivo en la diversidad al menos de las especies analizadas, lo cual debe considerarse desde un punto de vista evolutivo, además de sugerir que la entrada de nutrientes no influye de gran manera en la presencia de este tipo de elementos.

Identificación y análisis de islas genómicas y/o patogénicas.

La presencia de elementos móviles en los genomas ha sido de gran interés en los últimos años, pues se ha observado que juegan un papel en la evolución de los microorganismos al codificar genes involucrados en la adaptación a su ambiente, o ser portadores de factores de virulencia y resistencia (Dobrindt et al., 2004; Dhillon et al., 2015). Los elementos móviles pueden ser caracterizados por su contenido génico en dos tipos, islas genómicas (GI) o de patogenicidad (PAI). Tanto las GIs como las PAIs pueden ser identificadas debido a su

contenido de GC y uso de codones, pues al haber sido incorporadas al genoma por medio de eventos de transferencia horizontal, éstos van a diferir del uso en el resto del genoma. La principal diferencia entre estos dos elementos radica en que las islas genómicas contienen clusters de genes funcionalmente relacionados y que pueden favorecer la adaptación a su entorno (Lu and Leong, 2016), mientras que las islas de patogenicidad codifican factores asociados a virulencia (Fox et al., 2011).

IslandViewer 3 (<http://pathogenomics.sfu.ca/islandviewer>) es un recurso *on line* para la predicción y análisis de islas genómicas (GIs) e islas de patogenicidad (PAIs) que pueden ser introducidos por eventos de transferencia horizontal (HGT) en genomas bacterianos y de archaeas (Dhillon et al., 2015). Los resultados obtenidos por IslandViewer 3 sugieren que el porcentaje del genoma que es producto de eventos de transferencia horizontal va de 1.20% a 16.01% para los aislados de *Pseudomonas*, mientras que las predicciones de GIs y PAIs en *Aeromonas* variaron de 7.10% a 10.09% del genoma; este porcentaje del genoma corresponde a los resultados integrados de los tres métodos predictivos implementados por IslandViewer 3: IslandPick (Langille et al., 2008) cuya identificación se basa en la comparación con genomas secuenciados, IslandPath-DIMOB (Langille et al., 2008) que identifica GIs basándose en la composición anormal de las secuencias o por la presencia de genes relacionados a elementos móviles y SIGI-HMM (Waack et al., 2006) que emplea cadenas ocultas de Markov y el uso de codones para identificar las posibles GIs. Las cepas del género *Aeromonas* presentaron entre 30 y 47 islas genómicas. En lo que respecta a las cepas de *Pseudomonas*, las islas genómicas predichas fueron de 6 a 86. De estas predicciones es importante resaltar así mismo, que ni al comparar contra la VFDB (Virulence factor of pathogenic bacteria) ni ARDB (Chen et al., 2012; Tabla 3.3), se identificó ninguna isla de patogenicidad relacionada con cuadros clínicos, donde las islas contienen genes involucrados en un papel ofensivo tales como la producción de toxinas, sistemas de secreción tipo III y IV, así como genes para la adhesión e invasión a los tejidos de sus hospederos (Brogden et al., 2000; Dobrindt et al., 2004; Chen et al., 2012; Dhillon et al., 2015), en contraste con las predicciones de las cepas referencia *P. aeruginosa* PAO1, *P. fluorescens* SBW25 y *A. veronii* B565 para las cuales fueron predichas islas asociadas a virulencia, resistencia y patogenicidad.

Previamente se ha reportado que en las islas genómicas pueden encontrarse genes asociados a adaptaciones para nichos específicos como por ejemplo la fijación de nitrógeno en *Rhizobiaceae*, sin embargo a pesar de que algunos de los genes predichos en las islas observadas están asociados a funciones conocidas, las GIs presentan un alto número de genes de funciones no identificadas (Stuart et al., 2013). En este análisis encontramos en las GIs predichas tanto genes hipotéticos como genes de función conocida, tal como la familia transcripcional LysR que regula genes involucrados en virulencia, metabolismo, *quorum sensing* y motilidad, así como genes asociados con el fenotipo observado como es el caso de transportadores de antibióticos (Ponce-Soto et al., 2015), o genes que se esperan en aguas fósiles como son los transportadores de metales: cadmio y zinc, entre otros. Al comparar el número de GIs y PAIs así como la proporción del genoma que éstas representan en los genomas referencia contra los genomas analizados, se encontró en las cepas de *Aeromonas* una menor representación de elementos móviles (Tabla 3.3), en contraste con el 10.33% del genoma de *A. veronii* B565 identificado. En el caso de *Pseudomonas*, para la referencia *P. fluorescens* SBW25 el 12.03% del genoma está conformado por GIs y PAIs, este porcentaje del genoma es mayor que el presentado por la cepa *Pseudomonas* sp. AP42, pero menor que el de la *Pseudomonas* sp. AP19 (Tabla 3.3) Finalmente en lo que respecta al clado de *P. aeruginosa*, sólo el aislado *Pseudomonas* sp. ENNP23 presentó una abundancia de estos elementos menor que el genoma de la cepa referencia *P. aeruginosa* PAO1, en la cual representan el 3.44% del genoma. Estos datos sugieren una estrategia diferenciada entre los géneros analizados, en la cual el género *Pseudomonas* es más propenso a recibir y mantener en su genoma elementos provenientes de eventos de transferencia horizontal, siendo en particular el clado de *P. fluorescens* el que presenta una mayor facilidad de retenerlos, lo cual va de la mano con la estrategia generalista con la cual ha sido descrito este género (Kniskern et al., 2011; Gross et al., 2013; Igbinsola and Igbinsola, 2015). En este mismo análisis se encontró que todas las cepas referencia presentan elementos identificados en islas de patogenicidad y virulencia en contraste con los genomas analizados del Churince para los cuales no fue predicha ninguna isla de este tipo, lo cual consideramos coherente con la historia natural del sitio, pues éste ha permanecido aislado por miles de años.

Tabla 3.3. Predicciones del número de profagos, PAIs y CRISPRs, así como del porcentaje correspondiente al total del tamaño del genoma de GIs. PAI – Islas de patogenicidad. GI – Islas genómicas.

Cepa		Profagos	GI (No./%)	PAI	CRISPR
		(Intacto/Incompleto)			(Confirmado/Putativo)
<i>Aeromonas sp.</i>	ANNP30	0 / 3	39 / 8.19	0	0 / 3
	ANP5	1 / 2	47 / 10.09	0	0 / 5
	DNP9	0 / 4	30 / 7.10	0	2 / 4
<i>Pseudomonas sp.</i>	1D4	3 / 2	46 / 6.67	0	0 / 2
	21C1	1 / 2	24 / 5.09	0	0 / 0
	AP19	5 / 3	86 / 16.01	0	2 / 1
	AP42	4 / 2	49 / 9.76	0	1 / 22
	ENNP23	2 / 3	6 / 1.20	0	2 / 1

Pseudomonas

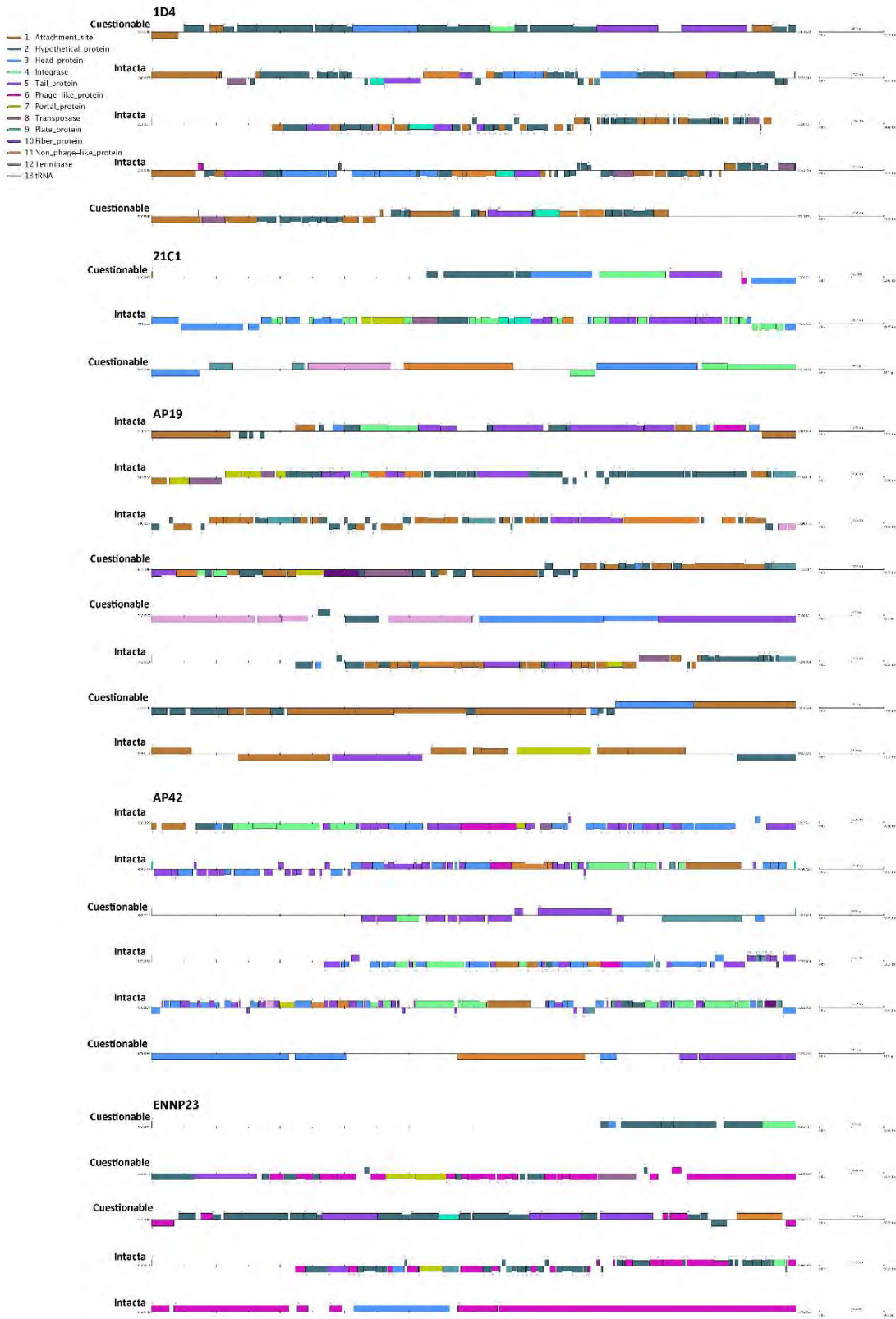
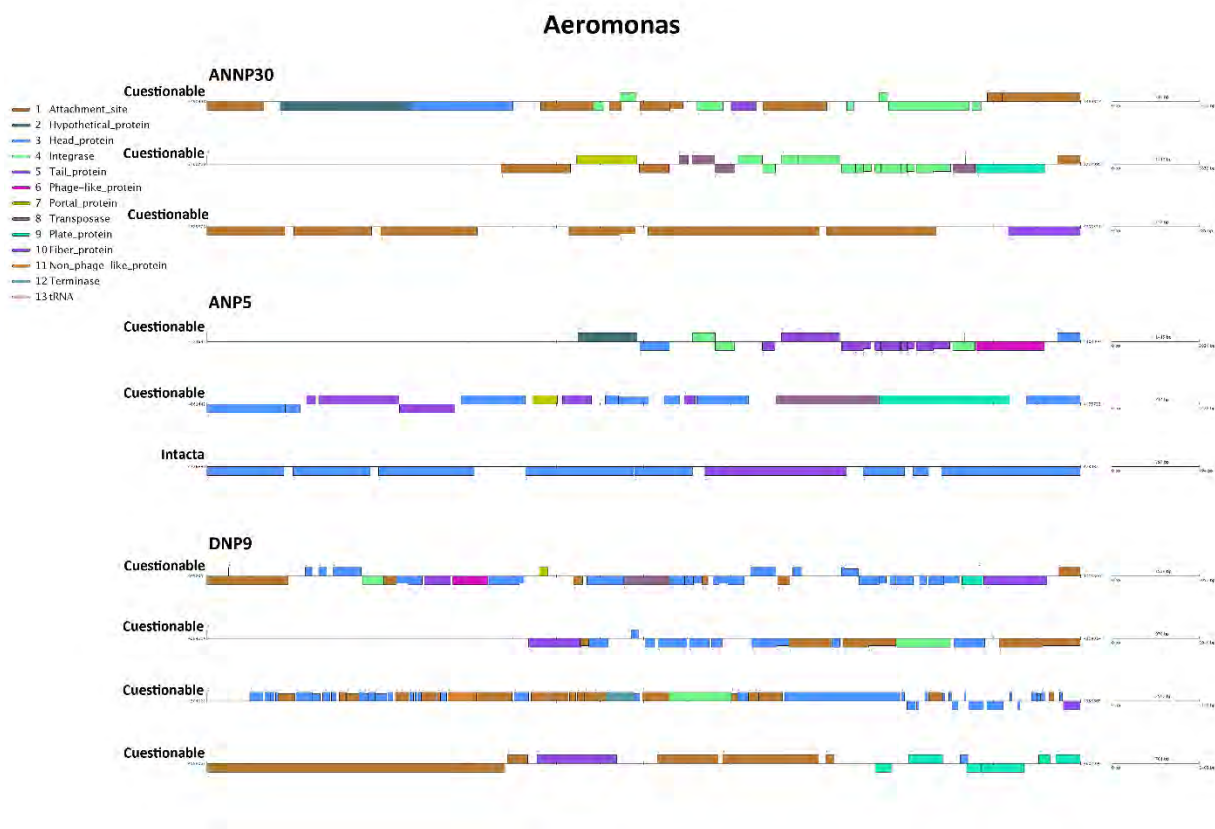


Figura 3.4. Figura en la página anterior. Representación esquemática de los profagos predichos mediante PHAST para las cepas de *Pseudomonas*. Dos categorías de identificación se muestran: profagos intactos y profagos cuestionables.

Figura 3.5. Representación esquemática de los profagos predichos mediante PHAST para las cepas de *Aeromonas*. Dos categorías de identificación se muestran: profagos intactos y profagos cuestionables.



Comparación de genomas

El análisis comparativo de genomas a nivel de secuencia es de gran importancia pues permite conocer la diversidad genética entre los distintos organismos analizados, así como el estudio de la evolución de los genomas. Esto es de particular interés para este trabajo, ya que analizamos los cambios presentes en cepas obtenidas de un experimento de enriquecimiento con nutrientes. En este experimento se observaron cambios a nivel fisiológico entre los aislados de diferentes tratamientos (Ponce-Soto et al., 2015), los cuáles serán un punto de partida para entender las adaptaciones potenciales de los dos géneros a este ambiente.

Los géneros de *Pseudomonas* y *Aeromonas* son dos de los géneros microbianos ubicuos en los sistemas hídricos y forman parte de la flora microbiana de los animales acuáticos, por lo cual debido a su característica de patógenos oportunistas son considerados dos de los patógenos de peces más importantes (Matyar et al., 2010). Estos géneros además de compartir algunas similitudes a nivel fisiológico tal como los flagelos polares, comparten similitudes a nivel metabólico y en la producción de factores de virulencia (Lysenko, 1960; Bullock, 1961; Shayo et al., 2012), por esta razón se decidieron analizar de manera conjunta estos dos géneros bacterianos. *Pseudomonas* es uno de los géneros bacterianos más diversos y con mayor representación en las bases de datos, al tener más de 200 especies reconocidas de las cuales 81 tienen al menos un genoma secuenciado y depositado en el GenBank (Jun et al., 2016). Los miembros de este género han sido clasificados como altamente adaptables ya que pueden colonizar una amplia variedad de ambientes en parte debido a su versatilidad metabólica y plasticidad genómica (Moore et al., 2006). Aun a pesar de esta gran disponibilidad de información referente a este género, el proceso de identificación a nivel de especie ha sido descrito como complicado inclusive entre aislados cercanos debido a la gran diversidad que presentan (Loper et al., 2012), sin embargo una excepción a esto es *Pseudomonas aeruginosa* ya que representantes de esta especie forman un grupo compacto sin importar su origen de aislamiento, sean clínicos o ambientales (Grosso-Becerra et al., 2012). El género *Aeromonas* por otro lado es un género mucho menos diverso que *Pseudomonas* teniendo 32 especies incluyendo identificadas y propuestas, de las cuáles 29 cuentan con al menos un genoma secuenciado. Al igual que para *Pseudomonas*, ha sido difícil distinguir entre los diversos clados que lo conforman

debido a la transferencia horizontal de genes aún entre distintos grupos (Silver et al., 2011; Colston et al., 2014).

Los 8 genomas secuenciados fueron comparados de manera pareada mediante el programa NUCmer. En estas comparaciones pareadas se tuvieron un total de 10 combinaciones para los aislados de *Pseudomonas* sp. (Figura 3.6) y de 3 combinaciones para los aislados de *Aeromonas* sp. (Figura 3.7). A partir de estas comparaciones se observó que los genomas de las cepas más cercanas entre sí son *Aeromonas* sp. ANP5 y *Aeromonas* sp. ANNP30, mientras que para *Pseudomonas* los genomas más relacionados corresponden a *Pseudomonas* sp. 1D4 y *Pseudomonas* sp. ENNP23. Mediante este mismo análisis se observó que aún para el único caso de aislados del mismo tratamiento y mismo mesocosmos (AP19 y AP42), no hay una sintenia total en sus genomas, lo cual nos indica que no analizamos clonas, y sugiere una diversidad de estrategias para lidiar con las presiones ambientales de este sitio aún entre organismos cercanamente relacionados. En los gráficos resultantes, cada uno de los puntos representa posiciones donde las dos secuencias muestran similitud, indicándose en rojo las coincidencias en la misma cadena, mientras que en azul se señalan las coincidencias invertidas (Figura 3.6, Figura 3.7).

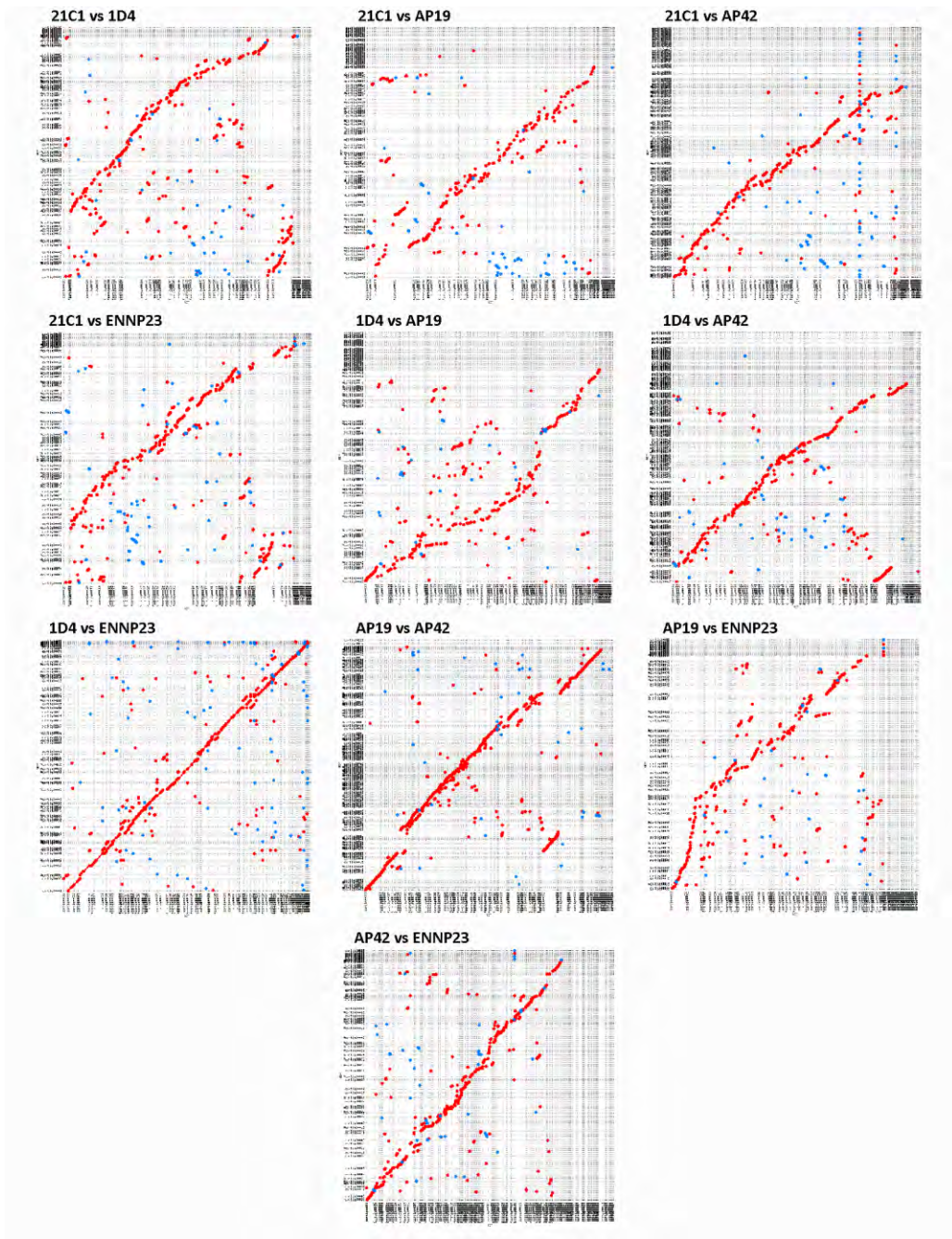


Figura 3.6. Alineamientos pareados entre los distintos genomas de *Pseudomonas* secuenciados. Los alineamientos se llevaron a cabo mediante el programa NUCmer.

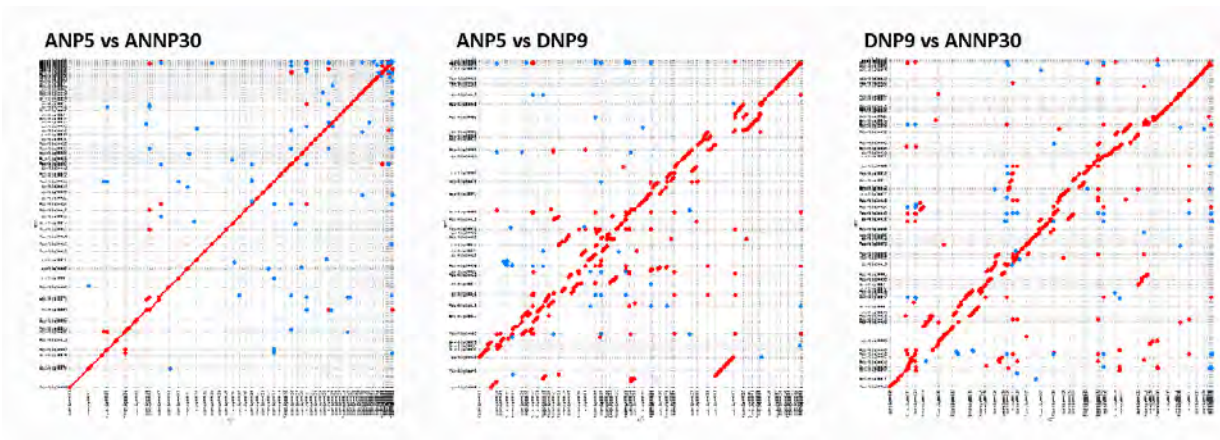


Figura 3.7. Alineamientos pareados entre los distintos genomas de *Aeromonas* secuenciados.

Adicionalmente se realizó un alineamiento múltiple con los ocho genomas secuenciados y cuatro secuencias de referencia. Con este alineamiento se realizó una reconstrucción filogenética bajo máxima verosimilitud con el programa FastTree v.2.1.8 (Figura 3.8). En esta reconstrucción se distinguieron tres grupos. El primer grupo se encuentra constituido por los genomas de *Aeromonas* sp. DNP9, ANP5 y ANNP30 que son todos asociados a los tratamientos de nutrientes N:P 16:1 y el muy limitado en P por aumento en N 75:1. El segundo grupo está conformado por los genomas de *Pseudomonas* pertenecientes al clado de *Pseudomonas aeruginosa*: *Pseudomonas* sp. 1D4, ENNP23 y 21C1 donde hay representantes tanto del tratamiento control como del tratamiento extremadamente limitado en P, sin embargo es importante resaltar que *Pseudomonas* sp. 21C1 está posicionada en la base de la rama, indicando que si bien pertenecen al mismo clado, ésta representa una especie diferente. Finalmente en el tercer grupo se encuentran representantes relacionados al clado de *Pseudomonas fluorescens*: *Pseudomonas* sp. AP19 y AP42, ambas cosmopolitas interesantemente están asociadas a las de enriquecimiento de P a niveles más “fisiológicos” aunque el N sigue siendo limitante.

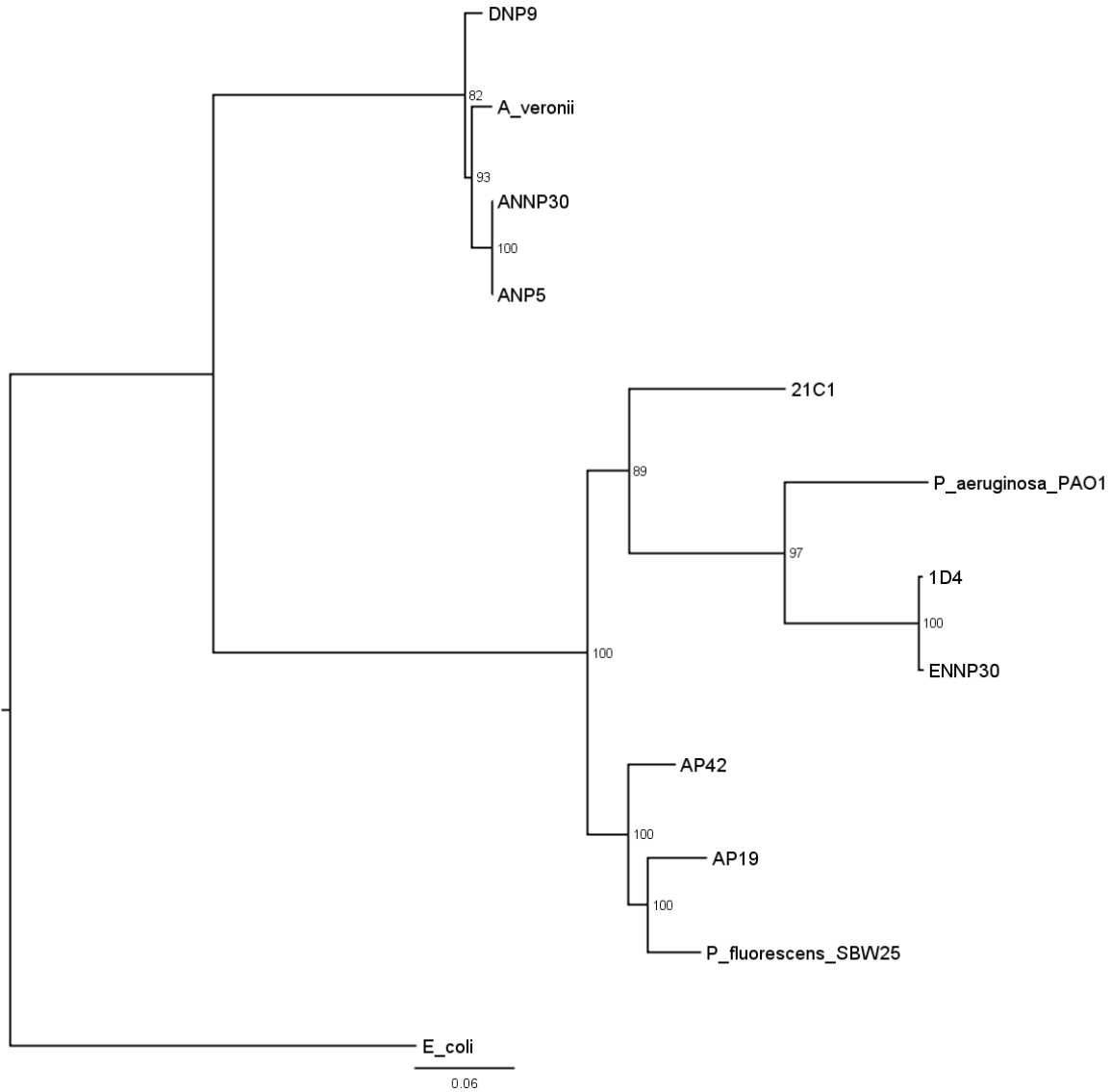


Figura 3.8. Reconstrucción filogenética bajo máxima verosimilitud de los ocho genomas secuenciados. AP19 y AP42, tratamiento enriquecido con P a 1 μ M; ANP5 y DNP9, tratamiento enriquecido a una proporción de N:P de 16:1; ANNP30 y ENNP23, tratamiento enriquecido a una proporción N:P de 75:1

Reconstrucción de vías metabólicas.

Recordando que para cada tratamiento se seleccionaron dos aislados de agua para secuenciar, así como dos representantes aislados previo al periodo de enriquecimiento: Tratamiento P, AP19 y AP42; tratamiento NP, ANP5 y DNP9; tratamiento NNP, ANNP30 y

ENNP23; previo al periodo de enriquecimiento (tiempo cero), 1D4 y 21C1. De estos aislados, tres pertenecen al género *Aeromonas* (ANP5, DNP9 y ANNP30) y el resto al género *Pseudomonas*. Para cada uno de los genomas secuenciados y ensamblados se llevó a cabo la predicción de sus vías metabólicas con base en la anotación realizada. Para esta predicción se utilizó el servidor KAAS, el cual proporciona una comparación funcional contra la base de datos curada del KEGG, y cuyos resultados son asignados a las vías metabólicas presentes en ésta (Moriya et al., 2007). El método de búsqueda utilizado para la asignación de ortólogos y de función metabólica fue BBH (bi-directional best hit) mediante BLAST.

Siguiendo la hipótesis nula en la cual la separación filogenética entre los géneros tiene mayor relevancia que el efecto dado por el enriquecimiento, el análisis de las vías metabólicas de las cepas secuenciadas mostró, al igual que los análisis previos, una mayor similitud entre los aislados pertenecientes al mismo clado. De manera general se encontró, como era de esperarse, que los mayores cambios a nivel metabólico se observan al comparar entre los representantes del género *Pseudomonas* contra *Aeromonas*; así mismo se observan diferencias entre los dos grupos de *Pseudomonas*, encontrando por ejemplo una mayor abundancia de genes involucrados con el metabolismo de proteínas, de RNA y carbohidratos para los aislados pertenecientes al género *Aeromonas*, mientras que el resto de los aislados pertenecientes al género *Pseudomonas* presentan una mayor abundancia de genes involucrados al metabolismo de aminoácidos y sus derivados así como de compuestos aromáticos y ácidos grasos (Figura 3.9).

Entre las vías metabólicas para las cuales se identificaron diferencias no exclusivas de un género, se encuentran la vía de metabolismo de sacarosa y polisacáridos como el almidón, el cual no se encontró representado en los genomas del clado de *Pseudomonas aeruginosa* pero sí en el clado de *P. fluorescens* y del género *Aeromonas*. Así mismo se encontraron partes de ciclos metabólicos exclusivos de un género como es el caso de elementos de la biosíntesis de terpenoides-quinonas y lisinas o la degradación de xilenos, exclusivos de *Pseudomonas*, concordando con la versatilidad metabólica de éste género. Debido a que los genomas analizados no están cerrados, la falta de genes u operones en alguno de los clados analizados podría estar dada por la fragmentación. Por este motivo se evaluó la integridad de los ensamblados mediante el programa BUSCO (Simão et al., 2015), el cuál mediante la búsqueda contra una base de datos de

genes ortólogos de copia única y un filtrado de sus niveles de conservación, establece un nivel de conservación. Para nuestros genomas analizados, el nivel de conservación osciló entre 99.1% y 99.8%, lo cual nos sugiere que la ausencia de genes en un clado determinado, como el caso del metabolismo del almidón en el clado de *P. aeruginosa* no se debe a un artefacto de la secuenciación ni del ensamble.

Para poner a prueba si la hipótesis nula es correcta, es decir que la separación filogenética entre los géneros tiene una mayor relevancia que el efecto dado por el enriquecimiento, se llevó a cabo un análisis tomando la abundancia funcional de la anotación. Congruentemente con esta hipótesis, se recuperaron con este análisis los tres grupos descritos previamente a nivel genómico, conformados por el género *Aeromonas* y los clados de *P. aeruginosa* y *P. fluorescens*, existiendo una clara separación dada por la taxonomía más que por el tratamiento (Figura 3.9). Esta observación se vio reforzada al realizar un análisis de componentes principales para todos los genomas secuenciados tomando en consideración el tratamiento del que fueron aislados, su género así como sus abundancias funcionales, encontrándose una mayor asociación entre los géneros y el clado funcional al que pertenecen que al tratamiento del que se obtuvieron (Figura suplementaria 3.2).

De manera conjunta al análisis de componentes principales, con el programa STAMP se determinaron diferencias estadísticamente significativas en las características funcionales de los genomas (Figura suplementaria 3.1). En los aislados de tiempo cero se encontró una menor representación de genes involucrados en el sistema de *quorum sensing* y en la formación de *biofilms* (Figura suplementaria 3.1 A) lo cual es congruente con lo reportado experimentalmente, en donde se encontró un incremento de cepas formadoras de *biofilm* posterior al periodo de enriquecimiento (Ponce-Soto et al., 2015). Para el caso del tratamiento P se encontró una mayor representación de fagos y profagos, acorde con las predicciones del programa PHAST (Tabla 3.3), en la cual los genomas de *Pseudomonas* sp. AP19 y *Pseudomonas* sp. AP42 contienen el mayor número de estos elementos. El tratamiento NP fue el tratamiento en el cual se encontraron el mayor número de diferencias significativas en las funciones representadas resaltando la síntesis de proteínas, la reparación de DNA así como la modificación y procesamiento de RNA

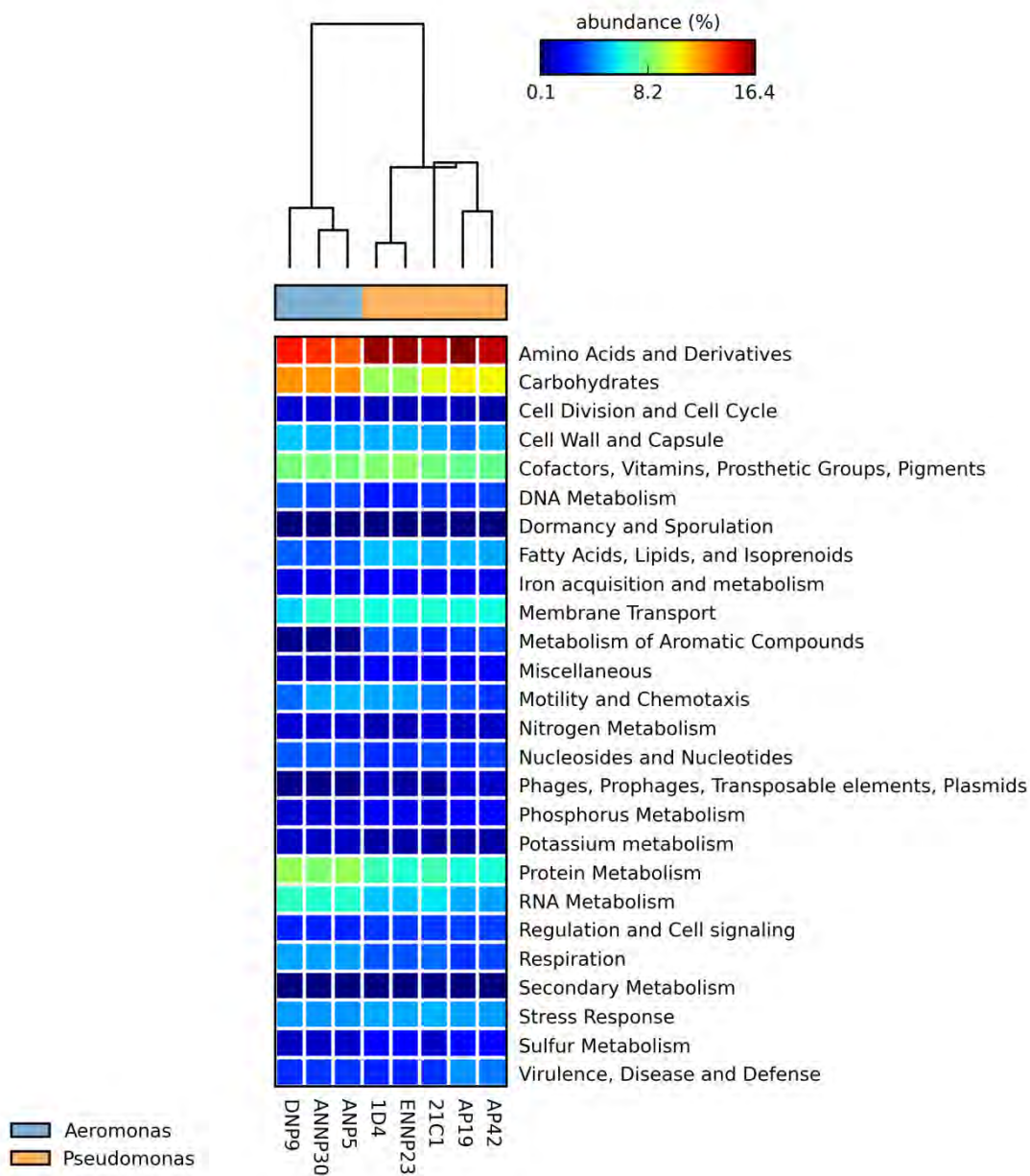
(Figura suplementaria 3.1 C). Para el tratamiento NNP no se encontró ninguna función significativamente diferente al comparar contra el resto de los tratamientos.

Debido a la naturaleza del experimento y las propiedades químicas del sitio, era de interés conocer los cambios que se pudieran encontrar asociados al metabolismo de fósforo. Por esta razón se analizaron genes asociados con el metabolismo de este nutriente. El regulón Pho, caracterizado inicialmente en *E. coli*, es un mecanismo de regulación global involucrado en el manejo bacteriano del fósforo inorgánico (Pi) y es el único sistema descrito hasta este momento para responder a la limitación de este nutriente (Santos-Beneit, 2015). Este regulón se encontró presente en la totalidad de los aislados analizados, lo cual sugiere la importancia de esta función para lidiar con la limitación intrínseca de fósforo en el valle de Cuatro Ciénegas. Entre los componentes de este sistema, se encuentra el operón *pstCAB* cuyos productos son necesarios para el transporte de Pi (Lee et al., 2009), operón que se encuentra representado en mayor copia en los genomas de los aislados *Pseudomonas sp.* AP19 y *Pseudomonas sp.* AP42. Esta mayor representación de transportadores de Pi en aquellas cepas aisladas del tratamiento con fósforo, podría deberse a una selección ambiental, en la cual aquellos organismos con una mayor capacidad de transportar y asimilar el fosfato adicionado en este tratamiento presentan una ventaja sobre el resto de la comunidad endémica donde el Pi es extremadamente raro.

Entre las características compartidas entre todos los aislados, sin importar su género o tratamiento están la presencia de elementos relacionados con la motilidad y quimiotaxis, así como de genes relacionados con la producción y resistencia a antibióticos y toxinas antibacterianas como colicinas, transportadores para la resistencia a múltiples antibiótico y genes para la biosíntesis de ácidos grasos tal como *PhaI*, importante para la síntesis de polihidroxicanoatos. La presencia generalizada en los genomas de genes involucrados con la competencia y el almacenamiento de energía bajo condiciones limitantes de nutrientes, indican una adaptación para un ambiente altamente oligotrófico y en donde la competencia juega un papel primordial en la dinámica de las comunidades bacterianas (Pérez-Gutiérrez et al., 2013; Aguirre-von-Wobeser et al., 2014). El encontrar aun estas adaptaciones después de eliminar una de éstas presiones ambientales (la oligotrofia), nos hace pensar en dos posibles explicaciones. Por un lado podemos pensar que el periodo de enriquecimiento no tuvo una duración lo

suficientemente larga para seleccionar una comunidad en la que las cepas cosmopolitas coadaptadas a los nutrientes que nos rodean pudieran tener ventaja, por lo que sólo observamos un aumento en la abundancia de cepas locales que eran parte de la biósfera rara y que se ven favorecidas por la bonanza temporal de nutrientes, por lo que siguen presentando éstas adaptaciones a un ambiente oligotrófico, adaptaciones que se han seleccionado en este sitio que ha permanecido aislado por aproximadamente 35 millones de años desde el levantamiento de la Sierra Madre Oriental. Por otro lado se puede proponer que aún a pesar del incremento en la entrada de nutrientes, la dinámica propia de la comunidad bacteriana mantiene una presión para retener a estos elementos y mantener el equilibrio en esta comunidad, sin embargo hay que tener también en consideración el reducido número de genomas analizados lo cual podría en cierto nivel sesgar estas observaciones.

Figura 3.9. Heatmap representando la abundancia de categorías funcionales para los genomas secuenciados.



Material suplementario

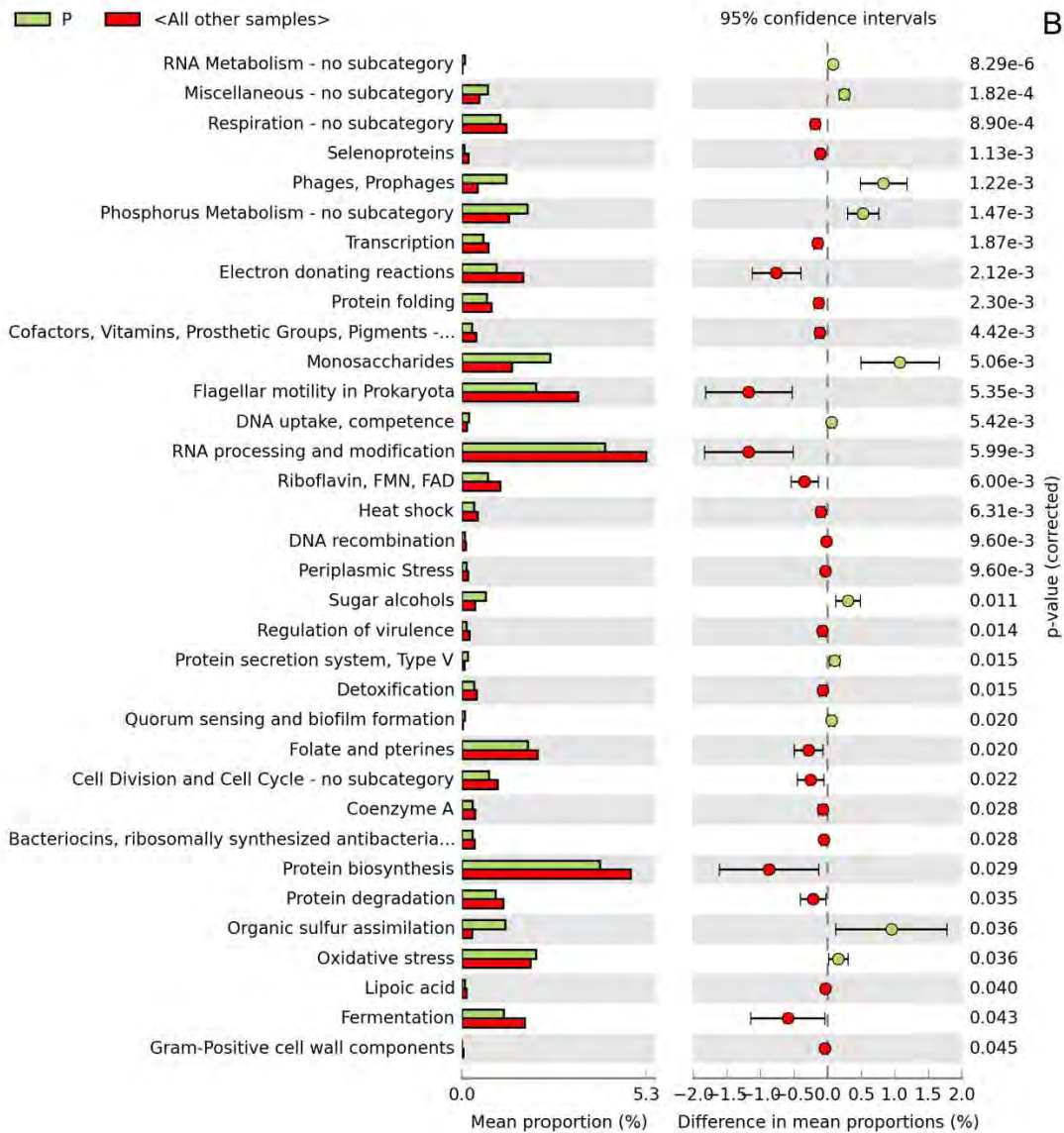
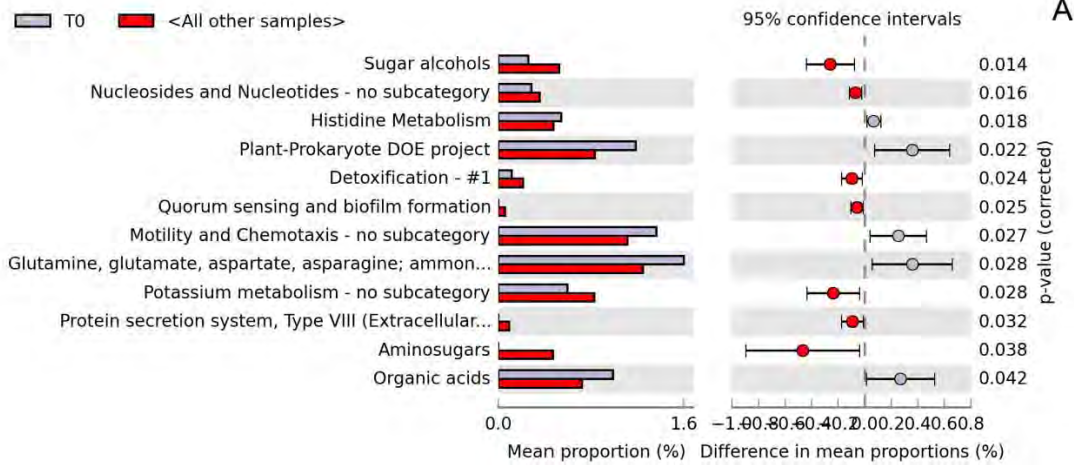
Tabla Suplementaria 1. Secuencias de los espaciadores únicos de las secuencias CRISPR identificados para *Aeromonas*.

AACTACGTCACCGATGTGAGCGATGGGGTTAA	CCAGCCGCCAGCAGAGCCTTGGTCATAGCGGC
AACTCAACATCGCCAGCGATGCAGGCGGAAAT	CCGGATGCAGCGGCAGAGACCAGCGTCCAGGC
AAGAACGAGATCGGCCACCTCACCGAGGCAGA	CCTCCAGTTTAGATGCCCAGACATACTGGGGT
AAGTTGCCAACCAGGTGAGGCGATGGTGATCGG	CGAACTGGCCCCGGGCGCTGGGCCATATCTATGC
AATGGCCCCTCCTTTGAACTGGTAACAGTTAC	CGACACTCAAGGTCTTCGTGTTTTGTTCAGTAT
ACAATTTGCCTGCTTATGATAAGAACGTGTGG	CGACAGCGGCGGAGGTGACAACAGCTACCGGA
ACCCCGCTCAATGGCGGGGCAGTCTCTTTGGT	CGCCATAGAACGCGAGCACAAGAACGCCAGG
ACCGGCGATAAGCGCGGCTGGATTGGCGATAC	CTCGAGGATGCCAGTAGCAGCACAGTCTGGCC
ACTCTCCGCGCCACCGCACCCCGGCGGGGAGG	CTGGAGCGGTGCGCGTCTCGAGACCTTCCGC
AGCCTGCTGATGCCCCGCATGCTTGGCAGCCA	GACGACGAGACGCCTTGGTGCGCTGCGTTCGT
AGCGGGGCAGGGGTCAATTGCAACCTGTCCAAC	GACGTAGAGCCGCTGGCCGCCGCTACAACGA
AGTGGCCATGGCGGTGGTGGTGCCTCTGCATCC	GAGCAGGCCAGCTCCAGTGTGTTGATGACGTG
ATGCAGCCATCAAGGGCGACTTCGAGGTACAG	GATCGCAGCCTGCCCTCAAATGTCCCCGCT
ATGTTGGAGATGGTGAGCTGAATGGTGTTGGT	GATGGGGGGTTCGCCCTGACCAGTGTGTTGTGG
CAAAGCGGCCATCTGGCTGGCGTCCCGATTTT	GCAGTGCTGCACCTTGTAGACGGTCGCCACC
CAAATGCAGCATGGACGGGATGTGTCTCTGGA	GCCAGCGCCTTGAGGCCAACAACGTGATAGGT
CACATTGACGAAGCGACATGGAGGAAGGTAGC	GCCCCGCCGACGGCGAGACCAGCTAACCGAGC
CAGAGTCACACCAGCGATTGAGCCAATGATGC	GCGGGCCTGTTGGAATCAATGCCGGTGATGCG
CATACGGCGCTGGTATGTCGGTGCTTGATTTC	GCGTTCCGTGGCACCTATGGCGAGACCATCAC
CCAGATAAAAGCTGTAGAAACGGCGATAAATA	GGCGGCAGCAGCCACTCAGGCCGACGAACGTT
GGGCCGATCACCTTCATGGGGGCGTCAGGCTA	TCAAGTAACTATTTCTACATCCCATGTTTCCT
GGGTTCGTGGAGGACCGCGCTAAGATGAATGA	TGAGCCTACCCTTGAATCCGAGAGTGACACCT

GGTAACGATGTGCTGGCCAAGGGACGCCGCAC	TGAGTCAGTATGCCCCGCCAGCAGCGTTGTTTT
GTAAGCCGCTACACCTATGACCGCCGTCATTG	TGCTGACAGGTCTCGCCGCCGTGGTCGGTATCC
GTCAAGTGTCCACTCAGGGTCATCATGAGGGTA	TGGGCATTCCGCCAAGTGCTGTTCGATGTTGG
GTCACTCTGCAGCTGCGAGATACTGACAATTC	TTCACGAGAACATGGCCTACAACCAGGCATTC
GTCATTGCCAACGCCCCGTTTCGTTACCGCCA	TTTACTGGTGTTCAGTAGCCGCTACAGCTAA
GTGCTGATGTACTCGTCCGCAGAGTAGGGGGC	TTTACAGGTGGTACTGTGGAGGTTGCTCCATA
TAGCAACCTATCTGCTGGTGTCGGTCAAGGTA	TTTCTGCTAGACCAACTGCCTGAAACAGTCTG
TAGCACGTAAAATATTTTTCGAAAGTGCTTTA	TTTTCGGGCGGCGATGGCTATGGGGTGCTCTG

Tabla Suplementaria 2. Secuencias de los espaciadores únicos de las secuencias CRISPR identificados para *Pseudomonas*.

ATCGACTGCACGACATGGATCTGGGGCG CGTT	CGCTGGCTATGAGTCTACGTTGACA
AGCCGGCTATGAAAGCAGGCTGATT	CGGTGGTTACGACAGTTCGTTGATC
AGCTTGGTCAGCTCATCGAGCAACGAGG CCGC	CTGAGTGAGGAAGGACATGCGCATCAGTTCTG
ACATCCAGGAAGCCAACGCCCTGCTCGA CGAGCGGT	GACACCAAGGGCGAGATCCGCACCCGCCAGCGTCCGGT
ATCGGGATATGAGAGCACCTGACT	ATGAAGATCGACATCGCACACCGCTGCGCCGA
GACCCATGCAAACCCGATTTCCGCCAGAT CCGCCGGT	GACGGGTTATGGCAGTACCCAGACTGCGGGTTACGGCA GTGTCATGACC
CAAAATATAGCTCCCTCCACC	GGCACAAGAAGGCAGTTCACTCACC
CAAAATATAGCTGCCTCCACA	GCTTCGACCTTCGGCAGTCTGGTTGGCTCTTC
CATTTTCACCGCACCCCTCGGGGATGCGG CGCTTCGGC	GCAGTTGTCCTCCAGAGACTCCGGCCGTCTCCCGGT
CCGAGGGCAGTCATGCCGTCCGGGGGA CCAG	GGCCAGGACAATAGCTCGCTCACC
CCGTAAATCACTGAGTTCGGA	GGCTCAGGAGCAAAGTTGGTTAACT
CGCAGGACACGAAAGTACACTCACT	TCTCTTTTCTGGTTGCCATGGCTCAGTCACTC
CGCCCAGGAAAGCAGTGATCTCATC	GTGCCGGTGTCCCTGCTCGCGGGTGATGCGAA
CGCCCAGGAAGAAAGCTCGCTGACGACC GGTT ATGGGAGCACTTCAACG	GTGAGTTTTACAGGTCGTTCTCCTCTGCATCGGGT
CGCCGGCGCTGACAGCTCGCTGATC	TGAATCCAGCGGTAAGCGAATCGCTTTTGGAG
CGCCGGCTACAAAAGCACCTGACC	TGCCGGATTCAACAGTTCATTAATC
CGCCGGTCACGCAAGTGCGTTGATT	TGCCGGTTACGGAAGCATTCTGACT
CGCCGGTTACGGCAGCACTCAAAC	TGCGGGTTACAAAAGCATTCTGACT
CGCTCAGGAGGACAGTTCGCTGACT	TGCGGGTTATCAAAGTTCGTTGGTC



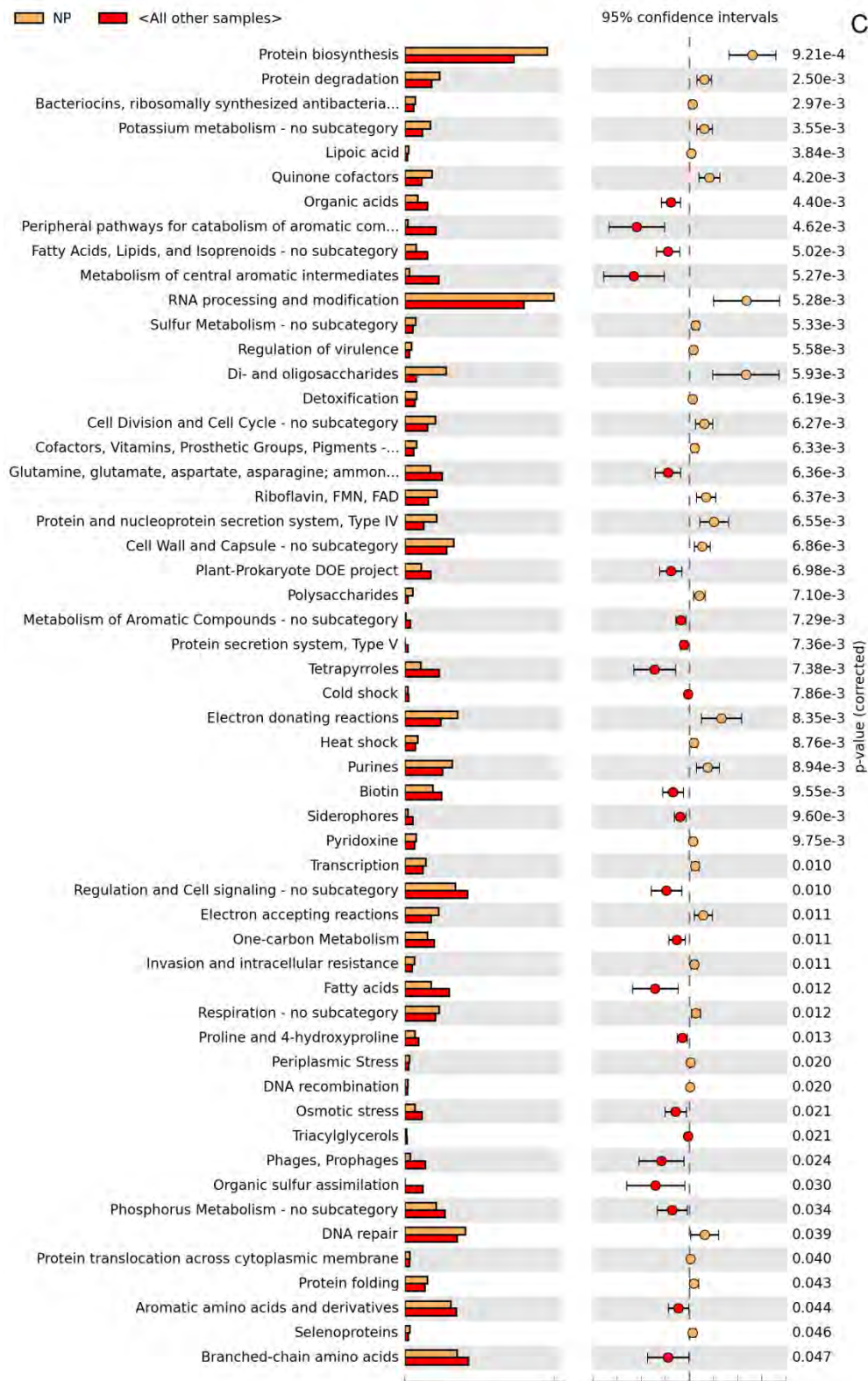


Figura suplementaria 3.1. Representación de funciones sub y sobre representadas para los genomas cada uno de los tratamientos al comparar contra el resto. (a) Tiempo cero, (b) tratamiento P, (c) tratamiento NP.

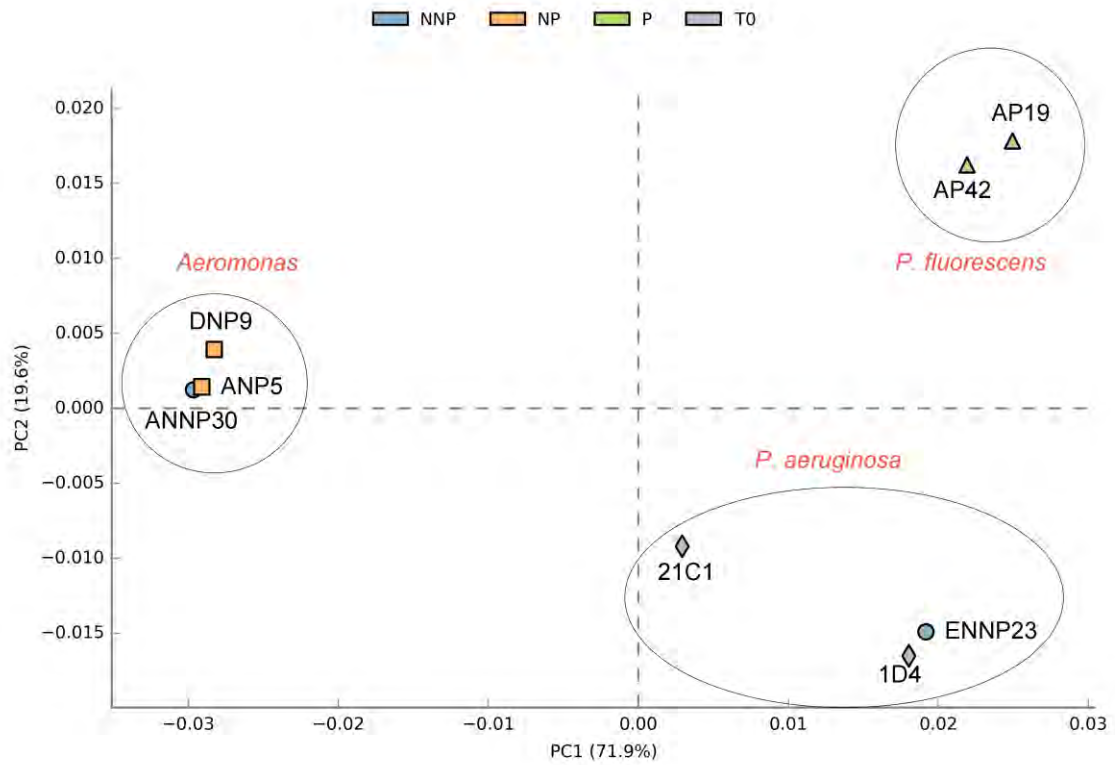


Figura suplementaria 3.2. Representación esquemática de un análisis de componentes principales tomando en consideración los tres clados y los cuatro tratamientos analizados.

Capítulo 4. Artículo suplementario. Modelo de dos papeles de una red de interacciones de Gamma-Proteobacteria de vida libre en un ambiente oligotrófico.

4.1 Resumen

Las interacciones antagónicas son observadas frecuentemente entre bacterias y tienen como resultado una compleja red de interacciones, las cuales pueden promover la coexistencia y por consiguiente, promover la diversidad. En este trabajo se analizaron las interacciones entre bacterias acuáticas del sistema Churince en el valle de Cuatro Ciénegas, México, aisladas por su capacidad de crecer en medio PIA (*Pseudomonas* isolation agar). En la red de interacciones resultante, se pudieron diferenciar cepas altamente antagónicas y cepas altamente sensibles. La mayoría de las cepas altamente antagónicas pertenecen al género *Pseudomonas*. La red de interacciones es del tipo “determinada por el emisor”, lo que implica que las cepas antagonistas tienen una mayor influencia en la estructura de ésta que las cepas sensibles. Pocas interacciones fueron requeridas para conectar todas las cepas, lo que implica que esta es una red del tipo “mundo pequeño” o “small world”. Esta red se caracterizó como altamente anidada, presentando un grupo de cepas altamente interconectadas. De igual manera para este trabajo, se construyó un modelo probabilístico, que representa la mayoría de las características de esta red. La interpretación biológica de este modelo sugiere un estado en el cual están presentes diversos mecanismos antagónicos, y en el que la mayoría de las cepas son resistentes. Este trabajo mostró que las cepas de *Pseudomonas* de la columna de agua en Cuatro Ciénegas tienen el potencial de interactuar de manera antagónica con muchas cepas cercanamente relacionadas y que estas interacciones generalmente no son recíprocas.

4.2 Artículo. Two-role model of an interaction network of free-living Gamma-Proteobacteria from an oligotrophic environment

Two-role model of an interaction network of free-living γ -proteobacteria from an oligotrophic environment

Eneas Aguirre-von-Wobeser,^{1,2*}
Gloria Soberón-Chávez,¹ Luis E. Eguiarte,²
Gabriel Yaxal Ponce-Soto,^{1,2}

Mirna Vázquez-Rosas-Landa² and Valeria Souza²

¹Departamento de Biología Molecular y Biotecnología,
Instituto de Investigaciones Biomédicas and

²Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de
Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México,
Mexico, Mexico.

Summary

Antagonistic interactions are frequently observed among bacteria in the environment and result in complex networks, which could promote co-existence, and therefore promote biodiversity. We analysed interactions of aquatic bacteria isolated by their ability to grow in *Pseudomonas* isolation agar from Churince, Cuatro Ciénegas, Mexico. In the resulting network, highly antagonistic and highly sensitive strains could be distinguished, forming a largely hierarchical structure. Most of the highly antagonistic strains belonged to the genus *Pseudomonas*. The network was sender-determined, which means that the antagonist strains had a larger influence on its structure than the sensitive ones. Very few interactions were necessary to connect all strains, implying that the network was 'small world'. The network was highly nested, having a core of highly interacting strains, with which the less antagonistic or highly sensitive interact. A probabilistic model was built, which captured most features of the network. Biological interpretation of the model implied a state in which many different antagonistic mechanisms were present, and most strains were resistant to them. Our work shows that strains of *Pseudomonas* from the water column at Cuatro Ciénegas have the potential to interact antagonistically with many closely related strains and that these interactions are usually not reciprocal.

Introduction

Antagonistic effects of some bacterial strains on the growth of others – a strategy known as interference competition – result in complex interaction networks in natural environments (Lo Giudice *et al.*, 2007; Prasad *et al.*, 2011; Vetsigian *et al.*, 2011; Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2013). These networks are thought to influence community structure (Validov *et al.*, 2005; Rypien *et al.*, 2010; Long *et al.*, 2013) and also to maintain cohesion of bacterial populations (Cordero *et al.*, 2012). Interestingly, bacterial antagonistic interaction networks vary between sites and taxa studied, making it a fertile study area in community ecology.

Theoretical efforts to understand the effects of interactions on biodiversity have followed a bottom-up approach, where a three member subnetwork is modelled to determine conditions for co-existence. Such studies have found that non-transitive interaction loops (see Table S1 for an explanation of network analysis terms used in this article) of one antagonist, one sensitive and one resistant strain co-exist if the resistant strain grows slower than the sensitive one and the antagonist slower than the resistant one (Czárán *et al.*, 2002; Kerr *et al.*, 2002). These models, known as rock-scissors-paper (RSP) models, depend on two dimensions, namely antagonism and growth. On the other hand, Massey and colleagues (2004) found co-existence of two parasitic strains mutually antagonistic to each other, when experimentally infected to their host caterpillars in the absence of resistant or sensitive strains, suggesting that other interaction models are possible. Experiments and mathematical simulations have shown that RSP-type interactions only result in co-existence if there is physical structure in the environment (Freaan and Abraham, 2001; Kerr *et al.*, 2002), for example, with the presence of solid substrate, as opposed to a well-mixed liquid culture. One-dimensional non-transitive cycles (see Table S1) involving only antagonism, where the three strains would be antagonistic, each affecting one strain and being affected by another are in principle possible, but have not received much attention in the literature. If present, such cycles could as well promote co-existence.

Generalizations of RSP models to more than three strains have been done *in silico*, where multiple toxins are present and strains act as antagonist, sensitive and

Received 1 March, 2013; accepted 4 October, 2013. *For correspondence. E-mail eaguirre@iibiomedicas.unam.mx; Tel. (+52) 55 56 22 8222 ext. 47924; Fax (+52) 55 56 16 0155.

resistant depending on the strain they are confronting (Pagie and Hogeweg, 1999; Czárán *et al.*, 2002; Lenski and Riley, 2002; Kerr, 2007). As in the three species model, spatial structure is essential for co-existence (Pagie and Hogeweg, 1999; Czárán *et al.*, 2002; Massey *et al.*, 2004). If antagonism and resistance genes can be horizontally transferred between strains, it is predicted that a state where most strains produce only few toxins, but are resistant to many, will develop (Czárán *et al.*, 2002).

Another approach to understand networks is top-down, analysing the statistical properties of the network (Newman, 2003; Butts, 2008; Vetsigian *et al.*, 2011). Few reports have made use of this approach to understand bacterial antagonism interaction networks (Lo Giudice *et al.*, 2007; Prasad *et al.*, 2011; Vetsigian *et al.*, 2011; Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2013). These studies isolate collections of bacteria from natural environments and analyse the interaction networks between those isolates. An informative and commonly analysed network property is the degree distribution (see Table S1), which quantifies the number of connections each node – in our case, each strain – has to other nodes in the network (Newman, 2003; Proulx *et al.*, 2005). When the connections are directed, i.e. they go from one node to another one (Table S1), as in antagonistic interaction networks, two degree distributions can be analysed; one for incoming connections or the number of strains antagonizing each strain, and one for outgoing connections or the number of strains antagonized by each strain. In Antarctic seawater bacteria, particular taxa dominated high incoming degrees, while the outgoing degree distribution was not correlated with taxonomy (Lo Giudice *et al.*, 2007). Network analysis has been used to detect a high tendency of pairs of soil *Streptomyces* strains to antagonize each other reciprocally (Vetsigian *et al.*, 2011). The same study found a sender-dominated network (see Table S1), i.e. the network structure seemed driven by the antagonisms more than by the resistances (Vetsigian *et al.*, 2011). Network analysis has also been used to understand the effects of a temperature shift in antagonistic interactions of Arctic bacteria (Prasad *et al.*, 2011). Another study describes, using network analysis, an aquatic sediment *Bacillus* interaction network from an oligotrophic pond as similar to a 'scale-free' (SF) network (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2013). SF networks are commonly observed in many disciplines, and they have power-law degree distributions in their right tails (Barbási and Albert, 1999; Newman, 2003; Proulx *et al.*, 2005).

Top-down network models can be used to identify possible underlying mechanisms of network development. For example, SF networks are thought to be generated by preferential attachment, where new nodes connect with higher probability to the already more connected nodes

(Barbási and Albert, 1999; Proulx *et al.*, 2005). SF networks contrast with networks with equal probability of connections between nodes. These networks, studied by Erdős and Rényi (ER networks; Table S1), have binomial or Poisson degree distributions (Newman, 2003), and reflect a truly random process of connection formation. Different connectivity processes are likely to result in degree distributions that differ from the ER or SF models. Therefore, studying the degree distributions and other statistical properties of networks can limit the possible underlying connectivity mechanisms.

In this study, we analyse a bacterial antagonistic network using a top-down approach. We study a collection of 37 gamma-proteobacteria isolated from water by their ability to grow in *Pseudomonas* isolation agar (PIA) from the Churince water system in Cuatro Ciénegas, Coahuila, which is extremely oligotrophic (Souza *et al.*, 2012). This approach involves in-depth analysis of interactions among a sample of bacteria from the field, as a model of the interactions that might be present in natural environments. Network analysis and modelling suggests an ecological interpretation, where rare events would introduce new antagonistic interactions to the community (possibly by small modifications of the existent mechanisms). These new mechanisms would have a high number of targets as resistance would be virtually absent in the community. As resistance would spread in the community, the target number of a mechanism would decline until an equilibrium state would be reached, with most strains resistant to it.

Results

We tested for pairwise antagonistic interactions of 37 strains between each other. The strains were isolated from the Churince water system by their ability to grow on PIA and consisted not only of *Pseudomonas* but also included among others *Aeromonas*, *Halomonas*, *Rheinheimera* and *Shewanella* (Fig. 1). Interestingly, an equal sampling effort to obtain *Pseudomonas* from the Churince sediment was not successful, suggesting that water is not a transient environment for these Proteobacteria and that their interactions may reflect their way of life in this environment. Antagonistic interactions between these strains were moderately frequent; the interaction density was 0.14, defined as the fraction of strains with observed interaction relative to the number of possible strain-pairs (37×37) in the collection (Table 1). These interactions resulted in a network connecting all strains tested (Fig. 1A). Most strains antagonized at least one other strain (81%) and were antagonized by at least one strain (81%; Table 1). However, there was a large heterogeneity in the antagonistic and resistance behaviour of the strains. Specifically, some strains (shown in the

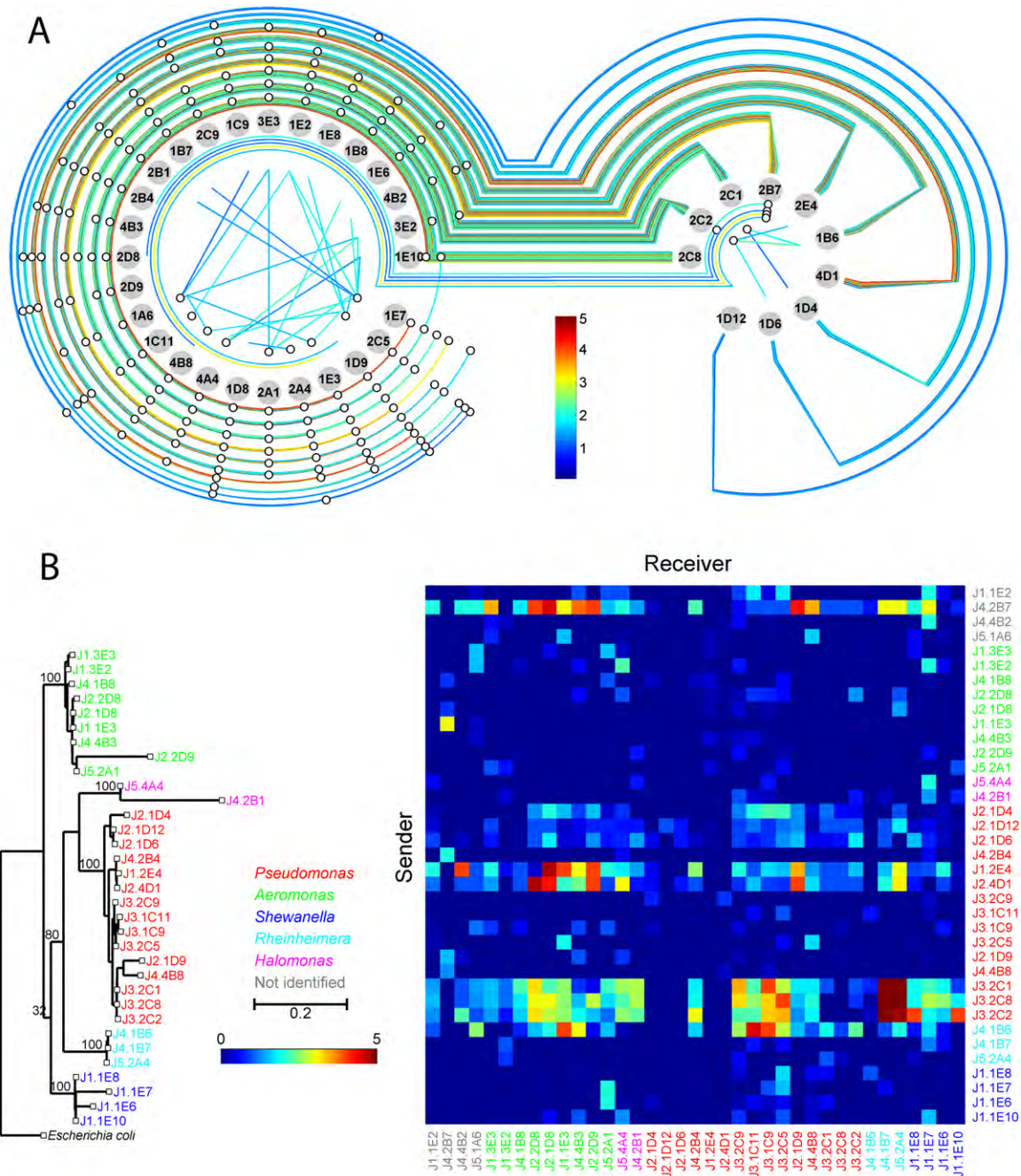


Fig. 1. Antagonistic interaction network and phylogeny of *Pseudomonas* sp. and related strains from Churince, Cuatro Ciéngas.

A. Interaction network. Strains are represented by grey circles with abbreviated strain names indicated. Antagonistic interactions are represented by lines ending in open circles. The starting position of each line indicates the antagonist strain, and the open circle indicates the sensitive strain. The colours of the lines show the intensity of the interactions (see Experimental procedures), as indicated by the colour scale. Separation of the strains in two groups was done *a posteriori* for clarity based on the results of this study. To relate abbreviated strain names with complete strain names, see Table S2.

B. Phylogeny and interaction matrix. The phylogeny was calculated using RAxML-HPC2 version 7.6.3 with the GTR + CAT likelihood function (Stamatakis, 2006). The interaction matrix was ordered according to the phylogenetic tree. Bootstrap values for the main branches are given in percentage based on 1000 bootstrap samples. Colours of the strains represent the genera assigned by classifier (Wang *et al.*, 2007). The colours of the matrix data show the intensity of the interactions.

Table 1. Statistics of the interaction network of *Pseudomonas* sp. and related strains from Churince, Cuatro Ciénegas.

Parameter	Observed value
Interaction density	0.14
Fraction of strains antagonizing at least one other strain	0.81
Fraction of strains antagonised by at least one other strain	0.81
Sender-receiver asymmetry	-0.31
Network diameter	3
Nestedness	0.872
Assortativity coefficient	-0.553

right side of Fig. 1A) had a high tendency to antagonize others, while being highly resistant (Fig. 2). Other strains were, on the contrary, highly sensitive, showing a low capacity to antagonize others (shown on the left side of Fig. 1). Almost all highly antagonistic strains belonged to the genus *Pseudomonas* (Fig. 1B). However, some sensitive strains of this genus were also found. Closely related strains had very similar patterns of antagonism in some cases, like J3.2C1, J3.2C2 and J3.2C8, and the case of J2.4D1 and J1.2E4. However, they were markedly different in others, like J4.2B4, which had a very similar 16S sequence as the latter pair but was much less antagonist. This unlinking of the 16S relatedness and the antagonistic activity of strains has been observed before (Vetsigian *et al.*, 2011). In our study, 16S relatedness has some predictive power on the strains antagonism towards others. The only non-*Pseudomonas* strain that was found to be antagonistic was J4.1B6, which belongs to the *Rheinheimera* genus. Interactions occurred between strains coming from the same sample, as well as between strains from different samples and sampling stations (Fig. 1B, see Experimental procedures).

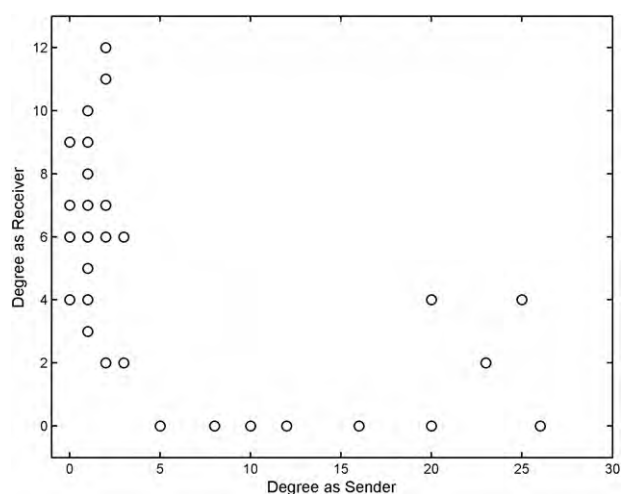
The sender-receiver asymmetry, as defined by Vetsigian and colleagues (2011), compares the variance of the antagonism and sensitivity degrees, and determines whether an interaction matrix is on average determined more by the potential of inhibition or by the sensitivity of strains (Table S1). According to this parameter, the network was sender-determined, with a sender-receiver asymmetry of -0.31. The diameter of the network, the largest number of antagonistic interactions needed to connect any two strains by the shortest path between them (Table S1), had a small value because the most disconnected strain-pairs were separated by only three antagonistic interactions (Table 1).

Once the strains could be divided as highly antagonistic and sensitive ones, the nestedness (see Table S1) of the network in respect to these groups was assessed (Bascompte *et al.*, 2003; Rodríguez-Gironés and Santamaría, 2006), resulting in a significantly nested network (Table 1; Fig. S1; $P < 0.00001$). This means that

the less connected strains tended to connect with subsets of the connections of the more connected strains. The assortativity coefficient was negative (Table 1), indicating a disassortative network. Thus, in our sample, highly antagonistic strains did not interact often with other highly antagonistic strains, while sensitive strains did not interact often with other sensitive strains (see Table S1). This is consistent with previous reports of bacterial antagonistic networks (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2013), as well as other biological networks (Newman, 2002).

The sender and receiver degrees of the strains are measures of their general ability to antagonize other strains and resist their antagonisms respectively (see Table S1). Figure 2 shows the relation between these two degrees for each strain. Within highly antagonistic strains, there was variation in antagonistic potential, as expressed by their varying sender degrees, which ranged between 5 and 26 (Fig. 2). Strains antagonizing more sensitive strains also tended to have stronger interactions, which is colour-coded in Fig. 1. This observation suggests a gradation in the aggressiveness of strains. Sensitive strains also showed variability in their resistance to antagonistic strains, with strains being affected by 2–12 other strains (Fig. 2). In general, strains with high sender degrees had low receiver degrees, and strains with high receiver degrees had low sender degrees (Fig. 2). This reinforces the observation that antagonistic strains were also highly resistant, while sensitive strain were in general not antagonist.

Interactions between highly antagonistic strains were rare but existent (Fig. 1). Similarly, some interactions occurred between sensitive strains. Moreover, few of the sensitive strains were able to affect strains classified as antagonistic. Four out of five of these inhibitions were

**Fig. 2.** Relation between sender and receiver degrees. Values were derived from counting the ingoing and outgoing connections of each strain in Fig. 1.

targeted to strain J4.2B7, even though this strain was highly antagonistic. All antagonistic interactions stemming from strains classified as sensitive were weak.

Another way of looking at the degrees of the strains is by analysing their distributions. Figure 3 shows the distributions of the sender (Fig. 3A) and receiver (Fig. 3B) degrees, as empirical cumulative distributions. For each degree value, the proportion of strains with degrees greater or equal was plotted. The shapes of these plots indicate whether the distributions follow a particular type of distribution. The sender degree of the network seemed to follow a power law type distribution (which follows a straight line in this kind of plots) in low and intermediate values; in the high-values tail, however, the cumulative distribution decayed fast (Fig. 3A). This clearly shows that the sender distribution was not 'SF' as those networks are characterized by power-law tails (Newman, 2003). The receiver degree distribution (Fig. 3B) had a curvature with fast decay, which resembled that of a randomly connected

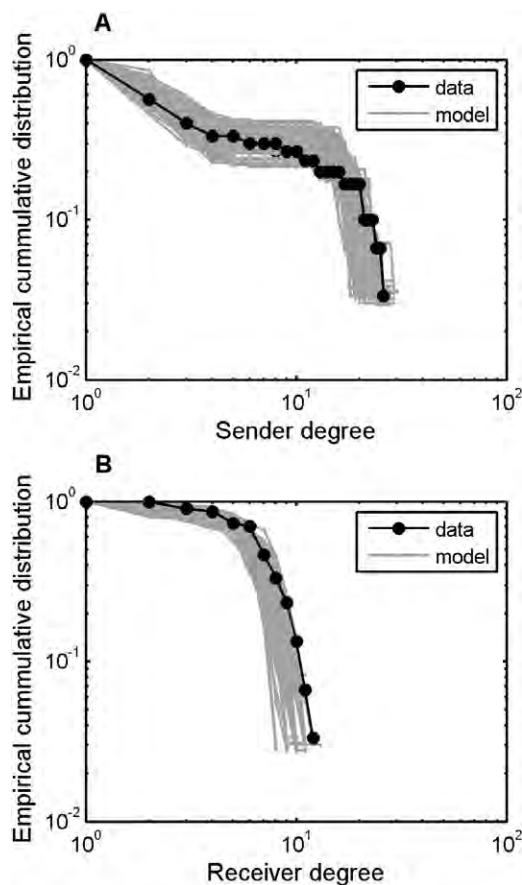


Fig. 3. Degree distribution analysis in observed and simulated networks. A. Sender distribution. B. Receiver distribution. Black dotted lines represent the observed network values. Grey lines represent values from 100 simulation runs with our model (Eqs 1 and 2). Model parameters were estimated from the observed network data and were $p = 0.5782$, $q = 0.0342$, $K = 10$.

ER network, which has a Poisson degree distribution (Strogatz, 2001; Newman, 2003).

The observed interaction network (ON; Fig. 1) and the relation between its sender and receiver degrees (Fig. 2) allowed us to build a model that distinguishes two distinct roles of the strains according to their antagonistic or sensitivity behaviours. Every strain could antagonize any other strain with a low probability q . The value of q was estimated from the data as the number of interactions observed within sensitive strains, within antagonistic strains and from sensitive strains towards antagonistic strains, divided by the possible number of such interactions, giving a value of $q = 0.0342$. Additionally, antagonistic strains affected non-antagonistic strains with a higher probability p . The value of p was estimated as the number of interactions from antagonistic strains towards sensitive strains, divided by their possible number, and was $p = 0.5782$. Thus, a probabilistic model for the interaction network was proposed, with a probability of antagonism of strain i towards strain j :

$$f(i, j) = \begin{cases} 0 & \text{if } i = j \\ p + q - pq & \text{if } i \neq j, k(i) = 1, k(j) = 0 \\ q & \text{if } i \neq j, k(i) = 0, k(j) = 0 \\ & \text{or } i \neq j, k(i) = 0, k(j) = 1 \\ & \text{or } i \neq j, k(i) = 1, k(j) = 1 \end{cases} \quad (1)$$

where $k(s)$ is 1 if strain s is antagonistic and 0 otherwise, and

$$\sum_i k(i) = K \quad (2)$$

where K is the number of antagonistic strains, which was estimated from the observed network to have a value of 10. To test whether this model adequately reproduces the structure of the ON, we conducted simulations that we called 'model random networks' (MRN). Using the q , p and K values estimated, a remarkable resemblance of the sender degree distribution was obtained (Fig. 3A). The receiver degree distributions from the simulations had slightly shorter tails than the observed network, but the shape of the distribution was very similar as well (Fig. 3B). Overall, the model reproduced the degree distribution of the observed network adequately.

Subnetworks (see Table S1) are important elements of a network structure (Butts, 2008; Vetsigian *et al.*, 2011). Of these, two-member subnetworks, or dyads, are the simplest ones. Dyads were counted in the ON and were compared with 10 000 MRN simulations. Additionally, completely random ER networks (i.e. ER random networks, *sensu* Newman, 2003) were built by assigning random connections to 37 artificial strains, keeping the number of connections equal to the one observed. The first dyad considered, where no interaction occurs, was slightly less common in the MRN than in the ER

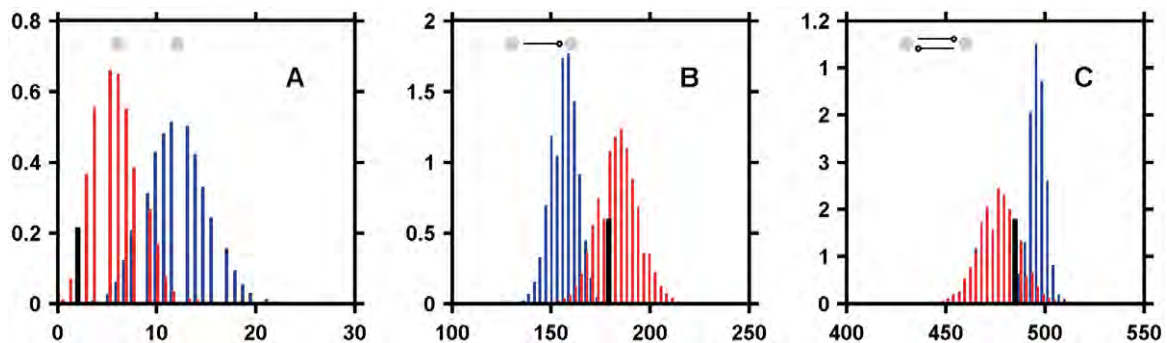


Fig. 4. Dyad frequency analysis of observed and simulated networks. Each panel (A–C) shows one of the three possible dyads. Blue histograms represent frequencies of 10 000 ER network simulations. Red histograms represent frequencies of 10 000 MRN simulations. Black bars indicate the values of the observed network. The corresponding dyads are shown in each panel for reference.

(Fig. 4A). The ON showed a similar number of non-interactions as in the lower range of the MRN distribution. Unidirectional interactions, where only one strain attacks another, were more common in the MRN and ON, as compared with ER (Fig. 4B). The dyad when the pair of strains showed direct reciprocal interactions, i.e. when both strains inhibited each other, was lower in the MRN and ON compared with the ER (Fig. 4C). Overall, the dyad count of the ON agreed more with the MRN than with the ER.

Similar to the dyad frequency analysis, a triad (see Table S1) frequency analysis was conducted by counting the 16 possible triads (Fig. 5). Several differences between the ER and the MRN triads were observed, which were also present in the ON, further supporting the model adequacy to explain the interaction network of these bacteria. Completely disconnected triads were equally common in ER and MRN networks, but MRN values were more spread (Fig. 5A). The ON values for this triad were in the upper range of MRN and larger than ER

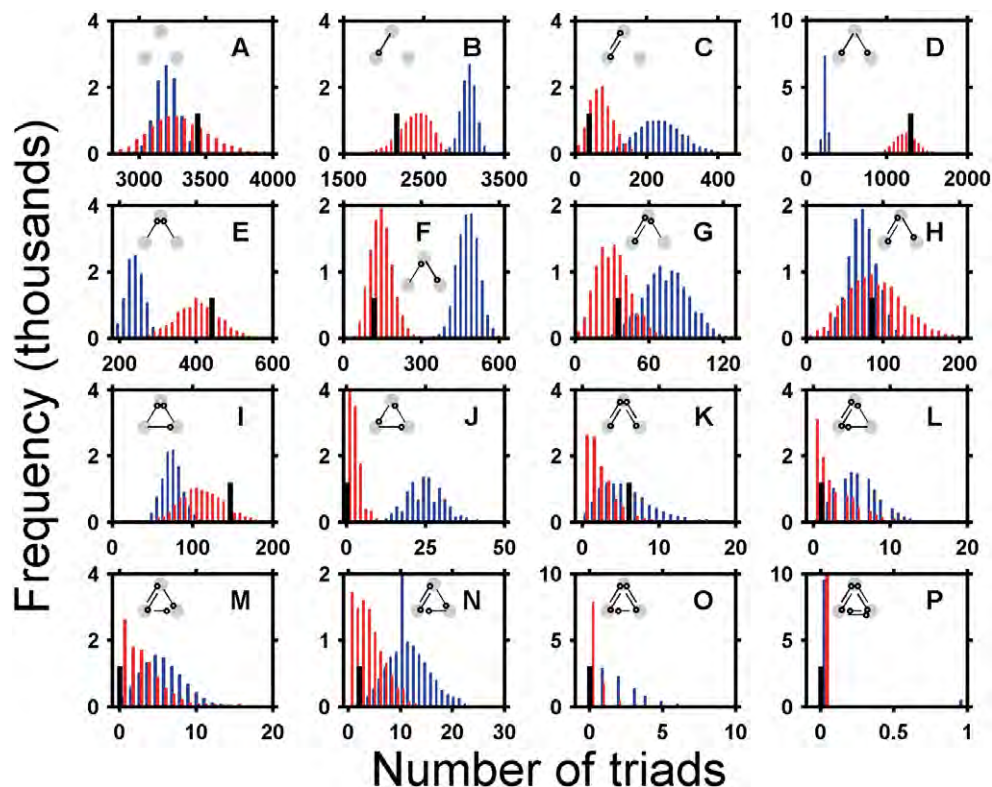


Fig. 5. Triad frequency analysis of observed and simulated networks. Each panel (A–P) shows one of the 16 possible triads. Symbols are as in Fig. 4.

values. Triads with only one antagonism or one reciprocal pair of antagonisms were under-represented in MRN and ON (Fig. 5B and C), suggesting that once an antagonistic interaction is established between a pair of strains, a third strain is not expected to be disconnected from them. Accordingly, a triad with one strain antagonizing two was overrepresented (Fig. 5D), reflecting the role of some strains as antagonists. The same was observed for the triad where one strain is antagonized by two others, which reflects the susceptibility of the non-antagonists strains (Fig. 5E). The triad where one strain is antagonized by another, but antagonizes the third one, was under-represented (Fig. 5F), indicating that this kind of interaction was rare (but existent). The triad with two strains having reciprocal antagonism, and the third one antagonizing one of them, showed a similar trend, although less pronounced (Fig. 5G), reflecting the rarity of sensitive strains attacking some of their antagonists. Exceptions involved, again, strain J4.2B7, the only antagonist strain that was sensitive to several non-antagonists. The triad where two strains showed reciprocal antagonism and a third one antagonizes one of them showed no differences between ER, MRN and ON (Fig. 5H). The triad where one strain antagonizes the two others, and one of the others antagonizes the third one, was slightly overrepresented (Fig. 5I). The triad where every strain antagonizes another and is antagonized by the other was heavily under-represented, with no occurrences in the observed network (Fig. 5J). This shows that direct non-transitivity of interactions was rare at best and could be even non-existent. The triad where one strain has reciprocal antagonism with the two others had no difference between ER, MRN and ON (Fig. 5K). Other triads with four or more antagonisms were rare or absent from ON, which was also commonly observed in ER and MRN (Fig. 5L–P), except the triad shown in Fig. 5N, which was more common in ER.

To attain a better insight on deviations of the ON from the MRN and on the stability of the system to disturbances, different values of the model parameters p and K were used for simulations, and triad counts were performed (Fig. S3). The ON values are shown in the position that corresponds to them according to the estimated values of p and K . ON values tended to be in regions of large gradients of triad count in the parameter-space (Fig. S3A–P), suggesting that the structure of the network is sensitive to changes in these parameters.

In general, triad counts were similar to the ones expected given the values of p and K . However, some exceptions were noted. The triad where two strains showed direct reciprocity, and the other did not interact was rarer than expected (Fig. S3C). The same was true for the triad where one strain inhibited another, which in turn inhibited the third one (Fig. S3F), although the difference was smaller. A large difference was observed for the

triad where each strain inhibits another and is inhibited by another, in a cyclic fashion, where again ON counts were lower than expected (Fig. S3J). Curiously, values higher than expected were observed on the triad with two strains having reciprocal interactions with the third one (Fig. S3K). This observation can again be explained by the atypical interactions of strain J4.2B7. All interaction heavy-triads had lower than expected values in ON (Fig. S3L–P). However, in these cases, both the predicted and observed values were very low and were probably affected by statistical fluctuations.

Discussion

The interaction network observed in this study consisted mainly on the inhibition of a group of sensitive strains by a different group of antagonistic ones. This is similar to some extent with Pérez-Gutiérrez and colleagues (2013), where a *Bacillus* sp. interaction network from the same site is described as hierarchical, food-chain like. However, the hierarchical network structure was not strictly maintained in our study; some generally sensitive strains affected some generally antagonistic ones. This difference in our observations and Pérez-Gutiérrez and colleagues (2013) could stem from real ecological and genetic differences between the phyla studied. Differences could also be caused by the different habitats studied because they analysed aquatic sediment samples, while our study was on water samples, and aquatic sediment and planktonic bacterial populations are in general different in the study site (Cuatro Ciénegas, Y. Ponce-Soto, Instituto de Ecología, UNAM, pers. comm.).

The degree distributions of the observed network clearly showed that the network was not 'SF' (see Table S1). A common interpretation of 'SF' degree distributions is a preferential attachment mechanism, in which new nodes of a growing network interact with higher probability with nodes already highly connected (Barbási and Albert, 1999). Thus, a preferential attachment mechanism of network formation can be ruled out in our case. Nevertheless, our network can be described as a 'small world' (Amaral *et al.*, 2000; Proulx *et al.*, 2005) because any two strains can be connected by a small number of interactions (Table 1). Furthermore, the diameters of the networks generated by our model vary logarithmically with network size (Fig. S2), which is a hallmark of small-world-type networks (Amaral *et al.*, 2000). Therefore, our example shows that small world networks can result when a fraction of the nodes are actively connecting to other nodes with high probability, like in our case are the highly antagonistic strains.

The small world properties of the interaction network imply that the decline or proliferation of one strain can potentially affect strains interacting with virtually any other

strain. Furthermore, the network seems to lack robustness to changes in model parameters, like the number of highly antagonistic strains. These results, taken together, suggest that the community structure is highly dynamic.

The network was sender-determined, implying that the antagonist strains had a larger influence on its structure than the sensitive ones. This is consistent with the only previous report available on sender-receiver asymmetry (Vetsigian *et al.*, 2011), with an estimated value numerically close to the one reported, suggesting that the sender determined asymmetry could be a common property of bacterial antagonistic interaction networks. More observations are needed to test this possibility.

The network observed in this study was highly nested, which suggests that a core of interactions between highly antagonistic and highly sensitive strains exists (Bascompte *et al.*, 2003). Less interactive strains are attached to this cohesive organization (Bascompte *et al.*, 2003) because resistant strains are antagonized only by the most aggressive strains, while strains with low antagonistic potential can still affect the most sensitive strains.

This study involved sampling a collection of bacteria from the field and analysing their antagonistic interaction network as a laboratory-controlled model of bacterial interactions in nature (Lo Giudice *et al.*, 2007; Prasad *et al.*, 2011; Vetsigian *et al.*, 2011; Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2013). This approach extends the *in silico* modelling efforts that use purely mathematical methods (Pagie and Hogeweg, 1999; Czárán *et al.*, 2002; Czárán and Hoekstra, 2003) or laboratory-engineered strains (Kerr *et al.*, 2002) by using bacteria that are actually co-existing in the field from where they were isolated.

Our study, which used the rich culture medium Luria–Bertani (LB) to determine antagonistic relations, showed the potential of interaction between certain strains, but we are aware that it might be an over-simplified situation. Future studies aimed at detecting the interactions *in situ* are needed to determine if they actually take place in the field. Another limitation of our study is the under-representation of our sample in comparison with the total community. This limitation is unavoidable in isolate-based studies because of the huge number of bacterial strains that cannot be isolated. We used bacteria growing well on the same culture conditions, as a sample of potential competitors, but it is very likely that other taxa compete and interact with them in the field as well. Although the structure of the actual interaction network in the field could be more complex, our study intends to capture the organization of the interactions of a group of closely related strains within that network. We successfully modelled the interaction network of the studied strains by using a simple probabilistic model with only three parameters, namely a background probability of interaction between any pair of strains, a high probability of interaction from

antagonistic to sensitive strains and the number of strains having that increased antagonistic potential. With this model, we were able to explore the properties of the network and its structure by running simulations with varying parameter values. Simulations realized with the model produced degree distributions that agreed well with the observed data (Fig. 3). The structure of the data was captured well by the model, as shown by subnetwork counts distributions (Figs 4 and 5). On a finer scale, small differences between the triad-count values predicted by the model and the values observed were attained (Fig. S3). Most notably, a lack of direct reciprocity of two strains, disconnected from a third one, was observed. Cycles of three strains cyclically inhibiting each other were absent (Fig. S3J), but a larger sample would be needed to assess the robustness of this observation. Nevertheless, the occurrence of this type of direct, one-dimensional reciprocity was rare even in the most favourable model parameter values (Figs 5J and S3J). This lack of direct non-transitivity does not exclude the two-dimensional non-transitivity, which also involves the relative growth rates of the strains (Pagie and Hogeweg, 1999; Czárán *et al.*, 2002; Lenski and Riley, 2002; Kerr, 2007).

The different antagonistic strains showed variations in the number of strains they affected (Fig. 2). Conversely, the number of strains affecting the different sensitive ones varied as well (Fig. 2). These two variables probably reflect, respectively, variations in the antagonistic and resistance capabilities of the individual strains. Thus, classifying the strains as sensitive and aggressive does not capture the whole complexity of the system. However, it is precisely this continuous variation that makes these variables well suitable for probabilistic modelling. While assigning random connections between strains according to fixed probabilities derived from their classification as sensitive or aggressive, the model generates strains with varying antagonistic and resistance capabilities. In this respect, it is important to note that our model does not imply that the actual interactions between pairs of strains be random. On the contrary, once an interaction is observed, it is considered fixed for that realization of the model, as an interaction between two real strains would be considered fixed, at least in the same environmental conditions and moderate timescales. Of course, at longer timescales, interactions can (and most likely do) change by evolutionary processes and horizontal gene transfer events. In that sense, our model can be viewed as a snapshot description of interactions in a given moment.

Cellular automata models have predicted two equilibrium states in multispecies RSP games (Pagie and Hogeweg, 1999; Czárán *et al.*, 2002). One of them, called multitoxicity, consists of strains with several antagonistic mechanisms, while in the other, called hyperimmunity,

most strains have only one antagonistic mechanism but are resistant to most of the antagonisms in the community. Our data are partly consistent with this last state. The antagonism profiles were different for all strains, suggesting the existence of multiple antagonism mechanisms. The interactions described by the parameter q imply that all strains have a low but positive probability of affecting others; thus, most strains are resistant to the underlying mechanisms. These mechanisms might be old, so that resistance to them may have had time to spread to a large fraction of the community. Our interpretation of q is, then, as a hyperimmunity background, on top of which the higher probability interactions represented by parameter p act.

Additionally to the older, less effective antagonistic mechanisms, some strains may evolve newer mechanisms, represented by parameter p , towards which much fewer resistant strains would be found at the present state. Thus, according to our model, strains would evolve high antagonism, and its effectiveness would decrease in time as other strains would develop resistance (and possibly share it through horizontal gene transfer), similarly to a recently proposed model (Vetsigian *et al.*, 2011). However, one important difference can be found between this biological interpretation of our model and the one of Vetsigian and colleagues (2011). In the data of Vetsigian and colleagues (2011) obtained for soil *Streptomyces*, reciprocity was the norm, while in our study of an aquatic bacterial water community of Churince, reciprocity was much less common. This resulted in high resistance of the highly antagonistic strains (Figs 1 and 2). This co-occurrence of high antagonism and high resistance could be explained if the same mechanisms used to resist their own toxicity (Michel-Briand and Baysse, 2002) were used to resist the high toxicity of other strains. Therefore, we suggest that the appearance of mechanisms that confer high antagonisms – and the corresponding resistances – in an extremely oligotrophic environment (such as the studied system) might be rare, as compared with the nutrient-rich soils studied in Vetsigian and colleagues (2011). These mechanisms could be shared with other members of the community through horizontal gene transfer, but this phenomenon has been very rarely observed in *Bacillus* from Cuatro Ciénegas (Moreno-Letelier *et al.*, 2011), where clonality seems to be the norm (Souza *et al.*, 2008; 2012; Rebollar *et al.*, 2012). Top-down network analysis allowed us to gain insight into the biology and dynamics of a bacterial interaction network.

In summary, we suggest that in our study system, antagonistic mechanisms and their corresponding resistance genes emerge rarely by evolution or migration. The strains harbouring these new antagonistic mechanisms affect a large number of strains in the community, and these genes spread either by selective pressures in the community or by rare horizontal gene transfer to other

strains. The new selective pressure promotes the spreading of resistance to most strains. Because of the cost of producing antimicrobial compounds in the extremely oligotrophic environment of our study site, most strains lose the antagonistic mechanisms, but keep the resistance genes, creating a background hyperimmunity state (Pagie and Hogeweg, 1999; Czárán *et al.*, 2002). These dynamics most likely impose a constant pressure to the members of community to evolve new antagonistic mechanism and resistance to them, thus promoting biodiversity.

Experimental procedures

Strain collection

A collection of 37 bacterial strains was isolated from water samples from a small pond, part of the Churince system, at Cuatro Ciénegas, Coahuila, Mexico (Escalante *et al.*, 2008; Cerritos *et al.*, 2011; Rodríguez-Verdugo *et al.*, 2012). These strains were isolated using PIA medium (Difco, Oxford, UK). Strains were incubated on agar plates at room temperature at the field until isolation in the laboratory. Individual colonies were transferred to LB medium (Bertani, 1951), and were grown at 30°C. Strains were purified by transferring a single colony once. All experiments were conducted at 30 ± 1°C.

The strains used were a subset of a collection for a larger population genetics study, which will be published elsewhere. They were collected at five sampling stations separated by 1–5 m from each other, with four samples taken simultaneously at each station. Samples were named with a pattern JD₁D₂LD₃, where D_x represent digits and L is a letter. J stands for the pond sampled (Jim's pond), D₁ and L represent the sampling station redundantly, D₂ the sample within that station, and D₃ the strain within that sample. For example, J2.4D1 is the first strain isolated from the fourth sample of the second station. Strains from the same sample were obtained from a 1 ml subsample of a 50 ml sample.

DNA extraction, amplification and sequencing

Phylogenetic identification of the strains was performed using 16S rRNA (ribosomal RNA) gene DNA amplification and sequencing. DNA was extracted according to Aljanabi and Martinez (1997). Alternatively, DNA was extracted for some strains using the kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen™, Germantown, MD, USA), according to the manufacturer's instructions. 16S rRNA genes were amplified using universal primers (Lane, 1991) 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') and high fidelity *Phusion* hot start DNA polymerase (Finnzymes, Vantaa, Finland). Amplification products were electrophoresed on 1% agarose gels. Sanger sequencing was performed using an ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) at the University of Washington High Throughput Genomics Center. The sequences have been uploaded to GenBank, with accession numbers KF317734-KF317770.

Phylogenetic analysis and strain identification

The 16S rRNA sequences were aligned with MUSCLE (Edgar, 2004), and the alignment was revised manually. For the reconstruction of the phylogenetic tree, a maximum likelihood analysis was done with RAXML-HPC2 version 7.6.3 on Cyberinfrastructure for Phylogenetic Research (CIPRESS) with the General Time Reversible (GTR) + CAT likelihood function (Stamatakis, 2006; Miller *et al.*, 2010). In addition to the main tree, 1000 trees were generated from bootstrap samples, and bootstrap support values were calculated by RAXML. For genus level identification of the strains, we used the classifier tool (Wang *et al.*, 2007) from the Ribosomal Database Project Release 10, update 30 (Cole *et al.*, 2009).

Antagonistic interaction assays

Antagonistic interactions were tested with the Burkholder 'spot-on-lawn' test (Burkholder *et al.*, 1966) using LB agar. Briefly, a lawn of the strain tested for sensibility was created by mixing 2.5 ml of exponentially growing cultures (Optical Density at 600 nm 0.4–0.7) with liquid soft agar LB medium and pouring the mix on the surface of an LB agar plate. When the 'lawn' agar hardened, a drop of overnight culture of the potentially antagonistic strain was added on top. In every case, it was verified that the culture had become turbid by visual inspection. Plates were inspected for inhibition halos around the drops after 16–20 h incubation. Strains were confronted by pairs to obtain a full interaction matrix of all strains against each other. Each interaction was tested at least two times. The presence of interaction was rated subjectively on each observation from 0 (no interaction) to 5 (exceptionally marked interaction with a large inhibition halo). Figure S4 shows examples of inhibition halos and the values assigned to them. A value of 1 was assigned when the interaction was barely visible. Eighty per cent of the observations were carried out by two or more observers. Values were averaged, and a value strictly greater than 1 was considered a positive interaction. Inhibition halos were observed at least two times in 94% of the positive interactions reported. In the remaining 6% of the cases, a strong interaction was observed once. The interaction assays were performed using a blind experimental setup; the evaluator recorded the position of each observed spot on the agar plate but did not know which pair of strains was being evaluated. Thus, results were considered semiquantitative, with higher values reflecting a stronger effect on the antagonized strain.

Network analysis, simulations and parameter space analysis

Network analysis was conducted using custom Matlab (The Mathworks, Natick, MA, USA) programming. Interaction density was calculated as the number of interactions observed divided by the number of possible interactions, which is determined by the number of strains (Vetsigian *et al.*, 2011). This value ranges from 0, when no strains are connected, to 1 when all strains interact with all strains. Out-degrees and in-degrees were calculated as the number of strains antagonizing and antagonized by every strain respec-

tively (Newman, 2003; Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2013). Thus, a strain with a larger in-degree was considered more sensitive, while a strain with a larger out-degree was considered more antagonistic. Network diameter was calculated as the longest path connecting any two strains (Newman, 2003). Nestedness was calculated as defined in Bascompte and colleagues (2003) using the algorithm of Rodríguez-Gironés and Santamaría (2006). The assortativity coefficient was calculated as defined in Newman (2002).

According to the observed properties of the interaction network, a model was constructed and used to perform simulations. Details of the model and its parameters are presented in the Results section. Additionally, ER random networks were constructed (Newman, 2003). Simulations were run using pseudorandom number generating functions from Matlab. The degree distribution of the observed network was compared with 100 simulation runs. Two-member subnetworks, known as dyads (Butts, 2008), were counted by considering all pairs of strains and determining the type of dyad they formed, according to their interaction. Similarly, three member subnetworks, or triads, were counted from every combination of three strains in the network. Dyad and triad-count distributions were compared with 10 000 simulations.

To understand the effect of different parameters values on network properties, values were modified in the model, and simulations were run. In this parameter space analysis, parameter q , which describes a background probability of interaction between any two strains, was kept fixed at the value estimated from the observed network ($q = 0.0342$, see Results section). Simulations were performed with varying values of parameter p , which describes an additional probability of antagonism of highly antagonistic bacteria towards sensitive bacteria, and K , which is the number of highly antagonistic bacteria (see Results section for details). Values of p ranged from 0 to 1 in increments of 0.01, and values of K ranged from 1 to 37, with integer values. Simulations were performed at each combination of these two parameters' values, with 1000 replications.

Acknowledgements

This study was conducted with financial support from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, Mexico 128673) to GS and grants given to VS by Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIT IN203712) and another grant given to VS by Alianza WWF-Fundación Carlos Slim. We thank Abigaíl González-Valdéz, Erika Aguirre-Planter, Laura Espinosa-Asuar and Miguel Ángel Aguilar-Gómez for technical assistance, and Dr. Gabriela Olmedo, Dr. Germán Bonilla-Rosso and Dr. Luis Servin-González for insightful discussions of the data. We thank two anonymous reviewers for their comments, which contributed to the improvement of the manuscript.

References

- Aljanabi, S.M., and Martinez, I. (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res* **25**: 4692–4693.

- Amaral, L.A.N., Scala, A., Barthélemy, M., and Stanley, H.E. (2000) Classes of small-world networks. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 11149–11152.
- Barbási, A.L., and Albert, R. (1999) Emergence of scaling in random networks. *Science* **286**: 509–512.
- Bascompte, J., Jordano, P., Melián, C.J., and Olesen, J.M. (2003) The nested assembly of plant-animal mutualistic networks. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 9383–9387.
- Bertani, G. (1951) Studies on lysogeny. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **62**: 293–300.
- Burkholder, P.R., Pfister, R.M., and Leitz, F.H. (1966) Production of a pyrrole antibiotic by a marine bacterium. *Appl Microbiol* **14**: 649–653.
- Butts, C.T. (2008) Social network analysis: a methodological introduction. *Asian J Soc Psychol* **11**: 13–41.
- Cerritos, R., Eguiarte, L.E., Avitia, M., Siefert, J., Travisano, M., Rodríguez-Verdugo, A., and Souza, V. (2011) Diversity of culturable thermo-resistant aquatic bacteria along an environmental gradient in Cuatro Ciénegas, Coahuila, México. *Antonie Van Leeuwenhoek* **99**: 303–318.
- Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R.J., *et al.* (2009) The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* **37**: D141–D145.
- Cordero, O.X., Wildschutte, H., Kirkup, B., Proehl, S., Ngo, L., Hussain, F., *et al.* (2012) Ecological populations of bacteria act as socially cohesive units of antibiotic production and resistance. *Science* **337**: 1228–1231.
- Czárán, T.L., and Hoekstra, R.F. (2003) Killer-sensitive coexistence in metapopulations of micro-organisms. *Proc Biol Sci* **270**: 1373–1378.
- Czárán, T.L., Hoekstra, R.F., and Pagie, L. (2002) Chemical warfare between microbes promotes biodiversity. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 786–790.
- Edgar, R.C. (2004) Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* **32**: 1792–1797.
- Escalante, A.E., Eguiarte, L.E., Espinosa-Asuar, L., Forney, L.J., Noguez, A.M., and Souza Saldivar, V. (2008) Diversity of aquatic prokaryotic communities in the Cuatro Cienegas basin. *FEMS Microbiol Ecol* **65**: 50–60.
- Frean, M., and Abraham, E.R. (2001) Rock-scissors-paper and the survival of the weakest. *Proc Biol Sci* **268**: 1323–1327.
- Kerr, B. (2007) The ecological and evolutionary dynamics of model bacteriocin communities. In *Bacteriocins: Ecology and Evolution*. Riley, M.A., and Chavan, M.A. (eds). Berlin, Germany: Springer-Verlag, pp. 111–134.
- Kerr, B., Riley, M.A., Feldman, M.W., and Bohannan, B.J. (2002) Local dispersal promotes biodiversity in a real-life game of rock-paper-scissors. *Nature* **418**: 171–174.
- Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Stackebrandt, E., and Goodfellow, M. (eds). New York, USA: John Wiley and Sons, pp. 115–175.
- Lenski, R.E., and Riley, M.A. (2002) Chemical warfare from an ecological perspective. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 556–558.
- Lo Giudice, A., Brillì, M., Bruni, V., De Domenico, M., Fani, R., and Michaud, L. (2007) Bacterium-bacterium inhibitory interactions among psychrotrophic bacteria isolated from Antarctic seawater (Terra Nova Bay, Ross Sea). *FEMS Microbiol Ecol* **60**: 383–396.
- Long, R.A., Eveillard, D., Franco, S.L., Reeves, E., and Pinckney, J.L. (2013) Antagonistic interactions between heterotrophic bacteria as a potential regulator of community structure of hypersaline microbial mats. *FEMS Microbiol Ecol* **83**: 74–81.
- Massey, R.C., Buckling, A., and French-Constant, R. (2004) Interference competition and parasite virulence. *Proc Biol Sci* **271**: 785–788.
- Michel-Briand, Y., and Baysse, C. (2002) The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie* **84**: 499–510.
- Miller, M.A., Pfeiffer, W., and Schwartz, T. (2010) Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic tree. In *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, New Orleans, LA, USA. Anonymous (ed.). New York, NY, USA: Institute of Electrical and Electronics Engineers (IEEE), pp. 1–8.
- Moreno-Letelier, A., Olmedo, G., Eguiarte, L.E., Martínez-Castilla, L., and Souza, V. (2011) Parallel evolution and horizontal gene transfer of the *pst* operon in firmicutes from oligotrophic environments. *Int J Evol Biol* **2011**: Article ID 781642.
- Newman, M.E.J. (2002) Assortative mixing in networks. *Phys Rev Lett* **89**: Article ID 208701.
- Newman, M.E.J. (2003) The structure and function of complex networks. *SIAM Rev* **45**: 167–256.
- Pagie, L., and Hogeweg, P. (1999) Colicin diversity: a result of eco-evolutionary dynamics. *J Theor Biol* **196**: 251–261.
- Pérez-Gutiérrez, R.A., López-Ramírez, V., Islas, A., Alcaraz, L.D., Hernández-González, I., Olivera, B.C., *et al.* (2013) Antagonism influences assembly of a *Bacillus* guild in a local community and is depicted as a food-chain network. *ISME J* **7**: 487–497.
- Prasad, S., Manasa, P., Buddhi, S., Singh, S.M., and Shivaji, S. (2011) Antagonistic interaction networks among bacteria from a cold soil environment. *FEMS Microbiol Ecol* **78**: 376–385.
- Proulx, S.R., Promislow, D.E., and Phillips, P.C. (2005) Network thinking in ecology and evolution. *Trends Ecol Evol* **20**: 345–353.
- Rebollar, E.A., Avitia, M., Eguiarte, L.E., González-González, A., Mora, L., Bonilla-Rosso, G., and Souza, V. (2012) Water-sediment niche differentiation in ancient marine lineages of *Exiguobacterium* endemic to the Cuatro Cienegas Basin. *Environ Microbiol* **14**: 2323–2333.
- Rodríguez-Gironés, M.A., and Santamaría, L. (2006) A new algorithm to calculate the nestedness temperature of presence-absence matrices. *J Biogeogr* **33**: 924–935.
- Rodríguez-Verdugo, A., Souza, V., Eguiarte, L.E., and Escalante, A.E. (2012) Diversity across seasons of culturable *Pseudomonas* from a desiccation lagoon in Cuatro Cienegas, Mexico. *Int J Microbiol* **2012**: Manuscript ID 201389.
- Rypien, K.L., Ward, J.R., and Azam, F. (2010) Antagonistic interactions among coral-associated bacteria. *Environ Microbiol* **12**: 28–39.
- Souza, V., Eguiarte, L.E., Siefert, J., and Elser, J. (2008) Microbial endemism: does extreme nutrient limitation enhance speciation? *Nat Rev Microbiol* **6**: 559–564.

- Souza, V., Eguiarte, L.E., Travisano, M., Elser, J.J., Rooks, C., and Siefert, J.L. (2012) Travel, sex, and food: what's speciation got to do with it? *Astrobiology* **12**: 634–640.
- Stamatakis, A. (2006) RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* **22**: 2688–2690.
- Strogatz, S.H. (2001) Exploring complex networks. *Nature* **410**: 268–276.
- Validov, S., Mavrodi, O., De La Fuente, L., Boronin, A., Weller, D., Thomashow, L., and Mavrodi, D. (2005) Antagonistic activity among 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. *FEMS Microbiol Lett* **242**: 249–256.
- Vetsigian, K., Jajoo, R., and Kishony, R. (2011) Structure and evolution of *Streptomyces* interaction networks in soil and in silico. *PLoS Biol* **9**: e1001184.
- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., and Cole, J.R. (2007) Naïve bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* **73**: 5261–5267.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

Fig. S1. Nestedness analysis matrix. Rows represent antagonist strains and columns represent sensitive strains. Rows and columns were ordered with the algorithm of Rodríguez-Gironés and Santamaría (2006) to maximize nestedness visually. Black squares represent antagonistic interactions from the corresponding rows to the corresponding columns.

Fig. S2. Network diameter as a function of network size in simulated networks using our model (Eqs 1 and 2). Values (black dots) are means of 100 simulations. The grey line indicates a logarithmic fit [$y = 0.551\log(x) + 1.3182$]. Logarithmic increase of the network diameter with network size is a hallmark of small-world-type networks (Amaral *et al.*, 2000).

Fig. S3. Parameter space analysis of observed and simulated networks. Shades represent triad counts with different parameter combinations, for the 16 possible triads (A–P), according to the corresponding scale above each panel. For parameter space resolution and simulation numbers, see Experimental procedures. Red circles are located in the axes according to the values observed in the actual network. Shades inside these circles indicate the observed triad counts.

Fig. S4. Example of the scale used. Values below the images show the rating assigned to each image.

Table S1. Brief explanation of network analysis terms used in the manuscript.

Table S2. Abbreviated versus full strain names.

Supplementary Material

Two-role model of an interaction network of free-living γ -proteobacteria from an oligotrophic environment

Eneas Aguirre-von-Wobeser,^{1,2} Gloria Soberón-Chávez,¹ Luis E. Eguiarte,² Gabriel Yaxal Ponce-Soto,^{1,2} Mirna Vázquez-Rosas-Landa² and Valeria Souza²

¹ Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas

² Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico, Mexico.

* **Correspondence:** Eneas Aguirre-von-Wobeser. Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas. Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico, Mexico.

Table S1. Abbreviated vs. full strain names:

Abbreviated name	Full strain name
1A6	J5.1A6
1B6	J4.1B6
1B7	J4.1B7
1B8	J4.1B8
1C11	J3.1C11
1C9	J3.1C9
1D12	J2.1D12
1D4	J2.1D4
1D6	J2.1D6
1D8	J2.1D8
1D9	J2.1D9
1E10	J1.1E10
1E2	J1.1E2
1E3	J1.1E3
1E6	J1.1E6
1E7	J1.1E7
1E8	J1.1E8
2A1	J5.2A1
2A4	J5.2A4
2B1	J4.2B1
2B4	J4.2B4
2B7	J4.2B7
2C1	J3.2C1
2C2	J3.2C2
2C5	J3.2C5
2C8	J3.2C8
2C9	J3.2C9
2D8	J2.2D8
2D9	J2.2D9
2E4	J1.2E4
3E2	J1.3E2
3E3	J1.3E3
4A4	J5.4A4
4B2	J4.4B2
4B3	J4.4B3
4B8	J4.4B8
4D1	J2.4D1

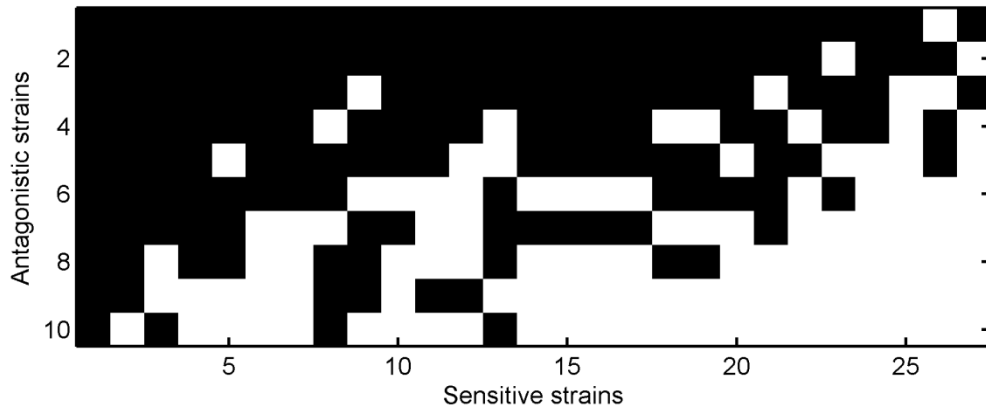


Figure S1. Nestedness analysis matrix. Rows represent antagonist strains and columns represent sensitive strains. Rows and columns were ordered with the algorithm of Rodríguez-Gironés & Santamaría (2006) to maximize nestedness visually. Black squares represent antagonistic interactions from the corresponding rows to the corresponding columns.

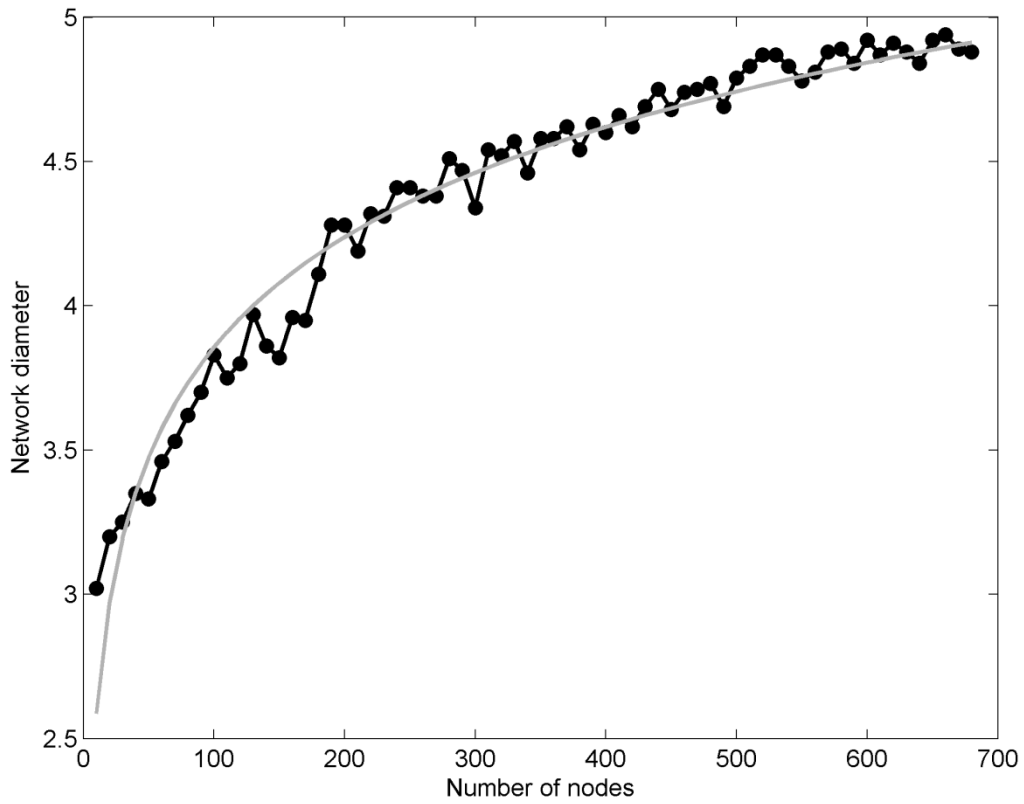


Figure S2. Network diameter as a function of network size in simulated networks using our model (Equations 1 and 2). Values (black dots) are means of 100 simulations. The grey line indicates a logarithmic fit ($y = 0.551\log(x) + 1.3182$). Logarithmic increase of the network diameter with network size is a hallmark of small-world type networks (Amaral *et al.*, 2000).

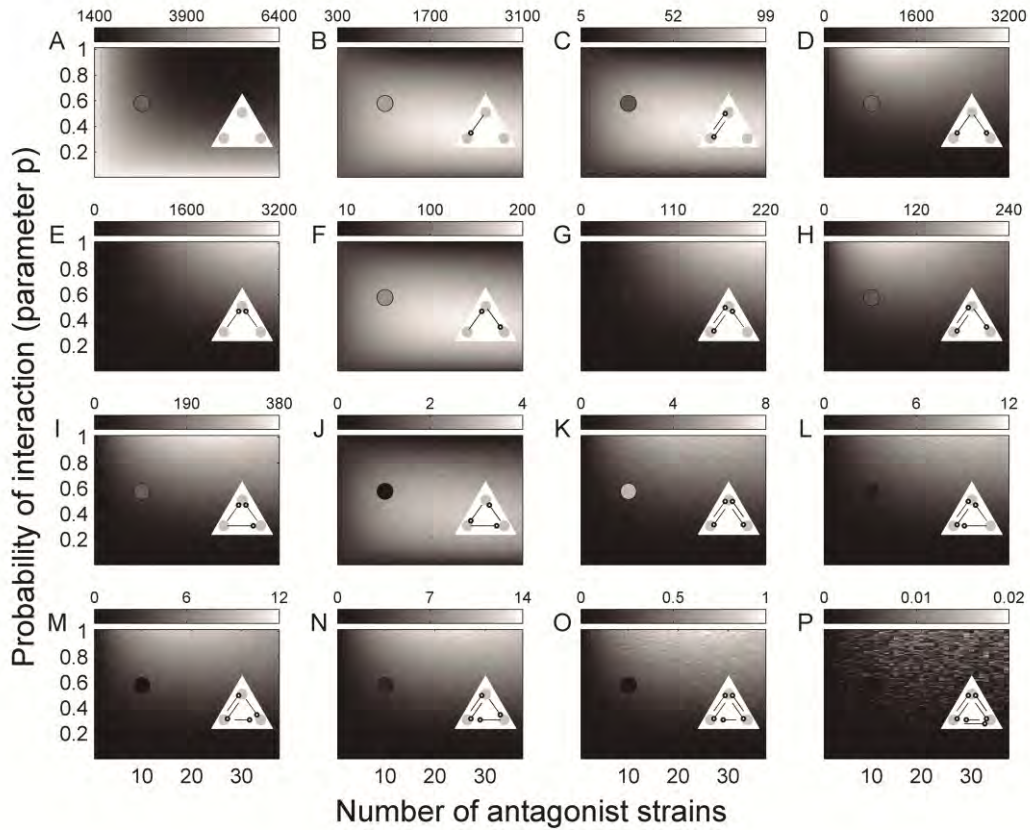


Figure S3. Parameter space analysis of observed and simulated networks. Shades represent triad counts with different parameter combinations, for the sixteen possible triads (A to P), according to the corresponding scale above each panel. For parameter space resolution and simulation numbers see Methods.

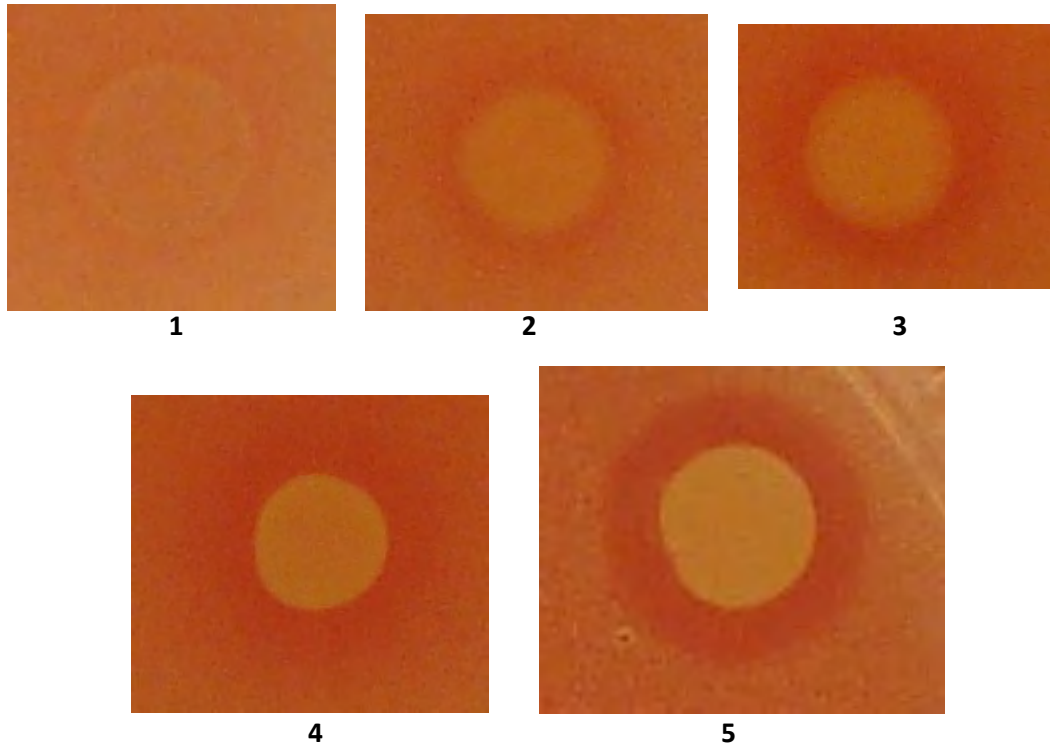


Figure S4. Example of the scale used. Values below the images show the rating assigned to each image.

Capítulo 5. Discusión y conclusiones

Para poder entender la diversidad tanto a nivel genético como ecológico que encontramos en los procariontes, es necesario comprender los mecanismos que han generado esta diversidad. Uno de los principales factores involucrados en la generación y mantenimiento de la diversidad en los ecosistemas, es la interacción entre los organismos. En la naturaleza existen diversos tipos de interacciones tales como el amensalismo, comensalismo, parasitismo, entre los más relevantes, sin embargo la competencia y cooperación son dos de los procesos más importantes. La competencia y la cooperación se encuentran mediadas en gran parte por la disponibilidad de recursos, por lo cual una alteración en esta disponibilidad se verá reflejada en la frecuencia y tipo de interacciones en un ambiente determinado, y que de igual manera se verá reflejada en la diversidad. La eutroficación de los cuerpos de agua es uno de los problemas más distribuidos a nivel global y se encuentra ligado principalmente a la actividad humana debido al uso de fertilizantes químicos, desague de sistemas de alcantarillado, etcétera (Schindler, 2012). Esta eutroficación se ha estudiado principalmente por el impacto que tiene en las explosiones de crecimiento de algas y las muertes de peces, sin embargo es también de gran relevancia conocer el efecto que éstos enriquecimientos pueden llegar a tener en las comunidades bacterianas, sobre todo en cuerpos de agua naturalmente limitadas en nutrientes, y en particular la manera en que éstas comunidades interactúan entre ellas (Schindler, 2012).

Tomando en cuenta lo anterior, el trabajo presentado en esta tesis tuvo como eje principal las siguientes preguntas:

- ¿Cómo se modifica la estructura y las interacciones de la comunidad bacteriana en respuesta a un enriquecimiento con nitrógeno y fósforo?
- ¿Qué efectos tiene la entrada de nutrientes en una comunidad oligotrófica a nivel genoma?

Para contestar estas preguntas, se montó un experimento de mesocosmos en el cual se manejaron cuatro tratamientos: un tratamiento control (C), un tratamiento enriquecido con 1 μM de fósforo (P) y dos tratamientos enriquecidos con nitrógeno y fósforo para llevarlos a una

proporción N:P de 16:1 (NP) y 75:1 (NNP). En primer lugar se analizaron los cambios en la composición de la comunidad microbiana al contrastar la diversidad y características fisiológicas tales como la formación de *biofilms* y resistencia a antibióticos entre la comunidad antes y después de un periodo de enriquecimiento. En segundo lugar una sub-muestra de las cepas estudiadas fue secuenciada y analizada para buscar señales a nivel genoma de su respuesta a la entrada de nutrientes en un sistema oligotrófico. El análisis de las cepas obtenidas en este trabajo, nos permitió entender los efectos de un enriquecimiento con nutrientes en una poza oligotrófica en cuanto a la composición de la comunidad microbiana cultivable así como modificaciones en la red de interacciones entre los aislados cultivados. En concordancia con lo reportado en trabajos anteriores para el sistema Churince así como para otros sitios en el valle de Cuatro Ciéneas, la clase Gamma-Proteobacteria fue la clase cultivable más abundante en el medio de cultivo utilizado (Souza et al., 2006; Escalante et al., 2009). A pesar de las diversas metodologías empleadas en la extracción de DNA y posterior amplificación del gen 16S rRNA, una alta proporción de los aislados no pudieron ser caracterizados, pues las bacterias de Cuatro Ciéneas producen compuestos que dificultan la extracción de DNA o inhiben las reacciones de PCR, situación que se ha observado tanto para aislados bacterianos, como para muestras ambientales. Mediante este trabajo, se confirmó que nuestro sitio de estudio dentro del sistema Churince, la poza Lagunita, se encuentra limitada en P. Esta conclusión deriva del hecho de que una gran proporción del P adicionado durante el tratamiento de enriquecimiento que permaneció en la columna de agua fue inmovilizado en el *seston* que es el conjunto de materia que está flotando en el agua, ya sea viva o no viva. Esto se puede observar por el hecho que el fósforo total disuelto y el fósforo reactivo soluble no se vieron modificados significativamente respecto al control, en contraste con el fósforo en el *seston* y el fósforo total, los cuales presentaron diferencia. Con respecto al nitrógeno total disuelto, no se encontraron diferencias significativas entre ambos tratamientos enriquecidos con nitrógeno, NP y NNP (Lee et al., 2015).

A partir de la clasificación taxonómica de las secuencias de 16S rRNA de las cepas cultivadas, un total de 6 géneros fueron identificados en agua, *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Rheinheimera*, *Shewanella*, *Aeromonas* y *Halomonas*, mientras que en sedimento se identificaron 5 géneros, *Rhizobium*, *Stenotrophomonas*, *Brachybacterium*, *Halomonas* y *Kocuria*. Se encontró que dos géneros de Gamma-Proteobacterias respondieron al incremento de

nutrientes, *Pseudomonas* en agua y *Halomonas* en sedimento, en contraste con géneros como *Citrobacter*, *Rheinheimera* y *Shewanella* en agua, y *Stenotrophomonas* y *Brachybacterium* en sedimento, pues éstos a pesar de haber sido aislados durante el tiempo cero, no se aislaron en las muestras correspondientes al periodo posterior al enriquecimiento. Es importante hacer notar también que el género *Kocuria*, el cual no fue identificado en los aislados correspondientes al tiempo cero, se encontró en los tratamientos P y NP. Esto puede explicarse debido a que el género *Kocuria* ha sido reportado como un habitante raro en este sitio (Cerritos et al., 2010) y bien pudo verse favorecido con la entrada de fósforo al ambiente.

Las modificaciones en la presencia y abundancia de estos distintos grupos bacterianos durante el periodo de enriquecimiento, sugieren un cambio en cuanto a la composición de la comunidad bacteriana. Respecto a este punto y debido a la naturaleza de nuestro sitio, se puede proponer que la comunidad original en Lagunita se encontraba dominada por los denominados estrategas-K, los cuáles tienden a una supervivencia a largo plazo en ambientes limitados en recursos (Pianka, 1970, Fuchs et al., 2000, Singer et al., 2011). En contraste, al finalizar el periodo de enriquecimiento, la comunidad microbiana presente en nuestro sitio de estudio se encontró dominada por Gamma-Proteobacterias de rápido crecimiento que pueden ser consideradas estrategas-r, los cuales explotan rápidamente los nutrientes y una vez agotados pueden morir o entrar en un estado de latencia (Fontaine et al., 2003). Este hecho concuerda con lo reportado previamente para el género *Pseudomonas*, el cual ha sido descrito como un estratega-r pues presentan la capacidad de crecer rápidamente en ambientes ricos en nutrientes debido a su versatilidad metabólica (Hallsworth et al., 2003; Domínguez-Cuevas et al., 2006). El cambio observado en este estudio para la comunidad bacteriana concuerda con lo reportado previamente. Fontaine y colaboradores encontraron que los estrategas-K utilizan una mayor proporción de energía para interactuar de una manera más amplia con su medio ambiente como puede ser por ejemplo la producción de enzimas extracelulares o mecanismos de defensa (Fontaine et al., 2003). En nuestro trabajo este cambio se observó primordialmente en la resistencia a antibióticos, la cual se vio disminuía en los aislados posteriores al enriquecimiento así como el cambio en la composición de la comunidad bacteriana.

Si bien este experimento mostró una reducción tanto en la diversidad de los géneros aislados como en las interacciones entre las cepas, no se encontró una respuesta generalizada, sino más bien cada uno de los aislados respondió de manera particular al tratamiento de enriquecimiento independientemente de su phylum. El ejemplo más claro de este hecho, es el caso del género *Pseudomonas* en los aislados de agua. En este experimento se identificaron dos clados del género *Pseudomonas*, el clado *P. aeruginosa* y el clado *P. fluorescens*. Las cepas caracterizadas pertenecientes al clado de *P. fluorescens* fueron aisladas tanto en el tiempo cero, como después del periodo de enriquecimiento en el control y en el tratamiento enriquecido por P. Por otra parte, las cepas pertenecientes al clado de *P. aeruginosa* respondieron a más de un solo tratamiento, ya que fueron caracterizadas además de en el tiempo cero, en los tratamientos de enriquecimiento con P y de N:P en proporción 75:1. La disponibilidad de fósforo en un ambiente cotidianamente limitado en éste, pudo favorecer una respuesta en el crecimiento y consiguiente dominancia de *Pseudomonas*, género que se ha reportado es capaz de solubilizar fósforo (Parani and Saha, 2012). Por otra parte, en el sedimento al igual que en las muestras de agua, se encontró un género dominante, *Halomonas*. En contraste con el género *Pseudomonas* que fue encontrado exclusivamente en un ambiente, *Halomonas* fue encontrado tanto en agua, al tiempo cero, como en sedimento, posterior al enriquecimiento. La respuesta de este género se dio para ambos tratamientos enriquecidos con nitrógeno y fósforo, lo cual es consistente con el hecho de ser capaz de llevar a cabo la denitrificación (Mormille et al., 1999), por lo cual podría verse favorecido al poder utilizar el NO_3 adicionado en los tratamiento NP y NNP. Así mismo, en el sedimento se encontró también un género que fue capaz de responder a dos tratamientos distintos, el género *Kocuria*. Este género que no fue encontrado en los aislados de tiempo cero, respondió a los tratamientos de enriquecimiento con P y N:P en proporción 16:1 y ha sido reportado como un género denitrificante (Kovács et al., 1999).

Como se mencionó anteriormente, la competencia y cooperación entre organismos son dos procesos que se encuentran mediados por la disponibilidad de recursos. La competencia se da cuando dos o más especies comparten el mismo recurso limitante, siendo éstos principalmente fuentes de energía, de carbono y espacio, lo cual trae como consecuencia una inhibición en el crecimiento de alguna de las especies involucradas. Por otro lado, en la cooperación ambos individuos se ven beneficiados, esto puede darse por ejemplo mediante una cascada en el

consumo de los productos metabólicos. En aquellas interacciones por cooperación, la estructuración o ausencia de ésta en un ambiente puede limitar la aparición y dispersión de los denominados *cheaters*, individuos que se ven beneficiados por el resto de la comunidad sin aportar a ésta.

La producción de compuestos químicos inhibitorios tales como antibióticos o bacteriocinas es uno de los mecanismos de antagonismo más distribuidos entre los microorganismos (Riley and Gordon, 1999; Lenski and Riley, 2002; Hibbing et al., 2010; Majeed et al., 2011; Pérez-Gutiérrez et al., 2013; Aguirre-von-Wobeser et al., 2014). Si bien la producción de un antibiótico o toxina por parte de un microorganismo le proporciona una ventaja competitiva, ésta involucra un doble costo pues no sólo necesita producir dicho compuesto inhibitorio, sino que también debe producir su resistencia, por lo cual es de esperarse que el costo asociado a su producción y resistencia sea menor que la ventaja obtenida. Cada gen tiene un costo asociado, el cual se puede dividir en tres niveles: (i) replicación y mantenimiento en el cromosoma, (ii) transcripción y procesamiento de los transcritos, y (iii) traducción y ensamblado de las proteínas (Lynch and Marinov, 2015; Kempes et al., 2017). Estos tres niveles a su vez, tienen un impacto en las tasas de crecimiento celular en el ambiente, las tasas de consumo de recursos, ATP, volumen celular, etc., los cuáles se han propuesto ser estimados a partir de modelos matemáticos (Lynch and Marinov, 2015). En este trabajo con el objetivo de estudiar los cambios en las interacciones bacterianas, se analizó la resistencia en la colección de 960 aislados bacterianos a cinco antibióticos de amplio espectro: Carbenicilina, Kanamicina, Tetraciclina, Estreptomicina y Gentamicina. Al analizar la prevalencia de resistencias se encontró una reducción para la totalidad de los tratamientos, a excepción de la Carbenicilina, la cual mostró un incremento significativo en las muestras de sedimento y en dos de los tratamientos de agua sedimentado (Ponce-Soto et al., 2015; Figura 2, Tabla 3). Esta disminución de resistencias a antibióticos probablemente refleje cambios en las estrategias de sobrevivencia para poder lidiar con las modificaciones en su ambiente, siendo en este caso la reducción en las relaciones antagónicas entre las cepas.

Para una submuestra conformada por 37 de los aislados del tiempo cero se analizó la matriz de interacciones, sugiriendo que dichas interacciones están dadas principalmente por una

competencia por los recursos (Aguirre-von-Wobeser et al., 2014). Czárán y colaboradores (2002) describen que en el modelo no transitivo de piedra-papel-tijeras (RSP) al estar involucradas más de tres especies en un ambiente con una estructura espacial se alcanzará un estado de hiper inmunidad, en el que la mayoría de las cepas producirán pocas toxinas, pero sin embargo serán resistentes a varias toxinas. Estos dos antecedentes en conjunto, nos arrojan una luz sobre el mecanismo subyacente a la comunidad bacteriana estudiada. La dinámica de la comunidad bacteriana en este sitio está dada principalmente por la competencia por los recursos al ser éste un sitio limitado en nutrientes. Aquí, al comparar la comunidad bacteriana original, previa al enriquecimiento, encontramos que un estado de hiper inmunidad era la constante para el sistema analizado, sin embargo, al eliminar la limitación de nutrientes, dicho estado de hiper inmunidad se perdió para dar paso a una comunidad dominada por cepas mayoritariamente sensibles.

La pérdida de las resistencias entre los diferentes tratamientos y géneros aislados puede ser vista bajo la luz del denominado “mercado microbiano” (Werner et al., 2014). La teoría del mercado biológico establece que el intercambio de recursos y servicios entre organismos se puede entender desde la perspectiva de una inversión, la cual tiene como objetivo final el maximizar las ganancias. En nuestro caso particular de estudio, como se mencionó anteriormente, el producir y mantener la resistencia hacia una toxina o antibiótico determinado acarrea por sí mismo un costo metabólico. Este costo metabólico, en la comunidad no perturbada, trae consigo la ventaja de eliminar la competencia por los nutrientes para el caso de las cepas productoras, y la de superar a las productoras para las cepas resistentes. Esto sin embargo deja de tener un beneficio en una comunidad en la cual no existe esta limitación de nutrientes, pues ahora aquellas cepas sensibles que no invierten recursos en mantener la producción ni la resistencia son capaces de superar a los otros dos grupos. Czárán y colaboradores observaron éste comportamiento de dominancia hacia una comunidad mayoritariamente sensible en ambientes estructurados, pues encontraron que la predicción de los vecinos es un factor importante para determinar la producción de toxinas, sin embargo en nuestro caso, dicho comportamiento se encontró para ambos ambientes estudiados, agua y sedimento, lo que sugiere que el hecho de predecir a los organismos vecinos no es un requisito para el antagonismo en este sistema.

Esta misma teoría de mercado microbiano sugiere que el ambiente local es quien determina las interacciones entre los organismos involucrados (Werner et al., 2014), por lo cual la importancia de analizar la capacidad de formación de *biofilms*, pues estos agregados microbianos proporcionan dicho ambiente tanto en agua como en sedimento. Para que se dé la formación de *biofilms* debe existir una coordinación entre las bacterias para regular su desarrollo, desde el acondicionamiento hasta su adhesión y maduración (Zschiesche and Humbeck, 2014). Las bacterias que se localizan dentro de la matriz extracelular de un *biofilm* se encuentran en cierta medida aisladas de factores ambiental como la desecación o la limitación de nutrientes (Danhorn et al., 2004), sin embargo dentro de un *biofilm* se espera que se den frecuentemente interacciones complejas como por ejemplo relaciones mutualistas, dado que la secreción de la matriz de exopolisacáridos representa un bien público que incrementa la sobrevivencia de las especies que se encuentran coexistiendo, y de igual manera se tenderá a impedir la presencia de los denominados *cheaters*. Este comportamiento sin embargo no implica necesariamente una ventaja para todas las células en todos los casos, pues estos *biofilms* pueden también ser sitios muy activos de guerra química con antibióticos, o de competencia como parasitismo y depredación (Zschiesche and Humbeck, 2014).

En este análisis, la presencia de aislados formadores de *biofilms* se dio en todos los tratamientos, antes y posterior al periodo de enriquecimiento, con excepción del tratamiento NNP en sedimento, lo cual sugiere que este comportamiento social forma parte del funcionamiento habitual de la comunidad bacteriana de Cuatro Ciénegas. Al analizar taxonómicamente los aislados no formadores de *biofilms* del tratamiento NNP, se puede observar que éste está dominado por el género *Halomonas*, el cual también es dominante en el tratamiento NP. Esta diferencia en el comportamiento de representantes del mismo género, sugiere una alta resiliencia en la comunidad bacteriana estudiada, pues ésta cuenta con una gama de estrategias para lidiar con las limitaciones y fluctuaciones ambientales del valle aún dentro del mismo género.

Debido a que aún dentro de representantes del mismo género se pudieron encontrar diferencias en cuanto a su estrategias para lidiar con el ambiente, así como por el interés de realizar una primera aproximación al análisis genómico de dos de los géneros más abundantes en

el sistema, *Pseudomonas* y *Aeromonas*, se decidió secuenciar un total de siete cepas provenientes del experimento de enriquecimiento, tanto del tiempo cero como de los diferentes tratamientos enriquecidos; así mismo se incluyó una cepa, *Pseudomonas cuatrocienezensis* 21C1, como cepa ancestral endémica de esta laguna pues ésta fue aislada en el mismo sistema Churince en el año 2001.

Al analizar de manera conjunta los resultados obtenidos de manera experimental con la información obtenida mediante el análisis de los genomas, podemos entender de mejor manera la dinámica de la comunidad analizada. Uno de los puntos más importantes es la diferencia en las estrategias para lidiar con un ambiente limitado en nutrientes que se da entre distintos géneros bacterianos en este mismo sistema de flujo. El análisis del genoma de *Bacillus coahuilensis* posicionó a éste como el genoma descrito más pequeño de *Bacillus* (Alcaraz et al., 2008), sin embargo otros aislados pertenecientes a este mismo género han mostrado una variedad de tamaños (Valdivia-Anistro et al., 2015; Gómez-Lunar et al., 2016; Rodríguez-Torres et al. 2017) lo cual sugiere que este especie endémica del valle ha seguido una estrategia de reducción en el tamaño de su genoma en contraste tanto con los aislados analizados de los géneros *Pseudomonas* y *Aeromonas*, para los cuáles no se encontró una diferencia en su tamaño al comparar contra las cepas de referencia, como con aislados de diferentes especies dentro de su mismo género.. Esta diferencia consideramos que puede estar asociada a la estrategia de crecimiento de estos géneros, pues *Pseudomonas* es un género oportunista con una gran diversidad metabólica debido a su capacidad de incorporar información genética foránea. Congruentemente con dicha hipótesis, está la correlación que recientemente se ha reportado para la presencia de regiones CRISPR, en donde se encontró que una menor presencia de repeticiones en estas regiones facilita la entrada de información genética foránea (García-Gutiérrez et al., 2015). Esto es importante debido a que ninguna de las dos cepas pertenecientes al tiempo cero presentaron regiones CRISPR, lo cual podría estar señalando la importancia de la entrada de información genética mediante eventos de transferencia horizontal para poder lidiar con su ambiente. Esta observación se se vio reforzada al comparar el porcentaje de secuencias identificadas como elementos de inserción para representantes del mismo clado, ya que en la cepa *Pseudomonas* sp. ENNP23 en la que se identificaron dos regiones CRISPR, el 1.2% de su genoma se identificó en islas genómicas en contraste con el 6.67% identificado en *Pseudomonas* sp. 1D4 para la cual no se identificó

ninguna región, esta observación sin embargo no es concluyente, debido al reducido número de aislados analizados en el tiempo cero, por lo cual es necesario ampliar el número de genomas secuenciados.

Otra de las características analizadas tanto de manera experimental como informáticamente fue la presencia de elementos de producción y resistencia a antibióticos. Experimentalmente se encontró una alta representación de resistencia a diversos antibióticos, la cual de manera general se perdió o vio disminuida posterior al enriquecimiento. Esto sin embargo no se vio reflejado en el análisis de los genomas, pues sin importar el tratamiento se identificaron genes asociados a la quimiotaxis, sistemas de secreción y bombas de flujo para resistencia a múltiples toxinas. Dicha representación puede deberse a la historia natural del sitio de trabajo, pues nos sugeriría que la competencia por interferencia está fuertemente engranada en el sistema. Esto contrasta con lo reportado de manera experimental sin embargo no contraviene esta observación, pues la expresión de los sistemas de producción y resistencia puede verse afectada por la comunidad en su totalidad tal como sugiere la teoría del mercado microbiano, en la cual la producción de los bienes, en este caso moléculas inhibitoras del crecimiento, está ligada a la red de interacción local, mientras que estos ensayos se llevaron a cabo de manera individual para cada una de las cepas.

Finalmente y de manera general podemos decir que la entrada de nutrientes en el valle de Cuatro Ciénegas tienen un gran impacto en la diversidad de la comunidad bacteriana al verse ésta altamente disminuída, sin embargo al analizar la secuencia de algunos de los aislados posteriores al periodo de enriquecimiento, si bien se encontraron indicios de diferencias como la presencia de regiones CRISPR, la mayor diferencia encontrada estuvo dada por el género analizado y no por el tratamiento, lo cual sugiere que cada género bacteriano en este sitio ha desarrollado estrategias particulares para lidiar con su ambiente. A pesar de esto pudimos encontrar características compartidas entre todos los aislados y que podrías sugerir una historia natural común como es la ausencia de islas de patogenicidad, sin embargo consideramos de vital importancia el secuenciar un mayor número de genomas de este experimento para tener un soporte a los resultados encontrados.

Perspectivas

A partir de los datos obtenidos en este trabajo se pueden plantear las siguientes perspectivas:

1. Se requieren más estudios de comunidades cultivables en diversos medios de crecimiento, esto con el objetivo de poder analizar un espectro mucho más amplio de los organismos que conforman la comunidad microbiana de Cuatro Ciénegas.
2. Es necesario realizar ensayos de inhibición incluyendo a los aislados obtenidos posterior al periodo de enriquecimiento, para así dar soporte a la propuesta de un viraje en la comunidad hacia una notablemente menos antagónica.
3. Para corroborar la dominancia de estrategias-K y estrategias-r en la comunidad bacteriana antes y posterior al periodo de enriquecimiento respectivamente, es necesario realizar cinéticas de crecimiento con los aislados de cada uno de estos periodos.
4. Dado el reducido número y sesgo de los genomas secuenciados, es necesario complementar este análisis con cepas de los clados asignados de diferentes tratamientos, para de esta manera poder comparar representantes del mismo clado para todos los tratamientos.

Referencias

- Aguirre-von-Wobeser, E., Soberón-Chávez, G., Eguiarte, L.E., Ponce-Soto, G.Y., Vázquez-Rosas-Landa, M. and Souza, V. 2014. Two-role model of an interaction network of free-living γ -proteobacteria from an oligotrophic environment. *Environ. Microbiol.* 16: 1366–1377.
- Al-Beloshei, N.E., Al-Awadhi, H., Al-Khalaf, R.A. and Afzal, M. 2015. A comparative study of fatty acid profile and formation of biofilm in *Geobacillus gargensis* exposed to variable abiotic stress. *Can. J. Microbiol.* 61(1):48-59. doi: 10.1139/cjm-2014-0615.
- Alcaraz, L. D., Olmedo, G., Bonilla, G., Cerritos, R., Hernández, G., Cruz, A., Ramírez, E., Putonti, C., Jiménez, B., Martínez, E., López, V., Arvizu, J., Ayala, F., Razo, F., Caballero, J., Siefert, J., Eguiarte, L., Vielle, J.-P., Martínez, O., Souza, V., Herrera-Estrella, A. and Herrera-Estrella, L. 2008. The genome of *Bacillus coahuilensis* reveals adaptations essential for survival in the relic of an ancient marine environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(15), 5803–5808. <http://doi.org/10.1073/pnas.0800981105>
- Allen, M.A., Goh, F., Burns, B.P. and Neilan, B.A. 2009. Bacterial, archaeal and eukaryotic diversity of smooth and pustular microbial mat communities in the hypersaline lagoon of Shark Bay. *Geobiology*. 7(1):82-96. doi: 10.1111/j.1472-4669.2008.00187.x.
- Amarasekare, P. 2002. Interference competition and species coexistence. *Proceedings of the Royal Society of London*. 269:1541-2550. doi: 10.1098/rspb.2002.2181
- Amarasekare, P. 2003. Competitive coexistence in spatially structured environments: a synthesis. *Ecology Letters*. 6(12): 1109-1122.
- Angiuoli, S.V. and Salzberg, S.L. 2011. Mugsy: fast multiple alignment of closely related whole genomes. *Bioinformatics*. 27(3):334-342. doi:10.1093/bioinformatics/btq665
- Anwar, H., Strap, J.L. and Costerton, W. 1992. Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 36(7):1347-1351
- Archibal, L.K., Gaynes, R.P. 1997. Hospital acquired infections in the United States: the importance of interhospital comparisons. *Nosocosm. Infect.* 11(2):245-255
- Ascon-Cabrera, M.A. Ascon-Reyes, D.B. and Lebeault J.M. 1995. Degradation activity of adhered and suspended *Pseudomonas* cells cultured on 2,4,6-trichlorophenol measured by indirect conductimetry. *J. Appl. Bacteriol.* 79:617-624
- Avitia, M., Escalante, A. E., Rebollar, E. A., Moreno-Letelier, A., Eguiarte, L. E., and Souza, V. 2014. Population expansions shared among coexisting bacterial lineages are revealed by genetic evidence. *PeerJ*, 2, e696. <http://doi.org/10.7717/peerj.696>
- Begon, M., C. Townsend, J. and Harper. 2006. *Ecology: From individuals to ecosystems* (4^o edición). Blackwell Publishing, Malden, E.U.A. 738pp

- Belda-Ferre, P., Alcaraz, L.D., Cabrera-Rubio, R., Romero, H., Simón-Soro, A., Pignatelli, M. and Mira, A. 2012. The oral metagenome in health and disease. *The ISME Journal*, 6(1), 46–56. <http://doi.org/10.1038/ismej.2011.85>
- Bergman, N.H. 2007. *Comparative Genomics, Volume 1. Methods in Molecular Biology*. 395. Humana Press Inc.
- Berman, T., Hoppe, H. and Gocke, K. 1994. Response of aquatic bacterial populations to substrate enrichment. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 104:173-184
- Bevivino A., Paganin P., Bacci G., Florio A., Pellicer M.S., Papaleo, M.C., Mengoni, A., Ledda, L., Fani, R., Benedetti, A. and Dalmastrì, C. 2014. Soil Bacterial Community Response to Differences in Agricultural Management along with Seasonal Changes in a Mediterranean Region. *PLoS ONE* 9(8): e105515. doi:10.1371/journal.pone.0105515.
- Blankenberg, D., Taylor, J., Schenck, I., He, J., Zhang, Y., Ghent, M., Veeraraghavan, N., Albert, I., Miller, W., Makova, K., Hardison, R. and Nekrutenko, A. 2007. A framework for collaborative analysis of ENCODE data: making large-scale analyses biologist-friendly. *Genome Research*. 17(6): 960–964. doi: 10.1101/gr.5578007
- Bochow, S., Elliman, J. and Owens, L. 2012. Bacteriophage adenine methyltransferase: a life cycle regulator? Modelled using *Vibrio harveyi* myovirus like. *J Appl Microbiol.* 113(5):1001-13. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05358.x.
- Bodilis, J., Nsigue-Meilo, S., Besaury, L. and Quillet, L. 2012. Variable copy number, intra-genomic heterogeneities and lateral transfer of the 16S rRNA gene in *Pseudomonas*, *PloS ONE* 7(4), e35647
- Bonilla-Rosso, G., Peimbert, M., Alcaraz, L. D., Hernández, I., Eguiarte, L. E., Olmedo-Alvarez, G., & Souza, V. 2012. Comparative Metagenomics of Two Microbial Mats at Cuatro Ciénegas Basin II: Community Structure and Composition in Oligotrophic Environments. *Astrobiology*, 12(7), 659–673. <http://doi.org/10.1089/ast.2011.0724>
- Bonilla-Rosso, G., Peimbert, M., Alcaraz, L.D., Hernández, I., Eguiarte, L.E., Olmedo-Alvarez, G., and Souza, V. 2012. Comparative metagenomics of two microbial mats at Cuatro Ciénegas Basin II: community structure and composition in oligotrophic environments. *Astrobiology*, 12(7):659–73. doi:10.1089/ast.2011.0724
- Boussau, B. Guéguen, L. and Gouy, M. 2008. Accounting for horizontal gene transfers explains conflicting hypotheses regarding the position of aquificales in the phylogeny of Bacteria. *BMC Evol. Biol.* 8:272. doi. 10.1186/1471-2148-8-272
- Bowen, B.W., Rocha, L.A., Toonen, R.J., et al. 2013. The origins of tropical marine biodiversity. *TRENDS in Ecol & Evol.* 28(6): 359-366
- Boyd, A. and Chakrabarty, A.M. 1994. Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol.* 60(7):2355-2359.

- Boyer, F., Fichant, G., Berthod, J., Vandenbrouck, Y., and Attree, I. 2009. Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: what can be learned from available microbial genomic resources? *BMC Genomics*, 10:104. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-10-104>
- Bratbak, G. 1985, Bacterial biovolume and biomass estimations. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 1488-1493
- Brogden, K.A., Roth, J.A., Stanton, T.B., Bolin, C.A., Minion, F.C. and Wannemuehler, M.J. 2000. *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*, 3rd edn. ASM Press, Washington DC.
- Brown, T.A. 2007. *Genomes*. 3rd edition. New York: Garland Science Pub. 713 p.
- Burgess, J.G., Boyd, K.G., Armstrong, E., Jiang, Z., Yan, L., Berggren, M., May, U., Pisacane, T., Granmo, A. and Adams, D.R. 2003. The development of a marine natural product-based antifouling paint. *Biofouling* 19(Suppl.):197–205
- Cai, W., De La Fuente, L., and Arias, C.R. 2013. Biofilm formation by the fish pathogen *Flavobacterium columnare*: development and parameters affecting surface attachment. *Appl. Environ. Microbiol.* 79: 5633–5642. doi:10.1128/AEM.01192-13.
- Caiazza, N.C., Merritt, J.H. Brothers, K.M. and O’Toole, G.A. 2007. Inverse Regulation of Biofilm Formation and Swarming Motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14.J. *Bacteriol.* 189(9):3603-3612
- Canchaya, C., Fournous, G., Chibani-Chennoufi, S., Dillmann, M.L. and Brüssow, H. 2003. Phage as agents of lateral gene transfer. *Curr Opin Microbiol.* 6(4):417-24. doi:0.1016/S1369-5274(03)00086-9
- Carlson, C.A., Giovannoni, S.J., Hansell, D.A., Goldberg, S.J., Parson, R., Otero, M.P., Vergin, K. and Wheeler, B.R. 2002. Effect of nutrient amendments on bacterioplankton production community structure and DOC utilization in the northwest Sargasso Sea. *Aquat. Microb. Ecol.* 30:19-36
- Cerritos, R., Eguiarte, L.E., Avitia, M., Siefert, J., Travisano, M., Rodríguez-Verdugo, A. and Souza, V. 2010. Diversity of culturable thermo-resistant aquatic bacteria along an environmental gradient in Cuatro Ciénegas, Coahuila, México. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 99(2):303-318. doi: 10.1007/s10482-010-9490-9.
- Chen, L., Xiong, Z., Sun, L., Yang, J., and Jin, Q. 2012. VFDB 2012 update: toward the genetic diversity and molecular evolution of bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Research*, 40(Database issue), D641–D645. <http://doi.org/10.1093/nar/gkr989>
- Chesson, P. 2000. Mechanisms of maintenance of species diversity. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 31: 346-366
- Chevreur, B., Pfisterer, T., and Suhai, S. 2000. Automatic assembly and editing of genomic sequences. In *Genomics and proteomics—functional and computational aspects* (ed. S. Suhai), Chap. 5, pp. 51–65. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York

- Christofoli S., Monty, and A., Mahy, G. 2010. Historical landscape structure affects plant species richness in wet heathlands with complex landscape dynamics. *Landscape Urban Plann.* 98: 92:98
- Chun, J., Huq, A., and Colwell, R.R. 1999. Analysis of 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(5), 2202–2208.
- Ciofu, O., Beveridge, T.J., Kadurugamuwa, J., Walther-Rasmussen, J. and Hoiby, N. 2000. Chromosomal β -lactamase is packaged into membrane vesicles and secreted from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 45:9–13
- Ciros-Pérez, J., Carmona, M.J. and Serra, M. 2001. Resource competition between sympatric sibling rotifer species. *Limnology and Oceanography* 46:1511–1523.
- Colston, S.M., Fullmer, M.S., Beka, L., Lamy, B., Gogarten, J.P., and Graf, J. 2014. Bioinformatic Genome Comparisons for Taxonomic and Phylogenetic Assignments Using *Aeromonas* as a Test Case. *mBio*, 5(6):e02136–14. <http://doi.org/10.1128/mBio.02136-14>
- Cosson, P., Zulianello, L., Join-Lambert, O., Faurisson, F., Gebbie, L., Benghezal, M., van Delden, C., Kocjancic Curty, L. and Köhler, T. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Analyzed in a *Dictyostelium discoideum* Host System. *Journal of Bacteriology*, 184(11), 3027–3033. <http://doi.org/10.1128/JB.184.11.3027-3033.2002>
- Crotty, S.M. and Bertness, M.D. 2015. Positive interactions expand habitat use and the realized niches of sympatric species. *Ecology*. 96(10):2575-2582. doi. 10.1890/15-0240.1
- Czarán, T.L., Hoekstra, R.L. and Pagie, L. 2002. Chemical warfare between microbes promotes biodiversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99(2): 786-790.
- Danhorn, T., Hentzer, M., Givskov, M., Parsek, M.R. and Fuqua, C. 2004. Phosphorus Limitation Enhances Biofilm Formation of the Plant Pathogen *Agrobacterium tumefaciens* through the PhoR-PhoB Regulatory System. *J. Bacteriol.* 186(14):4492-4501
- Daniels, R., Reynaert, S., Hoekstra, H., Verreth, C., Janssens, J., Fauvart, M., Beullens, S., Heusdens, C., Lambrechts, I., De Vos, D.E., Vanderleyden, J. and Vermant, J. 2006. Quorum signal molecules as biosurfactants affecting swarming in *Rhizobium etli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:14965–14970. <http://doi.org/10.1073/pnas.0511037103>
- Daniels, R., Vanderleyden, J. and Michiels, J. 2004. Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 28:261–89
- Darwin, C. R. 1876. *The origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life.* London: John Murray. 6th ed.
- Desert Fishes Council Web. 2015. <http://www.desertfishes.org/cuatroc/>
- Dhillon, B.K., Laird, M.R., Shay, J.A., Winsor, G.L., Lo, R., Nizam, F., Pereira, S.K., Waglechner, N., McArthur, A.G., Langille, M.G.I. and Brinkman, F.S.L. 2015. *IslandViewer 3:*

- more flexible, interactive genomic island discovery, visualization and analysis. *Nucleic Acids Res.* 43:W104–W108. doi: 10.1093/nar/gkv401
- Diggie, S.P., Matthijs, S., Wright, V.J., Fletcher, M.P., Chhabra, S.R., Lamont, I.L., Kong, X., Hider, R.C., Cornelis, P., Cámara, M. and Williams, P. 2007. The *Pseudomonas aeruginosa* 4-quinolone signal molecules HHQ and PQS play multifunctional roles in quorum sensing and iron entrapment. *Chem. Biol.* 14:87–96
- Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U. and Hacker, J. 2004. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Microbiol.* 2(5):414-424. doi:10.1038/nrmicro884
- Donohue, I., Jackson, A.L., Pusch, M.T. and Irvine, K. 2009. Nutrient enrichment homogenizes lake benthic assemblages at local and regional scales. *Ecology* 90(12): 3470-3477.
- Dorador, C., Vila, I., Witzel, K.-P. and Imhoff, J.F. 2013. Bacterial and archaeal diversity in high altitude wetlands of the Chilean Altiplano. *Fundamental and Applied Limnology / Archiv für Hydrobiologie* 182(2):135–159.
- Drancourt, M., Bollet, C., Carlouz, A. et al. 2000. 16S ribosomal sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J. Clin. Microbiol.* 38: 3623-3630.
- Drenkard, E. and Ausubel, F.M. 2002. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature.* 416(6882):740-743
- D'Souza, G., Waschina, S., Pande, S., Bohl, K., Kaleta, C. and Kost, C. 2014. Less is more: selective advantages can explain the prevalent loss of biosynthetic genes in bacteria. *Evolution*, 68: 2559–2570. doi: 10.1111/evo.12468
- Dybzinski, R., and Tilman, D. 2007. Resource use patterns predict long-term outcomes of plant competition for nutrients and light. *American Naturalist* 170:305–318.
- Edmonson, W.T. and Lehman, J.T. 1981. The effect of changes to the nutrient income on the condition of the Lake Washington. *Limnology and Oceanography.* 26:1-29
- Edwards, D.P., Hassall, M., Sutherland, W.J. and Yu, D.W. 2006. Selection for protection in an ant-plant mutualism: Host sanctions, host modularity, and the principal-agent game. *Proc Biol Sci* 273(1586): 595–602.
- Escalante, A.E., Caballero-Mellado, J., Martínez-Aguilar, L., Rodríguez-Verdugo, A., González-González, A., Toribio-Jiménez, J. and Souza, V. 2009. *Pseudomonas cuatrocieneegasensis* sp. nov., isolated from an evaporating lagoon in the Cuatro Ciénegas valley in Coahuila, Mexico. *Int J Syst Evol Microbiol.* 59(Pt 6):1416-1420. doi: 10.1099/ijs.0.006189-0.
- Escalante, A.E., Eguiarte, L.E., Espinosa-Asuar, L., Forney, L J., Noguez, A.M. and Souza Saldivar, V. 2008. Diversity of aquatic prokaryotic communities in the Cuatro Ciénegas basin. *FEMS Microbiology Ecology*, 65(1):50–60. doi:10.1111/j.1574-6941.2008.00496.x

- Evans, S.B. 2005. Using chemical data to define flow systems in Cuatro Ciénegas, Coahuila, Mexico. The University of Texas – Austin Dissertation. 114 p.
- Fancello, L., Desnues, C., Raoult, D. and Rolain, J.M. 2011. Bacteriophages and diffusion of genes encoding antimicrobial resistance in cystic fibrosis sputum microbiota. *J Antimicrob Chemother.* 66(11):2448-54. doi: 10.1093/jac/dkr315
- Finn, R. D., Bateman, A., Clements, J., Coghill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., Heger A, Hetherington, K., Holm, L., Mistry, J., Sonnhammer, E.L., Tate, J. and Punta, M. 2014. Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Research*, 42(Database issue), D222–D230. <http://doi.org/10.1093/nar/gkt1223>
- Fontaine, S., Mariotti, A. and Abbadie, L. 2013 The priming effect of organic matter: a question of microbial competition?. *Soil Biol Biochem.* 35(6):837-843. doi. 10.1016/S0038-0717(03)00123-8
- Fox, J.G., Ge, Z., Whary, M.T., Erdman, S.E. and Horwitz, B.H. 2011. *Helicobacter hepaticus* infection in mice: models for understanding lower bowel inflammation and cancer. *Mucosal Immunol.* 4, 22–30. doi: 10.1038/mi.2010.61
- Frank, S. A. *Foundations of Social Evolution* (Princeton Univ. Press, Princeton, 1998)
- Freilich, S., Zarecki, R., Eilam, O., Segal, E.S., Henry, C.S., Kupiec, M., Gophna, U., Sharan, R., Ruppin, E. 2011. Competitive and cooperative metabolic interactions in bacterial communities. *Nat Commun.* 2:589. doi: 10.1038/ncomms1597.
- Fuchs, B.M., Zubkov, M.V., Sahm, K., Burkill, P.H and Amann, R. 2000. Changes in community composition during dilution cultures of marine bacterioplankton as assessed by flow cytometric and molecular biological techniques. *Environ. Microbiol.* 2(2): 190-201.
- Fullmer, M.S., Soucy, S.M. and Gogarten, J.P. 2015. The pan-genome as a shared genomic resource: mutual cheating, cooperation and the black queen hypothesis. *Frontiers in Microbiology*, 6, 728. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00728>
- Gajer, P., Brotman, R. M., Bai, G., Sakamoto, J., Schütte, U. M. E., Zhong, X., Koenig, S.S., Fu, L., Ma, Z.S., Zhou, X., Abdo, Z., Forney, L.J. and Ravel, J. 2012. Temporal Dynamics of the Human Vaginal Microbiota. *Science Translational Medicine*, 4(132), 132ra52. <http://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003605>
- García-Gutiérrez, E., Almendros, C., Mojica, F.J.M., Guzmán, N.M. and García-Martínez, J. 2015. CRISPR Content Correlates with the Pathogenic Potential of *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 10(7):e0131935. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0131935>
- Garret, T.R., Bhakoo, M. and Zhang, Z. 2008. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Prog Nat. Sci.* 18(9):1049-1056
- Gogarten, J.P. and Townsend, J.P. 2005. Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution. *Nature Rev. Microbiol.* 3:679-687. doi:10.1038/nrmicro1204

- Gogarten, J.P., Doolittle, W.F. and Lawrence, J.G. 2003. Prokaryotic evolution in the light of gene transfer. *Mol. Biol. Evol.* 19:2226-2238. [10.1093/oxfordjournals.molbev.a004046](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a004046)
- Gómez-Lunar, Z., Hernández-González, I., Rodríguez-Torres, M.-D., Souza, V. and Olmedo-Álvarez, G. 2016. Microevolution Analysis of *Bacillus coahuilensis* Unveils Differences in Phosphorus Acquisition Strategies and Their Regulation. *Frontiers in Microbiology*, 7, 58. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00058>
- Goodman, A.E., Marshall, K.C. and Hermansson, M. 1994. Gene transfer among bacteria under conditions of nutrient depletion in simulated and natural aquatic environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 15:55-60
- Greig, D. and Travisano, M. 2004. The prisoner's dilemma and polymorphism in yeast SUC genes. *Biol. Lett.* 271:S25–26
- Grissa, I., Vergnaud, G. and Pource, C. 2007. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucl. Acids Res.* 35(Suppl 2):W52-W57. doi: [10.1093/nar/gkm360](https://doi.org/10.1093/nar/gkm360)
- Gross, J., Passmore, I.J., Chung, J.C.S., Rzhepishevskaya, O., Ramstedt, M and Welch, M. 2013. Universal soldier: *Pseudomonas aeruginosa* — an opportunistic generalist. *Front. Biol.* 8(4):387-394. doi:[10.1007/s11515-013-1267-x](https://doi.org/10.1007/s11515-013-1267-x)
- Großkopf, T., & Soyer, O. S. 2014. Synthetic microbial communities. *Current Opinion in Microbiology*, 18(100), 72–77. <http://doi.org/10.1016/j.mib.2014.02.002>
- Grosso-Becerra, M.-V., Santos-Medellín, C., González-Valdez, A., Méndez, J.-L., Delgado, G., Morales-Espinosa, R., Servín-González, L., Alcaraz, L.D. and Soberón-Chávez, G. 2014. *Pseudomonas aeruginosa* clinical and environmental isolates constitute a single population with high phenotypic diversity. *BMC Genomics*, 15:318. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-15-318>
- Hallsworth, J.E., Heim, S. and Timmis, K.N. 2003. Chaotropic solutes cause water stress in *Pseudomonas putida*. *Environ. Microbiol.* 5: 1270–1280.
- Hamilton, W. D. 1963. The evolution of altruistic behaviour. *Am. Nat.* 97:354–356.
- Hamilton, W. D. 1964. The Genetical Evolution of Social Behaviour I *J. Theoret. Biol.* 7:1-16. doi: [10.1016/0022-5193\(64\)90038-4](https://doi.org/10.1016/0022-5193(64)90038-4)
- Händel, N., Schuurmans, J.M., Brul, S. and ter Kuile, B.H. 2013. Compensation of the Metabolic Costs of Antibiotic Resistance by Physiological Adaptation in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(8), 3752–3762. <http://doi.org/10.1128/AAC.02096-12>
- Hardison, R.C. 2003. Comparative genomics. *PLoS Biol.* 1(2):156-160. doi: [10.1371/journal.pbio.0000058](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0000058)
- Harpole, W. S. and Tilman, D. 2007. Grassland species loss resulting from reduced niche dimension. *Nature*. 446: 791-793

- Hase, C. and Finkelstein, R.A. 1993. Bacterial extracellular zinc-containing metalloproteases. *Microbiol. Rev.* 57:823–37
- Hibbing, M.E., Fuqua, C., Parsek, M.R and Peterson, S.B. 2010. Bacterial competition: Surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat. Rev. Microbiol.* 8(1): 15–25. doi: 10.1038/nrmicro2259.
- Horvath, P. and Barragou, R. 2010. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science.* 327(5962): 167-270. doi: 10.1126/science.1179555
- Hunt, M., Kikuchi, T., Sanders, M., Newbold, C., Berriman, M. and Otto, T.D. 2013. REAPR: a universal tool for genome assembly evaluation. *Genome Biology.* 14:R47. doi:10.1186/gb-2013-14-5-r47
- Hurwitz, B.L., Brum, J.R., and Sullivan, M.B. 2015. Depth-stratified functional and taxonomic niche specialization in the “core” and ‘flexible’ Pacific Ocean Virome. *The ISME Journal*, 9(2):472–484. <http://doi.org/10.1038/ismej.2014.143>
- Hutchinson, G.E. 1959. Homage to Santa Rosalia or Why are there so many kinds of animals? *Am. Nat.* 93(870): 145-159
- Igbinosa, I.H. and Igbinosa, E. 2015. The Pseudomonas as a versatile opportunistic pathogen in the environment, in *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs* (Ed. A. Méndez-Vilas), Formatex Research Center. 822-831
- Jackson, S.T. and Overpeck, J.T. 2000. Responses of plant populations and communities to environmental changes of the late Quaternary. *Paleobiology.* 26:194–220
- Jansson, M., Bergstöm, A-K., Lymer, D., Vrede, K. and Karlsson, J. 2006. Bacterioplankton growth and nutrient use efficiencies under variable organic carbon and inorganic phosphorus ratios. *Microb. Ecol.* 52: 358-364
- Jiang, S.C. and Paul, J.H. 1998. Gene Transfer by Transduction in the Marine Environment. *Appl Environ Microbiol.* 64(8):2780–2787.
- Jiang, S.C. and Paul, J.H. 1998. Significance of lysogeny in the marine environment: studies with isolates and an ecosystem model. *Microb Ecol.* 35:235–243
- Johannesson, K.H., Cortés, A. and Kilroy, K.C. 2004. Reconnaissance isotopic and hydrochemical study of Cuatrociénegas groundwater, Coahuila, México. *J. South. Am. Earth Sci.* 17:171-180
- Jones, C.G., Lawton, J.H. and Shachak, M. 1994. Organisms as ecosystem engineers. *Oikos* 69(3):373–386.
- Jones, P.A. and Takai, D. 2001. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science.* 293(5532):1068–1070.

- Jones, S., Yu, B., Bainton, N. J., Birdsall, M., Bycroft, B. W., Chhabra, S. R., Cox, A.J. Golby, P., Reeves, P.J. and Stephens, S. 1993. The lux autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas aeruginosa*. *The EMBO Journal*, 12(6), 2477–2482.
- Jørgensen, M.G., Pandey, D.P., Jaskolska, M. and Gerdes, K. 2009. HicA of *Escherichia coli* Defines a Novel Family of Translation-Independent mRNA Interferases in Bacteria and Archaea. *Journal of Bacteriology*, 191(4):1191–1199. doi.org/10.1128/JB.01013-08
- Jun, S.-R., Wassenaar, T. M., Nookaew, I., Hauser, L., Wanchai, V., Land, M., Timm, C.M., Lu, T.Y., Schadt, C.W., Doktycz, M.J., Pelletier, D.A. and Ussery, D. W. (2016). Diversity of *Pseudomonas* Genomes, Including Populus-Associated Isolates, as Revealed by Comparative Genome Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(1), 375–383. <http://doi.org/10.1128/AEM.02612-15>
- Jürgens, K and Güde, H. 1990. Incorporation and release of phosphorus by planktonic bacteria and phagotrophic flagellates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 59:271-284
- Kaleta, C., Schäuble, S., Rinas, U. and Schuster, S. 2013. Metabolic costs of amino acid and protein production in *Escherichia coli*. *Biotechnol J.* 8(9):1105-14. doi:10.1002/biot.201200267.
- Kassen, R., Buckling, A., Bell, G. and Rainey, P.B. 2000. Diversity peaks at intermediate productivity in laboratory microcosm. *Nature*. 406: 508-512
- Kassen, R., Llewellyn M. and Rainey, P.B. 2004. Ecological constraints on diversification in a model adaptive radiation. *Nature*. 431: 984-989
- Kempes, C.P., van Bodegom, P.M., Wolpert, D., Libby, E., Amend, J. and Hoehler, T. 2017. Drivers of Bacterial Maintenance and Minimal Energy Requirements. *Frontiers in Microbiology*, 8, 31. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00031>
- Kerr, B., M. A. Riley, M. W. Feldman and B. J. M. Bohannan. 2002. Local dispersal promotes biodiversity in a real-life game of rock-paper-scissors. *Nature*. 418: 171-174
- Kiers, E.T., Rousseau, R.A., West, S.A. and Denison, R.F. 2003. Host sanctions and the legume-Rhizobium mutualism. *Nature* 425:78–81
- Kneitel, J.M. and Chase, J.M. 2004. Trade-offs in community ecology: linking spatial scales and species coexistence. *Ecology Letters*. 7: 69-80.
- Kniskern, J.M., Barrett, L.G. and Bergelson, J. 2011. Maladaptation in wild populations of the generalist plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 65(3):818–830. <http://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2010.01157.x>
- Koonin, E.V., Aravind, L. and Kondrashov, A.S. 2000. The impact of comparative genomics on our understanding of evolution. *Cell*. 101:573-576
- Koonin, E.V., Makarova, K.S. and Aravind, L. 2001. Horizontal Gene Transfer in Prokaryotes: Quantification and Classification. *Annu. Rev. Microbiol.* 55:709-742.

- Kovács, G., Burghardt, J., Pradella, S., Schumann, P., Stackebrandt, E. and Máriaiget K. 1999. *Kocuria palustris* sp. nov. and *Kocuria rhizophila* sp. nov., isolated from the rhizoplane of the narrow-leaved cattail (*Typha angustifolia*). *Int J Syst Bacteriol.* 49(1):167-73.
- Koza, A., Moshynets, O., Otten, W., Spiers, A.J. 2011. Environmental modification and niche construction: developing O₂ gradients drive the evolution of the Wrinkly Spreader. *The ISME Journal.* 5:665-673
- Kurtz, S., Phillippy, A., Delcher, A.L., Smoot, M., Shumway, M., Antonescu, C. and Salzberg S.L. 2004. Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biol.* 5(2):R12. doi:10.1186/gb-2004-5-2-r12
- Lang, A.S., Zhaxybayeva, O., and Beatty, J.T. 2012. Gene transfer agents: phage-like elements of genetic exchange. *Nature Reviews. Microbiology,* 10(7), 472–482. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2802>
- Langille, M.G.I., Hsiao, W.W.L. and Brinkmann, F.S.L. 2008. Evaluation of genomic islands predictors using a comparative genomics approach. *BMC Bioinformatics.* 9:329. doi:10.1186/1471-2105-9-329
- Lebaron, P., Servais, P., Trousselliere, M., Courties, C., Vives-Rego, J., Muyzer, G., Bernard, L., Guindulain, T., Schäfer, H. and Stackebrandt, E. 1999. Changes in bacterial community structure in seawater mesocosm differing in their nutrient status. *Aquat. Microb. Ecol.* 19:255-267
- Lee, S.-J., Lee, Y.S., Lee, S.-C., Park, I.-H., Ahn, S.-C. and Choi, Y.-L. 2009. Molecular cloning and analysis of phosphate specific transport (pst) operon from *Serratia marcescens* KCTC 2172. *Journal of Life Sciences* 19(5):566-572
- Lee, Z.M., Steger, L., Corman, J.R., Neveu, M., Poret-Peterson, A.T., Souza, V. and Elser, J.J. 2015. Response of a stoichiometrically imbalanced ecosystem to manipulation of nutrient supplies and ratios. *PLoS One.* 10(4):e0123949. doi: 10.1371/journal.pone.0123949
- Leibold, M.A. 1996. A graphical model of keystone predators in food webs: trophic regulation of abundance, incidence and diversity patterns in communities. *Am. Nat.* 147: 784-812
- Lenski, R.E. and Riley, M.A. 2002. Chemical warfare from an ecological perspective. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 556–558.
- Li, Y., Liu, Y., Zhou, Z., Huang, H., Ren, Y., Zhang, Y., Li, G., Zhou, Z. and Wang, L. 2011. Complete Genome Sequence of *Aeromonas veronii* Strain B565. *Journal of Bacteriology,* 193(13):3389–3390. doi.org/10.1128/JB.00347-11
- Loper, J.E., Hassan, K.A., Mavrodi, D.V., Davis, E.W., Lim, C.K., Shaffer, B.T., Elbourne, L.D.H., Stockwell, V.O., Hartney, S.L., Breakwell, K., Henkels, M.D., Tetu, S.G., Rangel, L.I., Kidarsa, T.A., Wilson, N.L., de Mortel, J.E.V., Song, C.X., Blumhagen, R., Radune, D., Hostetler, J.B., Brinkac, L.M., Durkin, A.S., Kluepfel, D.A., Wechter, W.P., Anderson, A.J., Kim, Y.C., Pierson, L.S., Pierson, E.A., Lindow, S.E., Kobayashi, D.Y., Raaijmakers, J.M., Weller, D.M., Thomashow, L.S., Allen, A.E. and Paulsen, I.T. 2012. Comparative genomics of

plant-associated *Pseudomonas* spp.: insights into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions. *PLoS Genet* 8:e1002784. doi:10.1371/journal.pgen.1002784

Loreau, M. 2000. Biodiversity and ecosystem functioning: recent theoretical advances. *Oikos* 91: 3-17

Lu, B. and Leong, H.W. 2016. GI-SVM: A sensitive method for predicting genomic islands based on unannotated sequence of a single genome. *J. Bioinform. Comput. Biol.* 14(1) :1640003. doi: 10.1142/S0219720016400035

Lynch, M. and Marinov, G. K. 2015. The bioenergetic costs of a gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 112(51), 15690–15695. <http://doi.org/10.1073/pnas.1514974112>

MacArthur, R.H. 1972. *Geographical Ecology Patterns in the Distribution of Species*. (Harper & Row, New York)

Majeed, H., Gillor, O., Kerr, B. and Riley, M.A. 2011. Competitive interactions in *Escherichia coli* populations: the role of bacteriocins. *ISME J.* 5: 71–81.

Makino, W. and Cotner, J.B. 2005. Elemental stoichiometry of a heterotrophic bacterial community in a freshwater lake: implications for growth- and resource-dependent variations. *Aquat. Microbiol. Ecol.* 34: 33-41

Marini, L., Scotton M., Klimek S., Isselstein, J. and Pecile, A. 2007. Effects of local factors on plant species richness and composition of Alpine meadows. *Agric. Ecosyst. Environ.* 119: 281-288

Mas, A., Jamshidi, S., Lagadeuc, Y., Eveillard, D. and Vandenkoornhuyse, P. 2016. Beyond the Black Queen Hypothesis. *ISME J. ePub.* doi: 10.1038/ismej.2016.22

Mashburn, L.M. and Whiteley, M. 2005. Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. *Nature* 437:422–25

Matyar, F., Akkan, T., Uçak, Y. and Eraslan, B. 2010. *Aeromonas* and *Pseudomonas*: antibiotic and heavy metal resistance species from Iskenderun Bay, Turkey (northeast Mediterranean Sea). *Environ Monit Assess.* 167(1-4):309-320. doi: 10.1007/s10661-009-1051-1

Mayr, E. 1942. *Systematics and the origin of species*. Harvard University Press, Cambridge

McNally, L., Viana, M. and Brown, S.P. 2014. Cooperative secretions facilitate host range expansion in bacteria. *Nature Comm.* 5:4594. doi:10.1038/ncomms5594

Minckley, W.L. 1969, *Environments of the Bolson of Cuatro Ciengeas, Coahuila, Mexico, With Special Reference to the Aquatic Biota*: Texas Western Press, The University of Texas at El Paso, 65 pp.

Modi, S.R., Lee, H.H., Spina, C.S. and Collins, J.J. 2013. Antibiotic treatment expands the resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome. *Nature* 499: 219–222. doi: 10.1038/nature12212

- Moller, S. Sternberg, C., Andersen, J.B., Christensen, B.B., Ramos, J.L. Givskov, M. and Molin, S. 1998. In situ gene expression mixed-culture biofilms: evidence of metabolic interactions between community members, *Appl. Environ. Microbiol.* 64(2)
- Momeni, B., Waite, A.J. and Shou, W. 2013. Spatial self-organization favors heterotypic cooperation over cheating. *Elife.* 12(2):e00960. doi: 10.7554/eLife.00960.
- Moon, B.Y., Park, J.Y., Robinson, D.A., Thomas, J.C., Park, Y.H., Thornton, J.A., and Seo, K.S. 2016. Mobilization of Genomic Islands of *Staphylococcus aureus* by Temperate Bacteriophage. *PLoS ONE.* 11(3):e0151409. doi.org/10.1371/journal.pone.0151409
- Moore, E.R.B., Tindall, B.J., Martins Dos Santos, V.A.P., Pieper, D.H., Ramos, J.-L. and Palleroni, N.J. 2006. Nonmedical: *Pseudomonas*. In *The prokaryotes*, vol 6 (Ed. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H. and Stackebrandt, E.) Springer, New York, NY. 646–703
- Morales-Espinosa, R., Soberón-Chávez, G., Delgado-Sapién, G., Sandner-Miranda, L., Méndez, J. L., González-Valencia, G. and Cravioto, A. 2012. Genetic and Phenotypic Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* Population with High Frequency of Genomic Islands. *PLoS ONE*, 7(5), e37459. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0037459>
- Moriya, Y., Itoh, M., Okuda, S., Yoshizawa, A., and Kanehisa, M. 2007. KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. *Nucleic Acids Res.* 35, W182-W185. doi:10.1093/nar/gkm321
- Mormille, M.R., Romine, M.F., Garcia, M.T., Ventosa, A., Bailey T.J. and Peyton, B.M. 1999. *Halomonas campisalis* sp. nov. a denitrifying moderately haloalkaliphilic bacterium. *Syst. Appl. Microbiol.* 22(4): 551-558.
- Morris, J.J., Lenski, R.E., and Zinser, E.R. 2012. The Black Queen Hypothesis: Evolution of Dependencies through Adaptive Gene Loss. *mBio*, 3(2), e00036–12. <http://doi.org/10.1128/mBio.00036-12>
- Moya, A. and Ferrer, M. 2016. Functional Redundancy-Induced Stability of Gut Microbiota Subjected to Disturbance. *Trends Microbiol.* 24(5):402-413. doi:10.1016/j.tim.2016.02.002.
- Müller, C.H. 1947. Vegetation and climate of Coahuila, México. *Madroño.* 9:33-57
- Naeem, S., Kawabata, Z. and Loreau, M. 1998. Transcending boundaries in biodiversity research. *Trends. Ecol. Evol.* 134-135. doi:10.1016/S0169-5347(97)01316-5
- Nedialkova, L.P., Denzler, R., Koepfel, M.B., Diehl, M., Ring, D., Wille, T., Gerlach, R.G. and Stecher, B. 2014. Inflammation Fuels Colicin Ib-Dependent Competition of *Salmonella* Serovar Typhimurium and *E. coli* in Enterobacterial Blooms. *PLoS Pathogens*, 10(1), e1003844. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003844>
- Nelson, C.E. & Carlson, C.A. 2011. Differential response of high-elevation planktonic bacterial community structure and metabolism to experimental nutrient enrichment. *PLoS ONE.* 6(3): e1832. doi: 10.1371/journal.pone.0018320

- Nunoura, T., Takaki, Y., Shimamura, S., Kakuta, J., Kazama, H., Hirai, M., Masui, N., Tomaru, H., Morono, Y., Imachi, H., Inagaki, F. and Takai, K. 2015. Variance and potential niche separation of microbial communities in subseafloor sediments off Shimokita Peninsula, Japan. *Environ Microbiol.* doi: 10.1111/1462-2920.13096.
- O'Toole, G., Kaplan, H.B. and Kolter, R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:49-79
- Ochman, H., Lawrence, J.G. and Groisman, E.A. 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature.* 405(6784):299-304.
- Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G.D., Olsen, G.J., Davis, J.J., Disz, T., Edwards, R.A., Gerdes, S., Parrello, B., Shukla, M., Vonstein, V., Wattam, A.R., Xia, F. and Stevens, R. 2014. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Research* 42(D1): D206-D214. doi: 10.1093/nar/gkt1226
- Parani, K. and Saha, B.K. 2012. Prospects of using phosphate solubilizing *Pseudomonas* as bio fertilizers. *European Journal of Biological Sciences.* 4(2): 40-44.
- Parks, D.H., Tyson, G.W., Hugenholtz, P., and Beiko, R.G. 2014. STAMP: Statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics:* btu494v1-btu494. doi: 10.1093/bioinformatics/btu494
- Peimbert, M., Alcaraz, L.D., Bonilla-Rosso, G., Olmedo-Alvarez, G., García-Oliva, F., Segovia, L., Eguiarte, L.E. and Souza, V. 2012. Comparative Metagenomics of Two Microbial Mats at Cuatro Ciénegas Basin I: Ancient Lessons on How to Cope with an Environment Under Severe Nutrient Stress. *Astrobiology,* 12(7):648–658. doi.org/10.1089/ast.2011.0694
- Pérez-Brocal, V., García-López, R., Vázquez-Castellanos, J.F., Nos, P., Beltrán, B., Latorre, A. and Moya, A. 2013. Study of the Viral and Microbial Communities Associated With Crohn's Disease: A Metagenomic Approach. *Clinical and Translational Gastroenterology,* 4(6):e36. <http://doi.org/10.1038/ctg.2013.9>
- Pérez-Gutiérrez, R.-A., López-Ramírez, V., Islas, Á., Alcaraz, L. D., Hernández-González, I., Olivera, B. C. L., Santillán, M., Eguiarte, L.E., Souza, V., Travisano, M. and Olmedo-Alvarez, G. (2013). Antagonism influences assembly of a *Bacillus* guild in a local community and is depicted as a food-chain network. *The ISME Journal,* 7(3), 487–497. <http://doi.org/10.1038/ismej.2012.119>
- Peura, S., Eiler, A., Hiltunen, M., Nykänen, H., Tirola, M. and Jones, R.I. 2012. Bacterial and phytoplankton responses to nutrient amendments in a boreal lake differ according to season and to taxonomic resolution. *PLoS One.* 7(6):e38552
- Philippe H. and Douady, C.J. 2003. Horizontal gene transfer and pylogenetics. *Current Opinion in Microbiol.* 6:498-505. doi. 10.1016/j.mib.2003.09.008
- Pianka, E.R. 1970. On r and K selection. *Am. Nat.* 104: 592-597.

- Pointdexter, J.S., 2009. Low-nutrient environments, in *Encyclopedia of Microbiology* (ed. Moselio Schaechter), Academic Press. 240-247
- Ponce-Soto, G.Y., Aguirre-von-Wobeser, E., Eguiarte, L.E., Elser, J.J., Lee, Z.M. and Souza, V. 2015. Enrichment experiment changes microbial interactions in an ultra-oligotrophic environment. *Front. Microbiol.* 6:246. doi: 10.3389/fmicb.2015.00246
- Price, M.N., Dehal, P.S., and Arkin, A.P. 2010. FastTree 2 - Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. *PLoS ONE*, 5(3):e9490. doi:10.1371/journal.pone.0009490.
- Pukatzki, S., Ma, A.T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W.C., Heidelberg, J.F. and Mekalanos, J.J. 2006. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103(5):1528–33. doi: 10.1073/pnas.0510322103.
- Pulliam, R. 2000. On the relationship between niche and distribution. *Ecol Lett.* 3:349–361.
- Rainey, P.B. and Rainey, K.. 2003. Evolution of cooperation and conflict in experimental bacterial populations. *Nature* 425:72–74
- Rainey, P.B. and Travisano, M. 1998. Adaptive radiation in a heterogeneous environment. *Nature.* 349: 69-72.
- Rainey, P.B., Buckling, A., Kassen, R. and Travisano, M. 2000. The emergence and maintenance of diversity: insights from experimental bacterial populations. *Trends Ecol Evol.* 15(6):243-247
- Rebollar, E.A., Avitia, M., Eguiarte, L.E., González-González, A., Mora, L., Bonilla-Rosso, G. and Souza, V. 2012. Water-sediment niche differentiation in ancient marine lineages of *Exiguobacterium* endemic to the Cuatro Ciénegas Basin. *Environ Microbiol.* 14(9):2323-2333. doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02784.x.
- Riley, M.A. and Gordon, D.M. 1999. The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends in Microbiol.* 7(3):129-133
- Riley, M.A. and Wertz, J.E. 2002. Bacteriocins: Evolution, ecology and application. *Annu. Rev. Microbiol.* 56:117-137
- Rodríguez-Torres, M.D., Islas-Robles, A., Hernandez-Gonzalez, I., Gomez-Lunar, Z., Delaye, L.J., Souza, V., Travisano, M. and Olmedo-Alvarez, G. 2017. Phenotypic microdiversity and phylogenetic signal analysis of traits related to social interaction in *Bacillus* spp. from sediment communities. *Front. Microbiol.* doi: 10.3389/fmicb.2017.00029
- Rodríguez-Verdugo, A., Souza, V., Eguiarte, L.E. and Escalante, A.E. 2012. Diversity across seasons of culturable *Pseudomonas* from a desiccation lagoon in Cuatro Ciénegas, México. *Int. J. Microbiol.* dx.doi.org/10.1155/2012/201389.
- Rusch, D.B., Halpern, A.L., Sutton, G., Heidelberg, K.B., Williamson, S., Yooseph, S., Wu, D., Eisen, J.A., Hoffman, J.M., Remington, K., Beeson, K., Tran, B., Smith, H., Baden-Tillson, H.,

- Stewart, C., Thorpe, J., Freeman, J., Andrews-Pfannkoch, C., Venter, J.E., Li, K., Kravitz, S., Heidelberg, J.F., Utterback, T., Rogers, Y.H., Falcón, L.I., Souza, V., Bonilla-Rosso, G., Eguiarte, L.E., Karl, D.M., Sathyendranath, S., Platt, T., Birmingham, E., Gallardo, V., Tamayo-Castillo, G., Ferrari, M.R., Strausberg, R.L., Neilson, K., Friedman, R., Frazier, M. and Venter, J. C. 2007. The Sorcerer II Global Ocean Sampling Expedition: Northwest Atlantic through Eastern Tropical Pacific. *PLoS Biology*, 5(3):e77. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050077>
- Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M.A. and Barrell, B. 2000. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics*. 16(10):944-945. doi: 10.1093/bioinformatics/16.10.944
- Sacchi, C.T., Whitney, A.M., Mayer, L.W., Morey, R., Steigerwalt, A., Boras, A., Weyant, R.S and Popovic, T. 2002. Sequencing of 16S rRNA gene: A rapid tool for identification of *Bacillus anthracis*. *Emerg. Infect. Dis.* 8(10):1117-1123
- Sachs, J.L. and Hollowell, A.C. 2012. The Origins of Cooperative Bacterial Communities. *mBio*, 3(3), e00099–12. <http://doi.org/10.1128/mBio.00099-12>
- Santos-Beneit, F. 2015. The Pho regulon: a huge regulatory network in bacteria. *Front. Microbiol.* 6(204). doi: 10.3389/fmicb.2015.00402
- Santos-Beneit, F. 2015. The Pho regulon: a huge regulatory network in bacteria. *Front. Microbiol.* 6(204). doi: 10.3389/fmicb.2015.00402
- Schäfer, H., Bernard, L., Courties, C., Lebaron, P., Servais, P., Pukall, R., Stackebrandt, E., Troussellier, M., Guindulain, T., Vives-Rego, J. and Muyzer, G. 2001. Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient-enriched seawater mesocosms: changes in the genetic diversity of bacterial populations. *FEMS Microbiol Ecol.* 34(3):243-253
- Schindler, D.W. 2012. The dilemma of controlling cultural eutrophication of lakes. *Proc. R. Soc. B.* 279:4322-4333. doi:10.1098/rspb.2012.1032
- Schmieder, R. and Edwards, R. 2011. Fast identification and removal of sequence contamination from genomic and metagenomic datasets. *PLoS One.* 9;6(3):e17288. doi: 10.1371/journal.pone.0017288.
- Schmieder, R., Lim, Y.W., Rohwer, F and Edwards, R. 2010. TagCleaner: Identification and removal of tag sequences from genomic and metagenomic datasets. *BMC Bioinformatics* 11:341. doi:10.1186/1471-2105-11-341
- Scholl, D., Rogers, S., Adhya, S. and Merril, C.R. 2001. Bacteriophage K1-5 Encodes Two Different Tail Fiber Proteins, Allowing It To Infect and Replicate on both K1 and K5 Strains of *Escherichia coli*. *J. Virol.* 75(6):2509-2515. doi: 10.1128/JVI.75.6.2509-2515.2001
- Schooling, S.R. and Beveridge, T.J. 2006. Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. *J. Bacteriol.* 188:5945–57
- Seemann T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics.* 15;30(14):2068-9. PMID:24642063

- Sheludchenko, M.S., Huygens, F., Stratton, H. and Hargreaves, M. 2015. CRISPR Diversity in *E. coli* Isolates from Australian Animals, Humans and Environmental Waters. PLoS ONE, 10(5):e0124090. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0124090>
- Sigee, D.C. 2005. Freshwater microbiology: biodiversity and dynamic interactions of microorganisms in the freshwater environment. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, England.
- Silver, A.C., Williams, D., Faucher, J., Horneman, A.J., Gogarten, J.P. and Graf, J. 2011. Complex Evolutionary History of the *Aeromonas veronii* Group Revealed by Host Interaction and DNA Sequence Data. PLoS ONE, 6(2):e16751. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0016751>
- Simão, F.A., Waterhouse, R.M., Ioannidis, P., Kriventseva, E.V. and Zdobnov, E.M. 2015. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. Bioinformatics 31(19):3210-3212. doi:doi.org/10.1093/bioinformatics/btv351
- Simpson, J.T. 2002. Volunteer Lake Monitoring: A Methods Manual. North American Lake Management Society. 62 pp.
- Singer, E., Webb, E.A., Nelson, W.C., Heidelberg, J.F., Ivanova, N., Pati, A. and Edwards, K.J. 2011. Genomic potential of *Marinobacter aquaeoei*, a biochemical “Opportunithroph”. Appl. Environ. Microbiol. 77(8): 2763-2771.
- Smith, M. and Szathmary, E. The Major Transitions in Evolution (W.H. Freeman, Oxford, 1995)
- Smith, V.H. 1993. Applicability of resource-ratio theory to microbial ecology. Limnology and Oceanography 38:239–249.
- Soberón, J., and Nakamura, M. 2009. Niches and distributional areas: Concepts, methods, and assumptions. Proc Natl Acad Sci USA, 106(Suppl 2), 19644–19650. <http://doi.org/10.1073/pnas.0901637106>
- Souza, V., Espinosa-Asuar, L., Escalante, A.E. Eguiarte, L.E., Farmer, J., Forney, L., Lloret, L., Rodríguez-Martínez, J.M., Soberón, X., Dirzo, R. and Elser, J.J. 2006. An endangered oasis of aquatic microbial biodiversity in the Chihuahuan desert. Proc Natl Acad Sci. 103(17):6565-6570
- Spoering, A.L. and Gilmore, M.S. 2006. Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms. Curr. Opin. Microbiol. 9:133–137
- Stein, B.A., Kutner, L.S. and Adams J.S., editors. 2000. Precious Heritage: The Status of Biodiversity in the United States. New York: Oxford University Press. 416 p.
- Stewart, P.S. 1992. A model of biofilm detachment. Biotechnol. Bioeng. 41(1):111-117. doi:10.1002/bit.260410115.
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrenner, P., Hickey, M.J., Brinkman, S., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G.K., Wu, Z., Paulsen, I.T., Reizer, J., Saier, M.H.,

- Hancock, R.E., Lory, S. and Olson, M.V. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. 406(6799):959-9
- Stuart, R.K., Brahmsha, B., Busby, K. and Palenik, B. 2013. Genomic island genes in a coastal marine *Synechococcus* strain confer enhanced tolerance to copper and oxidative stress. *SIME. J.* 7(6):1139-1149. doi:10.1038/ismej.2012.175
- Subirats, J., Sánchez-Melsió, A., Borrego, C.M., Balcázar, J.L. and Simonet, P. 2016. Metagenomic analysis reveals that bacteriophages are reservoirs of antibiotic resistance genes. *Int J Antimicrob Agents*. S0924-8579(16)30120-0. doi:10.1016/j.ijantimicag.2016.04.028.
- Tarkowski, T.A., Mooney, D., Thomason, L.C. and Stahl, F.W. 2002. Gene products encoded in the *ninR* region of phage lambda participate in Red-mediated recombination. *Genes Cells* 7(4):351-363.
- Taylor, J., Schenck, I., Blankenberg, D. and Nekrutenko, A. 2007. Using Galaxy to perform large-scale interactive data analyses. *Current Protocols in Bioinformatics*. 19: 10.5.1–10.5.25.
- Tilman, D. 1982. *Resource Competition and Community Structure*. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Tilman, D. 1988. *Plant Strategies and the Dynamics and Structure of Plant Communities*. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Tilman, D., Reich, P.B. and Knops, J.M.H. 2006. Biodiversity and ecosystem stability in a decade-long grassland experiment. *Nature* 441: 629–632.
- Tsai, I.J., Otto, T.D. and Berriman, M. 2010. Improving draft assemblies by iterative mapping and assembly of short reads to eliminate gaps. *Genome Biology*. 11:R41. doi:10.1186/gb-2010-11-4-r41
- Van Donk, E., and S. S. Kilham. 1990. Temperature effects on silicon and phosphorus-limited growth and competitive interactions among three diatoms. *Journal of Phycology* 26:40–50.
- Vos, M., Quince, C., Pijil, A.S., de Hollander, M. and Kowalchuk, G.A. 2012. A comparison of *rpoB* and 16S rRNA as Markers in Pyrosequencing Studies of Bacterial Diversity. *PLoS One*. 7(2):e30600. doi: 10.1371/journal.pone.0030600.
- Vuilleumier, S. and Pagni, M. 2002. The elusive roles of bacterial glutathione S-transferases: new lessons from genomes. *Appl Microbiol Biotechnol*. 58(2):138-146
- Waack, S., Keller, O., Asper, R., Brodag, T., Damm, C., Fricke, W.F., Surovcik, K., Meinicke, P. and Merkl, R. 2006. Score-based prediction of genomic islands in prokaryotic genomes using hidden Markov models. *BMC Bioinformatics*. 7:142. doi:10.1186/1471-2105-7-142
- Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R. et al. 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *J. Syst. Bacteriol*. 37: 463-464
- Weinbauer, M.G. and Rassoulzadegan, F. 2004. Are viruses driving microbial diversification and diversity?. *Environ Microbiol*. 6(1):1-11. doi:10.1046/j.1462-2920.2003.00539.x

- Werner, G.D., Strassmann, J.E., Ivens, A.B., Engelmoer, D.J., Verbruggen, E., Queller, D.C., Noë, R., Johnson, N.C., Hammerstein, P. and Kiers, E.T. 2014. Evolution of microbial markets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 28;111(4):1237-44. doi: 10.1073/pnas.1315980111.
- West, S.A. and Buckling, A. 2003. Cooperation, virulence and siderophore production in bacterial parasites. *Proc. R. Soc. London Ser. B* 270:37–44
- West, S.A., Diggle, S.P., Buckling, A., Gardner, A. and Griffin, A.S. 2007 The Social Lives of Microbes. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 38:53–77. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095740
- West, S.A., Griffin, A.S., Gardner, A. and Diggle SP. 2006. Social evolution theory for microorganisms. *Nat Rev Microbiol.* 4(8):597-607. doi: 10.1038/nrmicro1461
- Williams, P., Winzer, K., Chan, W. and Camara, M. 2007. Look who’s talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B.* 362(1483):1119–1134
- Wolaver, B.D., and Diehl, T.M. 2011. Control of regional structural styles and faulting on Northeast Mexico spring distribution. *Environ Earth Sci.* 62(7):1535–1549. doi: 10.1007/s12665-010-0639-7
- Wolaver, B.D., Crossey, L. Karlstrom, K., Banner, J., Cardenas, B., Gutiérrez-Ojeda, C. and Sharp, J. 2013. Identifying origins of and pathways for spring waters in a semiarid basin using He, Sr, and C isotopes: Cuatrociénegas Basin, Mexico. *Geosphere* 9(1):113-125. doi: 10.1130/GES00849.1
- Wright, E.S. and Vetsigian, K.H. 2016. Inhibitory interactions promote frequent bistability among competing bacteria. *Nat. Commun.* 7:11274 doi: 10.1038/ncomms11274
- Wu, Q., Wang, Q., Taylor, K.G. and Doyle, J. 1995. Subinhibitory concentrations of antibiotics affect cell surface properties of *Streptococcus sobrinus*. *J. Bacteriol.* 177(5):1399-1401
- Zerbino, D. R. and Birney, E. 2008. Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Research*, 18(5), 821–829. <http://doi.org/10.1101/gr.074492.107>
- Zhou, J., Deng, Y., Zhang, P., Liang, Y., Van Nostrand, J.D., Yang, Y., He, Z., Wu, L., Stahl, D.A., Hazen, T.C., Tiedje, J.M. and Arkin, A.P. 2014. Stochasticity, succession, and environmental perturbations in a fluidic ecosystem. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 11(9):E836–E845. doi:10.1073/pnas.1324044111
- Zschiesche, W. and Humbeck, K. 2014 Water, in *Ecological Biochemistry: Environmental and Interspecies Interactions* (eds G.-J. Krauss and D. H. Nies), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany. doi: 10.1002/9783527686063.ch10