



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS

PROGRAMA DE INGENIERÍA GENÓMICA

DELIMITACIÓN DE ESPECIES Y CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DEL
RESISTOMA DE PROTEOBACTERIAS RECUPERADAS DE RÍOS CONTAMINADOS Y
LIMPIOS DE MORELOS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

LUZ EDITH OCHOA SÁNCHEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. PABLO VINUESA FLEISCHMANN

CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS

COMITÉ TUTOR

DR. JESÚS SILVA SÁNCHEZ

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

DR. MIGUEL ÁNGEL CEVALLOS GAOS

CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS

CUERNAVACA, MOR. ABRIL, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mi mamá, Edith, por su apoyo incondicional y su presencia siempre alentadora y cariñosa.

A mis abuelitos, Francisco y Sidonia, por su cariño y porque me inculcaron el amor por la naturaleza y por el trabajo.

A mi hermano, Octavio, porque siempre está ahí cuando lo necesito.

A mis sobrinos, Íker, Pao y Layla, que hacen mi vida muy feliz.

A Juan, por acompañarme y motivarme.

Agradecimientos

Agradezco al Dr. Pablo Vinuesa por su guía constante y su paciencia, que me permitieron culminar este proyecto, por ampliar mi formación con sus conocimientos y experiencia, y por fomentar mi independencia profesional.

A mi comité tutor, los doctores Miguel Ángel Cevallos Gaos y Jesús Silva Sánchez por su apoyo a lo largo de esta investigación.

A mi jurado de tesis, los doctores Luis David Alcaraz Peraza, Víctor Manuel González Zúñiga, María del Rosario Morales Espinosa y Cinthia Ernestina Núñez López, por sus atinadas observaciones a mi trabajo.

A los doctores Susana Brom, David Romero y Alejandro García y a mis compañeros de laboratorio: Agus, Alfredo, Aracely, Ciro, Eunice, Fabiola, Gonzalo, Javier, Jazmín, Laura, Mariana, Osam, Pablo, Perla, Rafa, Roger, Sofí, Toño, Ángeles, Anthony, Dani, Javiercito, Mari, Pedro, Toña por sus aportaciones certeras a mi trabajo durante los seminarios y en el transcurso de los experimentos además de compartir risas y pláticas.

Al Sr. Antonio Trujillo por su compañía y colaboración durante los muestreos, al Lic. Alfredo Hernández por su apoyo en la administración de los servidores e instalación de programa.

A Mtra. Sofía Mérida por facilitarnos los antibióticos necesarios para los experimentos.

Don Juan Alvear Gutiérrez e Ing. Norberto Bahena por permitirnos realizar el muestreo en los Sauces y las Estacas respectivamente.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Centro de Ciencias Genómicas por acogerme estos años.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por otorgarme la beca que hizo posible llevar a cabo mi investigación científica de tiempo completo.

Al Posgrado en Ciencias Biomédicas y al Programa en Ingeniería Genómica del Centro de Ciencias Genómicas donde pude llevar a cabo mi formación y realizar los experimentos del este proyecto.

Al programa de Apoyos de Estudio de Posgrado (PAEP) por el financiamiento para asistir a los siguientes congresos: 115th General Meeting /American Society for Microbiology 2015 y ASM Microbe 2016 Boston, Massachusetts.

A la Lic. Adela Iglesias, por su invaluable apoyo en la redacción y corrección del texto de esta tesis, durante horas interminables, aligeradas por el humor y la amistad.

A los maestros Andrea Salas, Sergio Bautistas y Zafiro Andrade por su apoyo, comprensión y enseñanzas recibidas durante mi periodo de titulación.

A mis amigos que me escucharon y animaron durante este tiempo, Ana, Barbie, Denis, Eliza, Juan Carlos, Mario, Migue, Mir, Noé, Paty, Prisma, Rocio, Tito, Victor.

Marisol Villafañez y Denny Peralta por su guía en el proceso de titulación.

Índice de general

Glosario.....	i
I. Resumen.....	i
II. Abstract.....	i
1. Esquema general y motivación de la tesis.....	1
2. Introducción y antecedentes generales	2
3. Planteamiento del problema.....	6
4. Hipótesis.....	7
4.1 Predicciones de la hipótesis.....	7
5. Objetivo general	7
5.1 Objetivos particulares.....	7
6. Diseño experimental	8
Capítulo 1. Prospección de la diversidad y de los perfiles de resistencia de las proteobacterias ambientales.....	9
Capítulo 2. <i>Stenotrophomonas</i>.....	16
2.1 Antecedentes: Microbiología, epidemiología y taxonomía del género	16
2.2 Objetivos.....	19
2.3 Resultados.....	19
2.3.1 Delimitación de especies de la colección de aislamientos ambientales de <i>Stenotrophomonas</i>	20
2.3.1.1 Estructura filogenética del género <i>Stenotrophomonas</i> : Identificación de ocho especies, entre las cuales destaca <i>S. maltophilia</i> , y definición de hipótesis de bordes de especies.....	20
2.3.1.2 Delimitación de especies en el complejo <i>S. maltophilia</i> (<i>S. maltophilia</i> sensu stricto y cuatro nuevas especies) mediante la delimitación bayesiana basada en el coalescente multiespecies y análisis de factores de Bayes	22
2.3.1.3 Análisis de la estructura genética de las poblaciones ambientales del complejo <i>S. maltophilia</i>	23
2.3.1.4 Determinación de los polimorfismos de ADN y las tasas de recombinación en poblaciones ambientales Smc y Sterr.....	24
2.3.2 Filogenia genómica del género <i>Stenotrophomonas</i>	25
2.3.2.1 Validación y refinamiento de la delimitación de especies realizada con MLSA mediante aproximaciones filogenómicas.....	25
2.3.3 Análisis de asociación de las propiedades fenotípicas y ecológicas de los linajes: <i>S. maltophilia</i> como única productora de metalo- β -lactamasas.....	25
2.3.3.1 Análisis de correspondencia múltiple (MCA)	25
2.3.3.2 Análisis de la varianza.....	27
2.3.3.3 Gráficas de asociación de la expresión de fenotipos de β -lactamasas	28

2.3.3.4 Asociación de especies de <i>Stenotrophomonas</i> y hábitat de aislamiento	29
2.3.4 Métodos comerciales demuestran poca sensibilidad para la identificación de especies <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	30
2.3.5 Pruebas de susceptibilidad para <i>Stenotrophomonas</i> frente a antibióticos de elección (CLSI, EUKAST): Levofloxacin como una opción para el tratamiento de infecciones ocasionadas por <i>S. maltophilia</i>	32
2.3.6 Ejemplos puntuales del impacto de la contaminación antropogénica sobre los elementos genéticos móviles de <i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>	34
2.4 Discusión	37
2.5 Conclusión.....	40
2.6 Perspectivas	41
Capítulo 3. <i>Acinetobacter</i>	42
3.1 Antecedentes: Microbiología, epidemiología y taxonomía del género	42
3.2 Objetivos	47
3.3 Métodos.....	48
3.3.1 Desarrollo e implementación de un esquema de MSLA.....	48
3.4 Resultados.....	49
3.4.1 Propuesta de un nuevo esquema de MLSA a nivel de género para <i>Acinetobacter</i> y formulación de los oligonucleótidos	49
3.4.2 Diversidad genética de <i>Acinetobacter</i> analizado con el nuevo esquema de MLSA: Identificación de nueve especies y tres posibles nuevas especies recuperadas de ríos de Morelos	50
3.4.3 Asociación entre <i>Acinetobacter</i> y el hábitat de aislamiento	52
3.4.4 Resistencia de <i>Acinetobacter</i> a antimicrobianos: <i>A. baumannii</i> y <i>A. bereziniae</i> son panresistentes.....	52
3.4.5 Filogenia genómica y análisis genómico de 14 cepas ambientales mexicanas de <i>Acinetobacter</i>	54
3.4.6 Elementos genéticos móviles en <i>Acinetobacter</i>	57
3.4.7 Asociación de las características ambientales y genéticas de 14 cepas de <i>Acinetobacter</i> mexicanas.....	63
3.5 Discusión	66
3.6 Conclusión.....	68
3.7 Perspectivas	69
7. Conclusiones generales	70
8. Materiales y métodos	71
8.1 Sitios de muestreo	71
8.2 Aislamiento de microorganismos ambientales	71
8.3 Determinación de perfiles de resistencia	72
8.4 Amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de secuencias de 16S rDNA y su análisis filogenético.....	73
8.5 Identificación fenotípica de BLEEs y MBLs	73

8.6 Secuenciación de genomas completos de cepas selectas.....	74
8.7 Metodología capítulo 1: <i>Stenotrophomonas</i>	74
8.8 Metodología empleada en el capítulo 3: <i>Acinetobacter</i>	74
8.8.1 Amplificación de PCR y análisis filogenético de máxima verosimilitud de secuencias de multilocus	74
8.8.2 Perfil de plásmidos	74
8.8.3 Secuenciación, ensamble, anotación y análisis de genomas	74
9. Anexos.....	76
10. Bibliografía	168

Índice de figuras

Figura 1A. Sitios de muestreo del estudio	9
Figura 1B. Localización de los cinco puntos de muestreo.....	9
Figura 1C. Aspecto de los cinco puntos de muestreo	10
Figura 2. Porcentaje de eficiencia de los medios utilizados en este estudio para recuperar diferentes géneros	12
Figura 3. Desglose taxonómico a nivel de género de 800 secuencias de 16S RNA	13
Figura 4. Análisis de <i>clustering</i> jerárquico de perfiles de resistencia a antibióticos correspondientes a los aislamientos de agua y sedimentos el río Apatlaco (Temixco; muestreo realizado en mayo de 2013)	15
Figura 5. Filogenia de máxima verosimilitud (ML) de las secuencias de multilocus de las especies del género <i>Stenotrophomonas</i>	21
Figura 6. Análisis de la estructura poblacional de nuestras cepas, correspondientes al complejo <i>S. maltophilia</i> a Smc1, a Smc2 y a Smc4	24
Figura 7. Análisis de correspondencia múltiple	26
Figura 8. ANOVA de una vía muestra a <i>S. maltophilia</i> como MDR, donde los aislamientos de sitios contaminados presentan mayor número de resistencias a antibióticos.....	27
Figura 9. Gráfico de asociación bidireccional de las especies de <i>Stenotrophomonas</i> con > 10 aislamientos ambientales mexicanos y su fenotipo de producción de β -lactamasas.....	28
Figura 10. Gráfico de asociación de cuatro vías con los resultados del análisis de χ^2 multivía de las especies de <i>Stenotrophomonas</i> con respecto al hábitat, el medio de aislamiento y el nivel de contaminación del sitio de aislamiento	30
Figura 11. Análisis de red de la susceptibilidad de <i>Stenotrophomonas</i> frente a antibióticos de elección, antibióticos de última generación e inhibidores de β -lactamasas.....	33
Figura 12. Diagramas de caja para el número individual de resistencias a antimicrobianos de los aislamientos ambientales mexicanos de <i>Stenotrophomonas</i>	34
Figura 13A. Resistencia adquirida en <i>S acidaminiphila</i> (TEXM2D_MKIMI4_3) debido a que codifica un integrón de clase 1 que contiene bla-OXA-2 una β -lactamasa de clase D que no se ha reportado previamente en <i>Stenotrophomonas</i>	36
Figura 13B. Filogenia de máxima verosimilitud de la β -lactamasa de clase D bla-OXA-2 con los 30 blastp hits	36
Figura 14. Filogenia de máxima verosimilitud de la cepa ZAC14D2_NAIMI4_2 de la proteína AOT14_04360 que codifica a una nueva cloranfenicol O-acetiltransferasa, con 50 blastp hits ..	37
Figura 15. Mapa de distribución de los amplicones del gen <i>rpoB</i> del género <i>Acinetobacter</i>	48
Figura 16. Distribución de longitud de rama de los seis oligonucleótidos seleccionados.....	49

Figura 17. Valores de soporte de ramas para los seis oligonucleótidos propuestos en nuestro esquema	49
Figura 18. Filogenia de Máxima Verosimilitud (ML) con seis genes de MLSA diseñado para el género <i>Acinetobacter</i>	51
Figura 19. Gráfico de asociación de tres vías muestra los resultados del análisis χ^2 de las especies de <i>Acinetobacter</i> con respecto al hábitat y la calidad ambiental del sitio de donde fueron aisladas	52
Figura 20. Diversidad de los fenotipos de susceptibilidad, resistencia y expresión de β -lactamasas detectadas entre los aislamientos de <i>Acinetobacter</i> (A-F) ambientales mexicanos	53
Figura 21. Filogenia de máxima verosimilitud del genoma core del género <i>Acinetobacter</i> a partir de la supermatriz obtenida por la concatenación de 834 alineamientos seleccionados con GET_PHYLOMARKERS.....	56
Figura 22. Perfil de plásmidos de aislamientos ambientes de especies pertenecientes al género <i>Acinetobacter</i> mediante la técnica (Kieser et al., 1984)	57
Figura 23. Integrón de clase I de <i>Acinetobacter_baumannii</i> _TEXM2A_MKIMI4_16	58
Figura 24. Integrón de clase I de <i>Acinetobacter_berezinae</i> _TEXM3A_SCIMI4_2.....	58
Figura 25. Genes de resistencia a antibióticos identificados en aislamientos ambientales mexicanos del género <i>Acinetobacter</i> contra la base de datos CARD	59
Figura 26. Filogenia genómica de 14 cepas selectas de <i>Acinetobacter</i> ambientales mexicanas .	63
Figura 27. Ejemplo de la disposición de los sensidisco en la técnica de sinergismo de doble disco (SDD) realizado en una cepa control productora de MBL y ESBL	72

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de los sitios de muestreo basada en los niveles de conteo de coliformes fecales termotolerantes (TTFCs) y <i>E. coli</i> termotolerante (TTEc) unidades formadoras de colonia (cfu/100ml), medidas en la columna de agua.....	10
Tabla 2. Taxonomía del género <i>Stenotrophomonas</i>	16
Tabla 3. Análisis de factor de Bayes para la hipótesis de delimitación de cinco especies dentro del complejo <i>S. maltophilia</i> , más los genogrupos #8 y #10, basados en las probabilidades marginales calculadas para cada hipótesis por nuestra vía de muestreo	23
Tabla 4. Pruebas de neutralidad McDonald-Kreitman (MK), diferenciación genética y estimaciones de flujo genético entre aislamientos ambientales de los linajes Smc1, Smc2 y <i>S. maltophilia</i> recuperados de ríos Mexicanos basado en el conjunto de datos concatenado (3591 sitios)	23
Tabla 5. Estadística descriptiva de polimorfismos de DNA, pruebas de crecimientos de población y neutralidad para los aislamientos ambientales de Smc1, Smc2, <i>S. maltophilia</i> (Smal) y <i>S. terrae</i> (S. terr) linajes recuperados de ríos mexicanos con base en el conjunto de datos concatenados (3591 sitios).....	24
Tabla 6. Estimaciones de recombinación para aislamientos ambientales de Smc1, Smc2, <i>S. maltophilia</i> (Smal) y <i>S. terrae</i> (Sterr).....	25
Tabla 7. Clasificación de especies de <i>Stenotrophomonas</i> con base en diferentes metodologías	31
Tabla 8. Taxonomía del género <i>Acinetobacter</i>	42
Tabla 9. Valores de kde obtenidos para los genes propuestos en nuestro esquema de MLST....	50
Tabla 10. Características de las secuencias de genomas de cepas ambientales del género <i>Acinetobacter</i>	55
Tabla 11. Funciones y mecanismos de acción identificados en genes de resistencia a antibióticos de nuestros aislamientos ambientales mexicanos de <i>Acinetobacter</i> que cuentan con secuencia de su genoma completo (n=14)	60

Glosario

ANI: Identidad nucleotídica promedio (por sus siglas en inglés)

BLEE: de espectro extendido

CDC: Centro para el control y prevención de enfermedades (por sus siglas en inglés)

ECDC: Centro europeo para el control y prevención de enfermedades (por sus siglas en inglés)

ESKAPE: Es un acrónimo que abarca los nombre de seis patógenos bacterianos comúnmente asociados con la resistencia antimicrobiana. Las seis especies son *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter*.

ICE: Elementos integrativos conjugativos

IDSA: *Infectious Diseases Society of America*

MBL: Metallo- β -lactamasa

MDR: Multidrogo resistente

ML: Máxima verosimilitud

MLSA: *Multi Locus Sequence Analysis*

MSC: Coalescente multiespecies

OMS: Organización Mundial de la Salud

I. Resumen

Una de las mayores amenazas para la salud humana radica en el hecho de que las bacterias patógenas oportunistas están adquiriendo una creciente resistencia a los agentes antibióticos. Durante muchos años, la resistencia bacteriana a los antibióticos se ha estudiado con un fuerte sesgo clínico. Sin embargo, recientemente la investigación en los ambientes naturales ha tomado relevancia. Por un lado, está claro que el resistoma ambiental es el principal reservorio de nuevos genes de resistencia. Por otro lado, se ha postulado que la liberación masiva de poblaciones de bacterias asociadas al tracto digestivo de humanos y animales, y su diseminación a través de las aguas residuales, puede promover el intercambio de determinantes de resistencia entre las bacterias transitorias y exógenas, provenientes de los desechos, y las bacterias nativas.

En este contexto, postulamos la hipótesis de que las comunidades nativas de proteobacterias que habitan lugares con fuerte contaminación residual estarán enriquecidas en determinantes de resistencia. Adquirirían estos determinantes por transferencia horizontal de diversos elementos genéticos móviles donados por bacterias fecales.

Para validar la hipótesis, comparamos la diversidad y perfiles de resistencia de una amplia colección de proteobacterias recuperadas a lo largo de tres años en el Estado de Morelos. Los especímenes se recuperaron a partir de sedimentos y columna de agua de ríos y arroyos con niveles contrastantes de contaminación.

Para hacer un análisis comparativo relevante, decidimos que era crítico identificar al menos dos géneros bacterianos, que pudiéramos recuperar de todas las muestras ambientales, de alta prevalencia como agentes causales de infecciones oportunistas nosocomiales. Además, para poder hacer una asociación precisa entre los fenotipos y los genotipos bacterianos, fue esencial realizar una delimitación precisa y fidedigna de las especies bacterianas. Esto lo logramos mediante análisis multilocus de secuencias (MLSA) con métodos filogenéticos y de genética de poblaciones avanzados. De entre todas las especies que recuperamos, nos enfocamos en las de los géneros *Stenotrophomonas* y *Acinetobacter*, ya que identificamos medios de cultivo que nos permitieron recuperarlas consistentemente de sedimentos y columna de agua de sitios limpios y contaminados. Además, ciertas especies de estos géneros cuentan entre las más prevalentes y peligrosas como patógenos oportunistas, y estas resultaron ser las que presentaron mayor resistencia a antibióticos.

Recuperamos una amplia diversidad de bacterias del género *Stenotrophomonas*, y descubrimos varias cosas: *i*) Existen muchos problemas taxonómicos en la literatura y bases de datos de secuencia; *ii*) los linajes basales son poco resistentes, mientras que algunos del *S. maltophilia* complex (*Smc*) son mucho más resistentes; *iii*) el *Smc* comprende al menos cinco linajes, que definimos así: cuatro genoespecies nuevas, de resistencia intermedia y *S. maltophilia sensu lato* (*Smsl*), que comprende un grupo de especies con fenotipo de multiresistencia a los antibióticos y expresión de metalo- β -lactamasas, incluyendo a *S. maltophilia sensu stricto*. De los 108 aislamientos analizados de este género, la mayoría correspondía al *Smc*, y dentro de este predominaban los aislamientos clasificados como *Smsl*. Identificamos otras especies (*S. acidaminiphila*, *S. humi* y *S. terrae*), correspondientes a los linajes basales, que resultaron ser muy susceptibles a los antibióticos. Estos resultados conforman la publicación Ochoa-Sánchez y Vinuesa, (2017).

Mediante un análisis filogenómico, pudimos validar la clasificación basada en el MLSA. Adicionalmente, el análisis de secuencias genómicas reveló que las cepas de *S. acidaminiphila* recuperadas de sedimentos contaminados portan genes de resistencia novedosos, ligados a elementos genéticos móviles (EGM) cromosomales, como islas genómicas y un nuevo integrón

de clase I, portador de cassetes de resistencia similares a los de bacterias entéricas y *Pseudomonas* hospitalarias. Cabe resaltar que no se detectaron plásmidos en los aislamientos ni en las secuencias genómicas, lo cual demuestra el impacto de los EGM cromosomales en la transferencia de resistencias (resistencia adquirida).

En cuanto al género *Acinetobacter*, desarrollamos un esquema de MLSA basado en seis *loci* del genoma *core* amplificados con oligonucleótidos degenerados. El análisis de 37 aislamientos ambientales con este esquema permitió identificar 11 especies conocidas (*A. tandoii*, *A. schindleri*, *A. johnsonii*, *A. bereziniae*, *A. soli*, *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. oleivorans*, *A. junii*, *A. beijerinckii* y *A. lactucae*) y tres posibles nuevas especies, a las cuales denominamos: *A. sp1*, *A. sp2* y *A. sp3*. Estos aislamientos abarcan buena parte del espectro de diversidad filogenética del género, lo cual demuestra la utilidad y robustez del esquema. Generamos las secuencias genómicas para 14 de estos aislamientos, y un análisis filogenómico de las mismas mostró que la clasificación por MLSA era totalmente congruente con la filogenia del *core* genómico, lo cual demostró su utilidad para delimitar especies en el género. Descubrimos varias cosas: *i*) Nuestros aislamientos ambientales de *A. baumannii* y *A. bereziniae* son pan-resistentes; *ii*) los aislamientos recuperados de sitios contaminados portan un número mucho mayor de plásmidos y son más resistentes que los obtenidos de sitios limpios; *iii*) reportamos también dos nuevos integrones de clase I para *A. baumannii* y *A. bereziniae*.

Después de haber analizado los aislamientos de *Stenotrophomonas*, carente de plásmidos, y *Acinetobacter*, con número variable de plásmidos, pudimos concluir que la contaminación antropogénica juega un papel determinante en el moldeado del resistoma de las especies de proteobacterias nativas estudiadas. En particular, un ambiente contaminado promueve la adquisición, vía transferencia horizontal, de EGM, tanto cromosomales como plasmídicos, portadores de determinantes de resistencia a una amplia gama de antibióticos de todas las familias de relevancia clínica.

II. Abstract

One of the main threats for human health lies in the fact that opportunistic pathogenic bacteria are increasingly becoming resistant to antibiotic agents. For many years, bacterial antibiotic resistance has been studied with a strong clinical bias. Recently, however, investigation in natural environments has become relevant. On the one hand, it is clear that the environmental resistome is the main reservoir of antibiotic resistance genes. On the other, it has been posed that the massive liberation of bacterial populations associated to the digestive tract of humans and animals, as well as their spread through residual waters, can promote the interchange of resistance determinants among transitory and exogenous bacteria, coming from waste, and native bacteria.

In this context, we pose the hypothesis that the resistance determinants of native communities of proteobacteria living in places with strong residual pollution will be enriched. They would acquire these determinants through the horizontal transference of several mobile genetic elements granted by fecal bacteria.

To validate our hypothesis, we compared the diversity and the resistance profiles of a large collection of proteobacteria. The specimens were retrieved during three years in the state of Morelos from the sediment and water column of rivers with different levels of pollution.

To carry out a relevant comparative analysis, we decided that it was critical to identify at least two bacterial genus, which could be retrieved from the environmental samples, with high prevalence as causative agents of opportunistic, nosocomial infections. Moreover, in order to make a precise association between bacterial phenotypes and genotypes, it was essential to carry out a precise and reliable delimitation of the bacterial species. This was achieved through multilocus sequence analyses (MLSA) with advanced phylogenetic and population genetics approaches. Among all the species we retrieved, we focused on the genus *Stenotrophomonas* and *Acinetobacter*, because we identified culture mediums that allowed us to retrieve them consistently from the sediment and water column of rivers from clean and polluted sites. Moreover, some of the species belonging to these genus are among the most prevalent and dangerous as opportunistic pathogens, and they turned out to be the ones with the highest antibiotic resistance.

We retrieved a large diversity from the genus *Stenotrophomonas*, and we found several things: *i*) There are many taxonomical problems in the existing literature and sequence databases; *ii*) the basal lineages are not very resistant, whereas some belonging to the *S. maltophilia* complex (*Smc*) are much more resistant; *iii*) the *Smc* comprises at least five lineages. We defined these lineages as follows: Four new genospecies with intermediate resistance and *S. maltophilia sensu lato* (*Smsl*), which comprises a group of species with a multiple drug resistant phenotype and expression of metallo- β -lactamases, including *S. maltophilia sensu stricto*. Out of the 108 *Stenotrophomonas* isolates, most corresponded to the *Smc*; among them, the most predominant were classified as *Smsl*. We also identified other species (*S. acidaminiphila*, *S. humi* and *S. terrae*), corresponding to the basal lineages, which turned out to be very susceptible to antibiotics. These results make up the paper by Ochoa-Sánchez and Vinuesa (2017).

By means of a phylogenetic analysis, we were able to validate the MLSA-based classification. Furthermore, the genomic sequences analysis revealed that the *S. acidaminiphila* strains retrieved from polluted sediments carry novel resistance genes, linked to chromosomal mobile genetic elements (MGEs), such as genomic islands and a new class I integron that carries

resistance cassettes similar to those carried by enteric bacteria and nosocomial *Pseudomonas*. It is worth noting that no plasmids were detected in the isolates nor in the genomic sequences. This confirms the impact of chromosomal MGEs in the transference of resistance (acquired resistance).

With respect to the *Acinetobacter* genus, we developed a MLSA scheme based on six *loci* from the core genome amplified with degenerate oligonucleotides. The analysis of 37 environmental isolates with this scheme allowed us to identify 11 known species (*A. tandoii*, *A. schindleri*, *A. johnsonii*, *A. bereziniae*, *A. soli*, *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. oleivorans*, *A. junii*, *A. beijerinckii* and *A. lactucae*) and three possible new species, which we called: *A. sp1*, *A. sp2* and *A. sp3*. These isolates comprise a good deal of the phylogenetic spectrum of the genus, which points to the usefulness and robustness of the scheme. We generated the genomic sequences for 14 of these isolates and carried out a phylogenomic analysis with the results. This showed that the MLSA-based classification was completely congruent with genomic core phylogeny, which points to its usefulness when delimitating the species of the genus. We found out several things: *i*) Our *A. baumannii* and *A. bereziniae* environmental isolates are pan-resistant; *ii*) isolates retrieved from polluted sites carry a much higher number of plasmids and more resistant than those retrieved from clean sites; *iii*) we reported two new class I integrons for *A. baumannii* and *A. bereziniae*.

After having analyzed the *Stenotrophomonas* isolates, with no plasmids, and the *Acinetobacter* isolates, with a variable number of plasmids, we were able to conclude that anthropogenic pollution plays a determinant role in modeling the resistome of the native proteobacteria studied. More specifically, a polluted environment promotes the acquisition, via horizontal transference, of MGES, both chromosomal and plasmidic, carriers of resistance determinants to a wide range of antibiotics from all the families with clinical relevance.

1. Esquema general y motivación de la tesis

El presente trabajo surge debido a la inquietud por aportar información relevante que contribuya a caracterizar y entender mejor la dimensión ambiental de la creciente problemática de resistencia antimicrobiana en diferentes especies de bacterias. Nuestra investigación se centró en el ambiente natural, ya que la mayoría de los estudios en este campo se han enfocado al entorno clínico. En México son muy escasos los estudios enfocados al análisis comparativo del resistoma de comunidades y poblaciones ambientes de bacterias.

Este trabajo está conformado por tres capítulos y una introducción general:

La primera parte es una introducción, que aborda los siguientes puntos: Los antecedentes generales, el planteamiento del problema, las preguntas de investigación, la hipótesis, las predicciones de la hipótesis, los objetivos (general y particulares), los requisitos para el cumplimiento de los objetivos. El capítulo uno reporta los resultados de la fase prospectiva del proyecto: análisis de la diversidad y de los perfiles de resistencia de las proteobacterias ambientales).

El segundo capítulo está dedicado al género *Stenotrophomonas* y aborda los siguientes puntos: Los antecedentes generales, los objetivos particulares, los resultados, la discusión, la conclusión y las perspectivas futuras. Fue a partir de este capítulo que se obtuvieron tres publicaciones, incluyendo la requerida para la obtención del grado. Las tres se anexan al final.

El tercer capítulo está dedicado al género *Acinetobacter* y aborda los siguientes puntos: Los antecedentes generales, los objetivos particulares, los resultados, la discusión, la conclusión y las perspectivas futuras. Datos no publicados.

Al final, aparecen dos secciones adicionales, que son comunes para los tres capítulos anteriores: Las conclusiones generales de la investigación, por un lado, y los materiales y métodos utilizados, por el otro.

Además, se incluye una serie de Anexos con información detallada de algunos de los temas abordados en los capítulos.

2. Introducción y antecedentes generales

Diferentes organizaciones, como los Centros de Control y Prevención de Enfermedades (**CDC**), el Centro Europeo para el Control y Prevención de Enfermedades (**ECDC**) y la Organización Mundial de la Salud (**OMS**), consideran que las infecciones causadas por bacterias resistentes a múltiples drogas (**MDR**) son una emergencia global y constituyen un grave problema de salud pública (Roca et al. 2015). Las infecciones causadas por estos microorganismos se han vuelto difíciles e incluso imposibles de tratar con los antibióticos actuales, lo cual ha redundado en una alta morbilidad y mortalidad en la población y, además, en altos costos para la sociedad (Carlet et al. 2011).

A nivel mundial, el incremento de la resistencia bacteriana a los antibióticos involucra muchos patógenos. Entre ellos, destaca un grupo de bacterias **multirresistentes** (resistentes a más de tres familias de antibióticos) y **panresistentes** (resistentes a todos los antibióticos excepto a dos familias) (Magiorakos et al. 2012), cuya prevalencia en los hospitales es alta. Este grupo se ha denominado **ESKAPE**, según la primera letra de cada especie que lo integra (Boucher et al. 2009): **E**, *Enterococcus faecium*; **S**, *Staphylococcus aureus*; **K**, *Klebsiella pneumoniae*; **A**, *Acinetobacter baumannii*; **P**, *Pseudomonas aeruginosa*; **E**, *Enterobacteriaceae*, como *Escherichia coli* y *Enterobacter cloacae*.

En México, se llevó a cabo un estudio en todos los hospitales pertenecientes al Instituto Mexicano del Seguro Social que reveló que los microorganismos aislados con mayor frecuencia en infecciones nosocomiales son: *Escherichia coli* (16.4%), *Staphylococcus coagulasa-negativa* (14.7%), *Pseudomonas aeruginosa* (11.1 %), *Klebsiella pneumoniae* (6.7%), y *Acinetobacter spp.* (3.5%) (Arias-Flores et al. 2016). También existe una alerta con respecto a bacterias emergentes, como *Ochrobactrum anthropi* (Romano et al. 2009); (Shrishrimal 2012) y reemergentes, como *Stenotrophomonas maltophilia* (Brooke 2012, 2014; Ryan et al. 2009). Es muy importante señalar que estas y otras especies relacionadas de proteobacterias se encuentran también en ambientes extrahospitalarios, como los cuerpos de agua, los suelos y las plantas (Perry and Wright 2013).

La investigación de los ecosistemas no clínicos ha cobrado relevancia en este siglo, pues se les considera determinantes para entender la evolución de la resistencia a los antibióticos entre las bacterias (Alonso, Sánchez et al. 2000; Timothy R. Walsh & Mark A. Toleman 2005; Aminov 2009, Martínez JL, 2018). Puesto que las bacterias (nativas y exógenas) están intercambiando continuamente material genético, incluyendo los genes de resistencia antimicrobiana (Sánchez, Hernández et al. 2008; Sánchez, Hernández et al., 2009), es

indispensable encontrar formas para contribuir a la solución del problema de la resistencia considerando su dimensión ambiental.

En lo que respecta a los ambientes acuáticos, es importante resaltar que las bacterias presentes en el agua pueden ser **nativas** (bacterias residentes del sitio, como las presentes en los sedimentos), **exógenas** (bacterias que se incorporan al pasar el agua y quedan en la superficie de los sedimentos) o **transitorias** (bacterias que meramente pasan por el sitio arrastradas por la columna de agua). Las bacterias llegan a estos ambientes principalmente de dos maneras: de forma natural, a través de los desechos de los vegetales y los animales silvestres y a través de los residuos de suelo; y de forma antropogénica, a través de los desechos provenientes de los hospitales, las granjas de animales, las industrias y los hogares. Esta última modalidad contribuye de manera determinante al proceso de contaminación, en el cual las aguas residuales juegan un papel medular (Martínez 2018)(Baquero, Martínez, and Cantón 2008). Esto se ha demostrado en estudios realizados en ambientes acuáticos marinos que han reportado que más del 90% de las cepas bacterianas encontradas en el mar son resistentes a más de un antibiótico y el 20%, al menos a cinco (Baquero, Martínez, and Cantón 2008).

De especial relevancia para nuestra investigación, es el hecho de que el agua no solo representa una vía de diseminación de organismos resistentes a antibióticos entre poblaciones humanas y animales, sino que también es una ruta por la cual los genes que confieren resistencia a los antibióticos —provenientes principalmente de los residuos humanos antes mencionados— están introduciéndose en las comunidades bacterianas nativas. Ahí, se lleva a cabo un proceso de intercambio y adquisición de material genético, incluyendo los genes de resistencia, punto focal de nuestro estudio. Posteriormente, estas bacterias o sus genes de resistencia pueden retransmitirse, directa o indirectamente, de vuelta a los ambientes humanos (Zhan et al. 2008).

El impacto de la actividad humana se ha observado incluso en las bacterias de lugares remotos, como la Antártida, que muestran varios grados de resistencia a antibióticos (De Souza et al. 2006). A pesar de las barreras geográficas, los genes de resistencia se han transmitido a las poblaciones humanas más aisladas, donde existen aún en ausencia de una evidente presión de selección. Un ejemplo de ello se encuentra en la selva amazónica peruana, donde se han detectado niveles altos de resistencia a los antibióticos más antiguos en las *E. coli* comensales de los habitantes de la zona, que nunca han sido tratados con estos agentes (Bartoloni et al. 2009, 2008). Se puede suponer que la exposición se dio a través del agua, que acarrea también residuos de fármacos (Ezzariai et al. 2018)

El uso excesivo de antibióticos ha provocado que estos compuestos se acumulen en el ambiente. El impacto de esta acumulación en la emergencia de la resistencia antimicrobiana no debe subestimarse (Roca et al. 2015). Algunos de los antibióticos utilizados para el tratamiento de patógenos humanos también se han usado para tratar enfermedades en animales y también como agentes profilácticos y promotores del crecimiento (Coenen et al. 2013). Todo esto ha promovido la utilización indebida de estos fármacos, favorecido por las pobres políticas para regir su uso.

Por ejemplo, la filosofía y la legislación de la administración de antibióticos en la agricultura varía entre países. Suecia promulgó la Ley de Comestibles que prohíbe la administración de antibióticos al ganado (Hughes 2004). Sin embargo, otros países, como el Reino Unido, los Estados Unidos, Noruega, México, la India e Indonesia aprueban el uso de oxitetraciclina en acuicultura. Destaca el hecho de que solo México e Indonesia permite el uso de enrofloxacin (Serrano 2013).

La conjunción de todas estas circunstancias ha desembocado en el gravísimo problema de salud pública que mencionamos al inicio de este trabajo: la diseminación de la multirresistencia antimicrobiana entre las bacterias, tanto en ambientes naturales como clínicos.

El estudio de la evolución y la ecología de la resistencia antimicrobiana es esencial para entender el problema y poder combatirlo (F. Walsh 2013). Una de las bases para poder llevar esto a cabo es **la identificación y la delimitación de las especies microbianas**, tanto en los ambientes clínicos como en los extrahospitalarios (agricultura, bioterrorismo, industria y medio ambiente) (Vinuesa et al. 2008). El concepto de especie en estos microorganismos se ha debatido durante varias décadas y sigue siendo un tema controversial. Los retos para definir una especie bacteriana incluyen su diversidad genética, su reproducción asexual y su capacidad para transferir genes horizontalmente (Shapiro, Leducq, and Mallet 2016). De acuerdo a las teorías actuales, para delimitar las especies es esencial identificar sus atributos fenotípicos específicos, relevantes en su nicho ecológico (Cordero and Polz 2014); (Cadillo-Quiroz et al. 2012; Shapiro 2014). Una delimitación correcta es crítica para entender la ecología y evolución de la resistencia a los antibióticos. Esto es así porque permite hacer asociaciones precisas entre fenotipos y genotipos y determinar cuáles son las bacterias verdaderamente resistentes, identificando su resistoma.

El resistoma antibiótico es la colección de todos los genes que directa o indirectamente contribuyen a la resistencia frente a estos agentes, tanto en el ámbito clínico como en el

ambiental o en el espacio de interacción entre ambos (Perry and Wright 2013). Este resistoma comprende todos los genes o las vías metabólicas capaces de conferir resistencia cuando se expresan en un hospedero específico (Dantas and Sommer 2012). El resistoma puede identificarse en diferentes niveles de complejidad: desde los genes de resistencia específicos hasta un plásmido, una cepa (Poirel, Bonnin, and Nordmann 2011), una comunidad microbiana definida (Sommer, Dantas, and Church 2009; Riesenfeld, Goodman, and Handelsman 2004) o un nicho ambiental.

La tecnología que está revolucionando la identificación bacteriana es la **secuenciación de genomas** completos de última generación. En conjunto con análisis filogenéticos, esta estrategia permite entender la historia evolutiva y la diversidad genómica de las especies bacterianas. Illumina es el nombre de la tecnología que domina el mercado actualmente. Se caracteriza por su capacidad para secuenciar millones de pequeños fragmentos de ADN en paralelo. Illumina permite generar la secuencia genómica completa, aunque fragmentada. Una solución para este problema es la secuenciación de tercera generación, que ofrece lecturas largas. PacBio y Oxford Nanopore destacan como las plataformas líderes en el mercado (Goodwin, McPherson, and McCombie 2016).

Estos análisis pueden abarcar el genoma en su totalidad o diferentes porciones del mismo. Se utiliza el término **pangenoma** (propuesto por (Tettelin et al. 2005) para referirnos a la totalidad de genes de una especie. El pangenoma , a su vez, comprende a: 1) **genoma core**, que abarca todos los genes cuyas funciones están relacionadas con las funciones básicas de la especie y que comparten las cepas de un estudio; 2) **genoma accesorio**, también conocido como cepa específica o prescindible, que contiene información genética presente en una o más cepas, es donde se encuentran los genes de resistencia antimicrobiana, y permite la adaptación a diferentes nichos, y 3) **genes únicos**, que son aquellos presentes en un solo genoma. El **pangenoma** de una especie puede ser **abierto**, cuando va creciendo cada vez que se adicionan cepas al estudio, o **cerrado**, cuando el genoma de un número reducido de cepas es suficiente para definir la especie (Medini et al. 2005).

El uso de esta nueva tecnología ha promovido la formulación de nuevos puntos de corte para delimitar especies. El más utilizado es la **identidad nucleotídica promedio (ANI**, por sus siglas en inglés). ANI representa un valor de identidad y similitud entre regiones homólogas compartidas por genomas y se ha definido con base en el punto de corte de la hibridación ADN-

ADN, donde el 70% de la hibridación equivale al 95% del valor ANI (Richter and Rossello-Mora 2009).

3. Planteamiento del problema

Entre las limitaciones principales de las investigaciones llevadas a cabo en este campo, se encuentran, por un lado, el escaso conocimiento de los ambientes naturales y, por el otro, las deficiencias en los métodos para lograr una clasificación correcta de las especies bacterianas.

No se ha prestado suficiente atención a la dimensión ambiental del problema de la resistencia esto se debe a que los estudios se han basado primordialmente en los ambientes clínicos, con la idea de que la selección de bacterias resistentes solo ocurre en estos entornos. Nosotros proponemos que la contaminación antropogénica, en especial las aguas residuales con contaminación fecal, que llevan bacterias enriquecidas en determinantes de resistencia, al ser liberadas y mezclarse en los ambientes naturales con las bacterias nativas propician su diseminación fuera de los hospitales.

La clasificación incorrecta de especies se debe, en parte, al sesgo derivado del uso de equipos automatizados que carecen de la resolución adecuada para diferenciarlas, a que los estudios suelen basarse en una sola cepa, al uso de marcadores no adecuados o el uso de uno o pocos marcadores, así como la utilización de metodología de análisis de secuencias multilocus (MLSA, por sus siglas en inglés) no adecuada.

El problema que encaramos en este trabajo, por lo tanto, tiene dos vertientes: En primer lugar, el impacto que tiene la liberación de bacterias, antibióticos y genes de resistencia en el ambiente, principalmente a través de las aguas residuales, que contribuye al intercambio genético y la selección de cepas multirresistentes. En segundo lugar, el impacto de la incorrecta delimitación de las especies bacterianas, que impide establecer las asociaciones pertinentes entre fenotipos y especies bacterianas para poder encontrar aquellas que verdaderamente sean resistentes o sensibles y ubicarlas en un hábitat determinado. Delimitaciones robustas, fidedignas de las especies y un conocimiento profundo de sus fenotipos es clave para su uso potencial en agricultura, y biotecnología, en particular de aquellas cepas que suponen la liberación al ambiente.

Con base en lo anterior, el punto de partida de nuestra investigación fueron estas preguntas:

1. ¿Existen diferencias entre los resistomas de las proteobacterias de un mismo género o especie asociadas a ríos limpios y de aquellas provenientes de ríos contaminados?

2. ¿El número de resistencias y de elementos genéticos móviles de las poblaciones de bacterias recuperadas de ríos contaminados es mayor al de aquellas que provienen de ríos limpios?
3. ¿Existe una relación entre el flujo de genes de resistencia a antibióticos entre especies y la calidad ambiental de su hábitat?

4. Hipótesis

La liberación al ambiente de aguas residuales con cepas bacterianas altamente enriquecidas en determinantes de resistencia propiciará la transferencia de los mismos a las bacterias nativas de los hábitats naturales y moldeando sus resistomas en tres niveles: comunidad, especie e individuo.

4.1 Predicciones de la hipótesis

1. Las comunidades bacterianas con mayor cantidad de resistencias a los antibióticos se recuperarán de sitios con alto grado de contaminación.
2. Se encontrará una mayor cantidad de elementos genéticos móviles en las comunidades provenientes de sitios con alto grado de contaminación.
3. A nivel de especie, habrá cepas con mayor cantidad de resistencias a antibióticos en lugares contaminados.

5. Objetivo general

Caracterizar fenotípicamente el resistoma de cepas de proteobacterias recuperadas de ríos de Morelos con grado contrastante de contaminación antropogénica y delimitar especies mediante métodos filogenéticos avanzados para determinar asociaciones con sus perfiles de resistencia a múltiples antibióticos.

5.1 Objetivos particulares

1. Hacer prospecciones de campo para localizar sitios adecuados de muestreo (limpios y contaminados)
2. Generar colecciones amplias de proteobacterias provenientes de cuerpos de agua con grado contrastante de contaminación y determinar su fenotipo de resistencia
3. Clasificar las bacterias recuperadas a nivel de género mediante secuenciación de 16S ribosomales

4. Con base en los primeros objetivos, seleccionar dos géneros con amplia distribución ambiental y relevancia clínica para estudios detallados
5. Caracterizar la diversidad y la estructura genética de las poblaciones mediante análisis multilocus de secuencias
6. Delimitar las especies bacterianas de interés mediante métodos filogenéticos y de genética de poblaciones
7. Asociar los perfiles de resistencia antimicrobiana con las especies de interés mediante análisis estadístico multivariado
8. Caracterizar los elementos genéticos móviles de las especies de interés
9. Secuenciar los genomas completos de algunas cepas selectas de interés
10. Evaluar críticamente el status de la clasificación de la sistemática y taxonomía de los géneros focales de este trabajo

6. Diseño experimental

Para cumplir con los objetivos del estudio se propuso el siguiente diseño general:

1. Elección de los sitios de muestreo con el fin de identificar sitios con un grado de contaminación contrastante y acceso adecuado para la toma de muestras (Figura 1A y 1B).
2. Muestreo de comunidades bacterianas en dos sitios de tres ríos con grado contrastante de contaminación antropogénica, tanto en columna de agua como de sedimentos (Figura 1A y 1B).
3. Identificación empírica de medios de cultivo adecuados para recuperar las proteobacterias de interés para el estudio.
4. Generación de la colección de poblaciones bacterianas y determinación del género bacteriano mediante la amplificación del gen 16s.
5. Determinación de los perfiles de resistencia antimicrobiana correspondientes a 15 antibióticos de 5 familias y evaluación de metalo- β -lactamasas (**MBL**) y β -lactamasas (**BLEE**) mediante sinergismo de doble disco.
6. Selección de dos géneros de interés debido a su presencia cosmopolita (sitio y hábitat), su perfil de multirresistencia y su relevancia clínica (***Stenotrophomonas*** y ***Acinetobacter***).
7. Generación de datos multilocus de secuencia.
8. Análisis filogenético y de genética de poblaciones de los datos obtenidos mediante MLSA.
9. Validación y refinamiento de la delimitación de las especies bacterianas de cada población mediante aproximaciones filogenómicas.
10. Evaluación estadística de asociaciones entre fenotipos de resistencias y los linajes.
11. Análisis de las propiedades fenotípicas y ecológicas de los linajes identificados en las dos poblaciones.

Capítulo 1. Prospección de la diversidad y de los perfiles de resistencia de las proteobacterias ambientales

Con el fin de poder responder nuestras preguntas de investigación y de lograr que nuestro estudio tuviera una representatividad estadística sólida, que sustente nuestros resultados, llevamos a cabo tres muestreos durante la misma estación en tres años diferentes en dos tipos de sitios (contaminados y limpios) y seis puntos de muestreo (Tabla 1).

El primer paso del estudio consistió en la toma de muestras de columna de agua y sedimentos de los ríos contaminados y limpios de Morelos **Figura 1A, 1B y 1C**. Los sitios de muestreo se clasificaron en tres niveles de contaminación, de acuerdo al conteo de coliformes fecales termotolerantes y de *E. coli*: **contaminación baja** (Sauces y Estacas), **contaminación intermedia** (Yautepec) y **contaminación alta** (Temixco y Zacatepec) (Tabla 1).

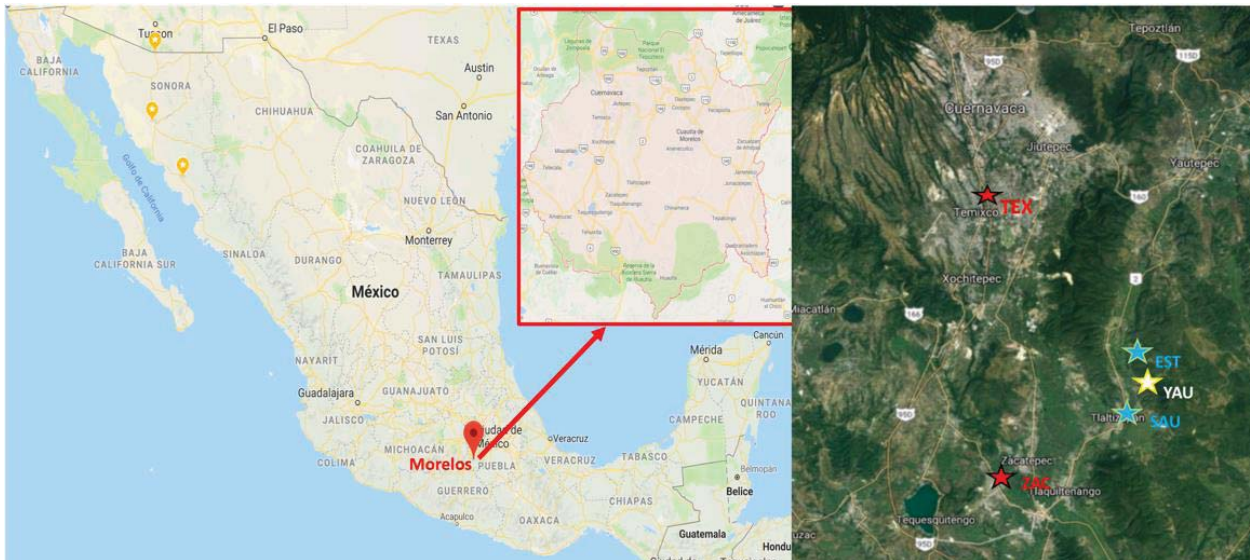


Figura 1A. Sitios de muestreo del estudio

Ubicación del estado de Morelos donde se recolectaron las muestras de columna de agua y de sedimento.

Figura 1B. Localización de los cinco puntos de muestreo

Estacas (EST), Sauces (SAU), Yautepec (YAU), Zacatepec (ZAC) y Temixco (TEX). Rojo = contaminación alta. Blanco = contaminación intermedia. Azul = contaminación baja.



Figura 1C. Aspecto de los cinco puntos de muestreo

Tabla 1. Clasificación de los sitios de muestreo basada en los niveles de conteo de coliformes fecales termotolerantes (TTFCs) y *E. coli* termotolerante (TTEc) unidades formadoras de colonia (cfu/100ml), medidas en la columna de agua

River	Site name	Code	Coordinates ^a	TTFCs ^b	TTEc ^c	Pol.level ^d
Apatlaco	Temixco	TEX	18°51'14.4"N 99°13'20.4"W	5.66e5	3.6e5	H
Apatlaco	Zacatepec	ZAC	18°38'23.4"N 99°11'44.5"W	5.34e5	3.2e5	H
Sauces	Los Sauces (river)	SAU	18°41'50.0"N 99°07'45.7"W	240	97	L
Sauces	Los Sauces (flooded soil)	SAUr	18°41'50.0"N 99°07'45.7"W	966	166	L
Estacas	Las Estacas	EST	18°43'57.5"N 99°06'48.3"W	83	17	L
Yautepec	Bonifacio García	YAU	18°43'24.0"N 99°06'53.3"W	1.96e3	833	I

Puesto que nuestro interés en este trabajo era hacer asociaciones de fenotipo con genotipo, fue indispensable contar con bacterias cultivables. Para ello utilizamos diferentes medios de cultivo, con y sin antibióticos.

Para identificar medios adecuados de cultivo, se evaluaron dos tipos de medios: oligotróficos, o mínimos con respecto a la concentración de nutrientes, y ricos en nutrientes. Los dos medios oligotróficos que elegimos fueron los siguientes: R2A (Ultee et al. 2004) y NAA (Aagot et al. 2001). Los medios ricos que usamos incluyeron medios específicos, entre los que se cuentan los medios tradicionales para el conteo de coliformes fecales: mFC (Oxoid) y m-TEC (USEPA, 2002); el medio selectivo para recuperar *Acinetobacter* (Leeds modificado), el medio para microorganismos Gram negativos y entéricos (MacConkey) y el medio PCA. Los medios se suplementaron con antibióticos. Recetas de medios de cultivo implementados en este estudio y las combinaciones con antibióticos se pueden ver en el **Anexo 13**. Los géneros que se recuperaron con mayor eficiencia en los diferentes medios son: *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Aeromonas*, *Ochrobactrum* y *Acinetobacter*. Cabe destacar que el género *Ensifer* se recuperó con mayor eficiencia en medios suplementados con ceftazidima (**Figura 2**).

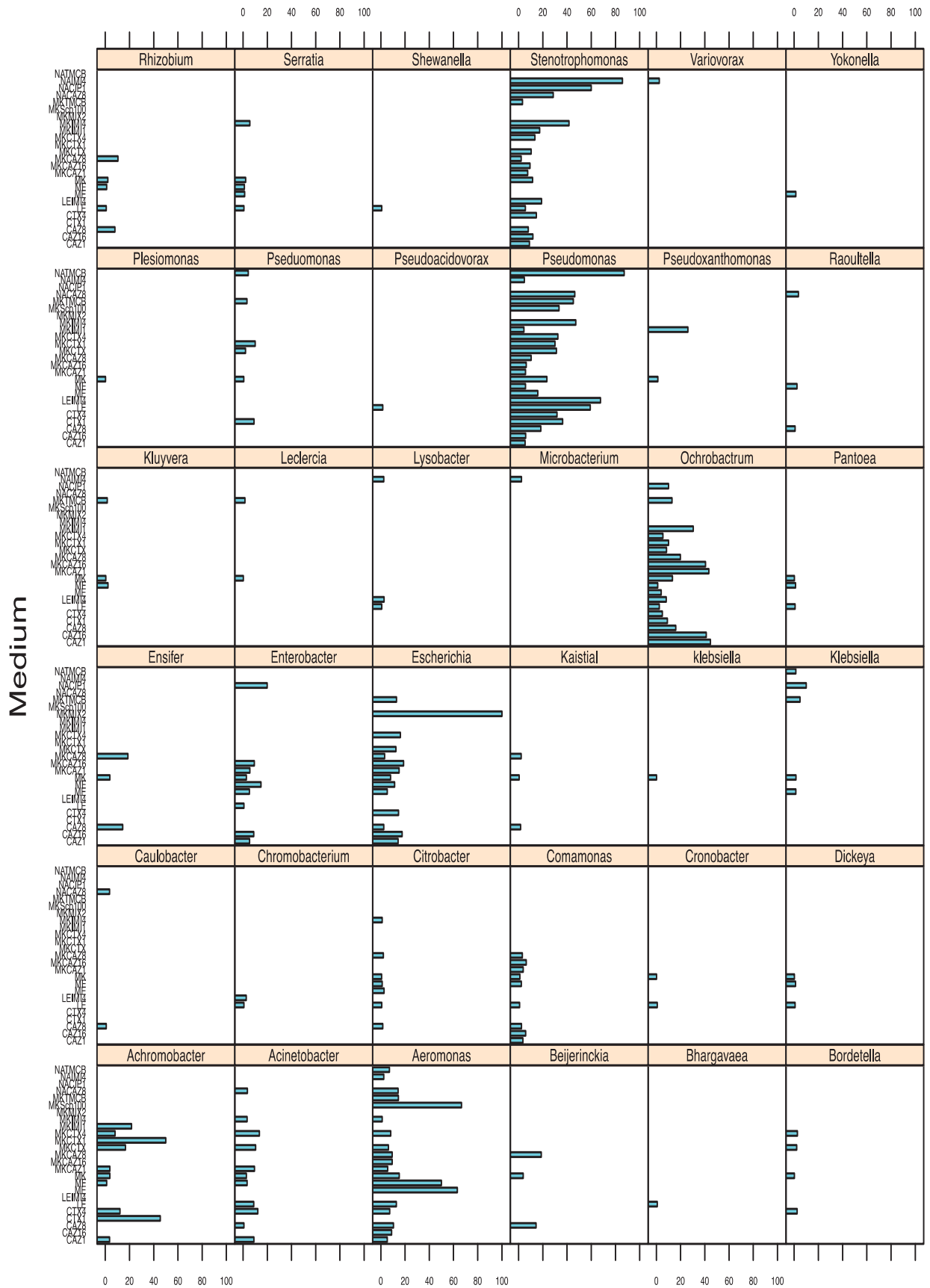


Figura 2. Porcentaje de eficiencia de los medios utilizados en este estudio para recuperar diferentes géneros
Medios de cultivo: NA= NAA, MK=MacConkey, LE= Leed. Antibióticos: TMCB= trimetoprim + carbenicilina, IMI=imipenem, CIP= ciprofloxacino, CAZ=ceftazidima, CTX=cefotaxima.

Así, recuperamos una amplia colección de aislamientos (n = 800), que se clasificaron a nivel de género mediante análisis filogenético de secuencias parciales de 16S rRNA, usando como secuencias de referencia las cepas tipo de la base de datos RDP-II. Los géneros más abundantes fueron los siguientes: *Pseudomonas* (n = 239, 34.3%) y *Stenotrophomonas* (n = 154, 22.1%), seguidos por *Aeromonas* (n = 135, 19.4%), *Ochrobactrum* (n = 74, 10.6%) y *Acinetobacter* (n = 39, 5.6%) (Figura 3).

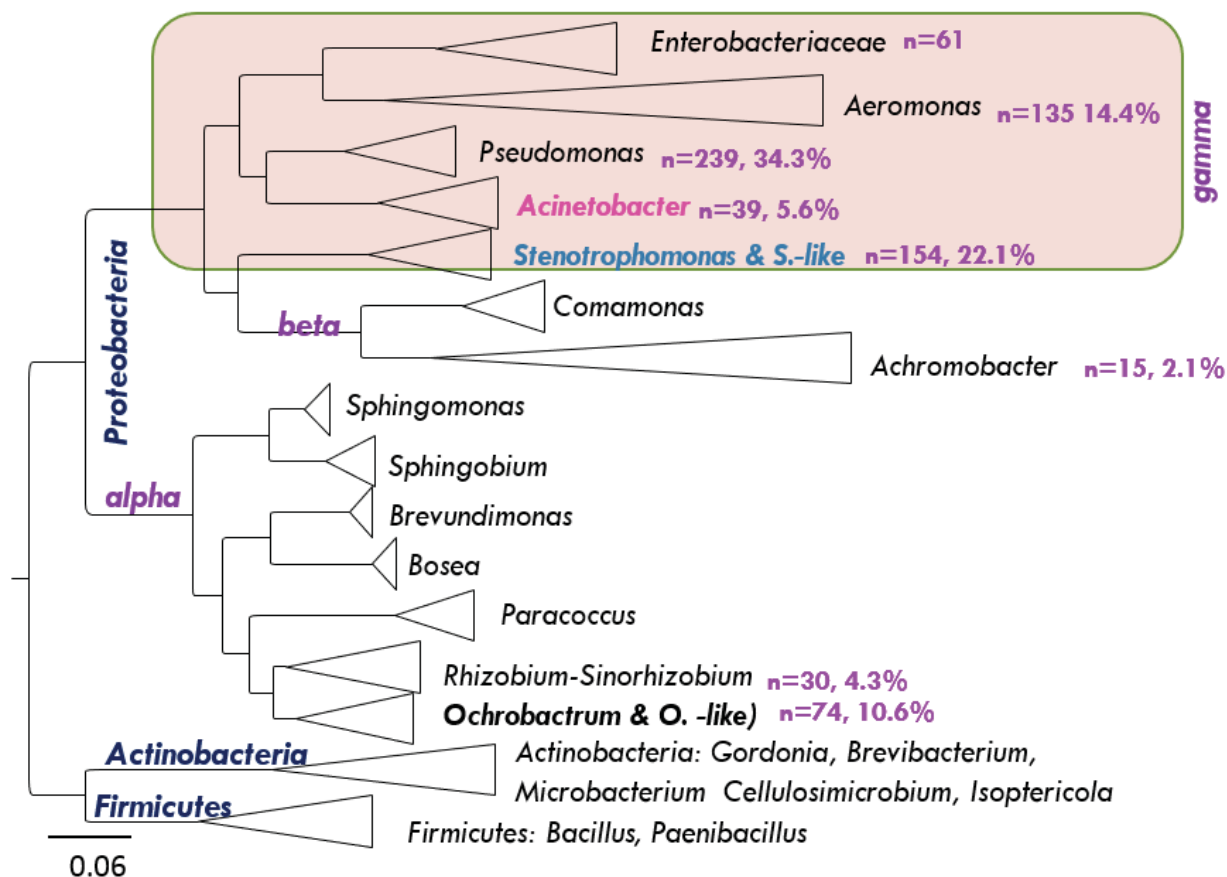


Figura 3. Desglose taxonómico a nivel de género de 800 secuencias de 16S RNA

Filogenia de máxima verosimilitud (GTR + G) para clasificar a nivel de género las 800 secuencias de 16S rRNA generadas en este trabajo a partir de aislados ambientales de ríos de Morelos.

Mediante el análisis estadístico, pudimos observar la eficiencia relativa de los diferentes medios microbiológicos probados y de los antibióticos con los que se suplementaron para recuperar diferentes géneros de proteobacterias. Encontramos que *Stenotrophomonas* ambientales pueden recuperarse eficientemente en el medio oligotrófico NAA suplementado con imipenem (8µg/ml; > 90% eficiencia) y en el medio rico McConkey suplementado con imipenem (4µg/ml). Cuando se seleccionaron las colonias no fermentadoras (blancas), el segundo medio de cultivo tuvo un éxito del 60% para *Stenotrophomonas* para las cuales, hasta el momento, no se había identificado un medio específico de aislamiento. En este trabajo

logramos, por primera vez, recuperar con eficiencia una cantidad considerable (n = 154) de aislamientos de *Stenotrophomonas* ambientales.

Para cerciorarnos de que verdaderamente estábamos recuperando bacterias multirresistentes, los microorganismos se picaron en cajas suplementadas con doce antibióticos diferentes, correspondientes a cinco familias (fenoles, betalactámicos, aminoglucósidos, fluoroquinolonas y tetraciclinas) y 3 combinaciones de antibióticos: Mix1 (tetraciclina 16ug, gentamicina 6µg, trimetoprim 30 µg, ceftazidima 1µg, ciprofloxacino 4µg), Mix2 (gentamicina 6µg y ácido nalidíxico) y TmCb (trimetoprim + carbenicilina 30/100 µg). Mediante un análisis de *clustering* jerárquico de los perfiles de resistencia, pudimos observar diferencias en dos niveles: Primero, con respecto al hábitat, advertimos que las bacterias provenientes de los sedimentos (nativas) se agrupaban debido a que tenían la mayor cantidad de resistencias, mientras que aquellas provenientes de columna de agua (transitorias) se agrupaban debido a que tenían la menor cantidad de resistencias. Segundo, con respecto al género bacteriano, notamos que las bacterias multirresistentes de los sedimentos correspondían a los géneros *Stenotrophomonas*, *Ochrobactrum*, y *Acinetobacter*, mientras que las bacterias acuáticas con menor cantidad de resistencias correspondían al género *Pseudomonas* y a los géneros clasificados como Enterobacterias (ver **Figura 4**).

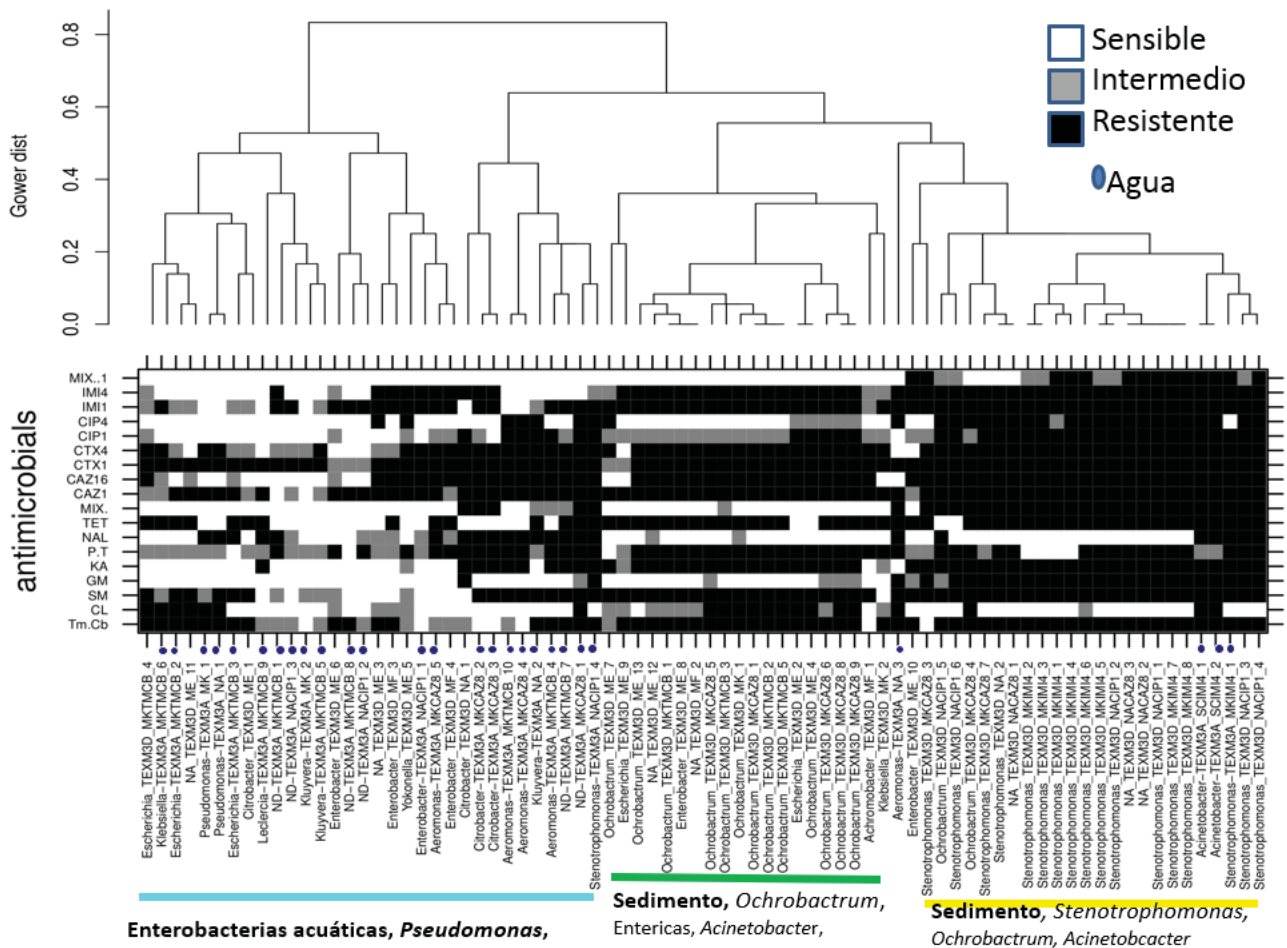


Figura 4. Análisis de clustering jerárquico de perfiles de resistencia a antibióticos correspondientes a los aislamientos de agua y sedimentos el río Apatlaco (Temixco; muestreo realizado en mayo de 2013)

Grupo I. Enterobacterias acuáticas *Pseudomonas*; poco resistentes. Grupo II. Bacterias entéricas, *Ochrobactrum* y *Acinetobacter*: resistentes y multiresistentes. Grupo III. *Stenotrophomonas*, *Ochrobactrum* y *Acinetobacter*: **multiresistentes** y **panresistentes**. Antibióticos: MIX 1. Combinación de cinco antibióticos, (tetraciclina 16µg, gentamicina 6µg, trimetoprim 30 µg, ceftazidima 1µg, ciprofloxacino 4µg), IMI4: imipenem 4µg, IMI1: imipenem 1µg, CIP4: ciprofloxacino 4µg, CIP1: ciprofloxacino 1µg, CTX4: cefotaxima 4µg, CTX1: cefotaxima 1µg, CAZ16: ceftazidima 16 µg, CAZ1: ceftazidima 1µg, MIX2: gentamicina 6µg y ácido nalidíxico 30 TET: tetraciclina 16 µg, NAL: Ácido nalidíxico 30µg, P.T. Piperacilina+ tazobactam 128/4µg, KA: kanamicina 16µg, GM: gentamicina 16µg, SM: estreptomycin 30µg, CL: cloranfenicol 16µg, Tm.Cb: trimetoprim + carbenicilina 30/100 µg. Los círculos azules corresponden a las bacterias que se recuperaron de columna de agua (predominantes en el Grupo I).

Con base en la información obtenida y tomando en cuenta nuestro interés por los microorganismos de amplia distribución ambiental, multiresistentes y de interés clínico, elegimos los géneros *Stenotrophomonas* y *Acinetobacter* para estudiarlos en detalle (capítulos 2 y 3, respectivamente). En conclusión, el diseño experimental que propusimos nos permitió generar colecciones con una amplia diversidad de géneros de proteobacterias. Esta diversidad nos permitió hacer asociaciones entre los géneros y su perfil de resistencia. Además, como suele suceder en la mayoría de las exploraciones ambientales (Vásquez-Ponce et al. 2018; Schmidt et al. 2018; Arocha-Garza et al. 2017), descubrimos nuevos linajes bacterianos, a los cuales nos referiremos más adelante

Capítulo 2. *Stenotrophomonas*

Este es el capítulo principal de la tesis y corresponde a la publicación de Ochoa-Sánchez LE & Vinuesa P., 2017. Además, se incluye información adicional: los resultados de un análisis de filogenia genómica (Vinuesa et al., 2018), la caracterización de elementos genéticos móviles, y la identificación automatizada de especies del género.

2.1 Antecedentes: Microbiología, epidemiología y taxonomía del género

Uno de los géneros bacterianos emergentes más multifacéticos son las *Stenotrophomonas* (de *stenus* = limitado, *trophus* = nutrición, *monas* = unidad). En un principio, se consideró que pertenecían al género *Pseudomonas* (Stanier R. et al., 1966). Luego fueron clasificadas como *Xanthomonas* y posteriormente con base en análisis filogenéticos de secuencias 16S rRNA, se reveló que tenían características diferentes y constituían un género hermano de *Xanthomonas*.

Tabla 2. Taxonomía del género *Stenotrophomonas*

Dominio	<i>Bacteria</i> (Woese, Kandler, and Wheelis 1990)
Filo	Proteobacteria (Garrity and Lilburn 2005)
Clase	Gammaproteobacteria (Garrity and Lilburn 2005)
Orden	Xanthomonas (Saddler & Bradbury 2005)
Familia	Xanthomonadaceae (Saddler & Bradbury 2005)
Género	<i>Stenotrophomonas</i> (Palleroni and Bradbury 1993)
Especie principal	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (Palleroni and Bradbury 1993)

En la actualidad se han descrito 16 especies (<http://www.bacterio.net/stenotrophomonas.html>) válidas del género *Stenotrophomonas*. Se han aislado 11 especies diferentes a partir de diversas fuentes ambientales y una, de muestras clínicas humanas (**Anexo 6**).

Las bacterias del género *Stenotrophomonas* se han detectado en un amplio rango de ecosistemas. Tienen una capacidad de degradación importante, así como potencial para aplicaciones biotecnológicas (biorremediación, promoción de crecimiento, biocontrol y actividad antimicrobiana) (Ryan et al. 2009; Berg and Martinez 2015). Se caracterizan por ser bacilos Gram negativo, aerobios, no esporuladores, de entre 0.5 y 1.5 μm , mótils (con varios flagelos polares), capaces de producir fimbrias y de persistir en ambientes acuosos pobres en nutrientes (Brooke, 2012, 2017) (Hugh and Leifson 1963). Las colonias son lisas, brillantes, con márgenes enteros, y de color blanco, gris, o amarillo pálido. Su espectro nutricional es limitado: De 145 compuestos orgánicos probados como fuentes de carbono y energía, solo 23 fueron utilizados por bacterias del género para su crecimiento (Stanier R. et al., 1966).

Estudios fenotípicos y genotípicos, además de análisis de diversidad ecológica y metabólica, han mostrado que existe una diferenciación a nivel de especie (Denton and Kerr 1998a). Si bien *Stenotrophomonas spp.* son microorganismos ubicuos en el ambiente, *S. maltophilia* es el miembro dominante de esta comunidad microbiana y sobre el cual se han realizado diversos estudios. Con respecto a la taxonomía del género, se han utilizado diferentes metodologías y análisis (ver **Anexo 7**), a través de los cuales no se ha logrado una delimitación de especies satisfactoria. Ello se refleja en el hecho de que *Stenotrophomonas maltophilia* se considere como un complejo de especies con características fenotípicas (resistencia a los antibióticos) muy variables (Deredjian et al. 2016).

Los estudios genómicos del género se han basado principalmente en cepas con fenotipo de multirresistencia a antibióticos, como *S. maltophilia K279* aislada a partir de una muestra de sangre de un paciente con cáncer. Esta multirresistencia se explica por la presencia de dos factores principales: 1) los genes de resistencia a diferentes familias de antibióticos (aminoglucósidos, espectinomicina, cloranfenicol y β -lactámicos) y 2) las bombas de eflujo,* de las cuales la familia RND solo se encuentra en bacterias Gram-negativas. En *S. maltophilia* destaca la bomba tripartita SmeDEF (Sánchez, Morelo et al., 2005). Otras cepas importantes para los estudios genómicos han sido *S. maltophilia R551-3*, aislada a partir del álamo *Populus trichocarpa*, y *S. rhizophila DSM14405*, aislada de la rizosfera del nabo en Alemania (Wolf et al. 2002) (**Anexo 8**).

La especie de mayor relevancia clínica es *Stenotrophomonas maltophilia*. Ello se debe a que es un patógeno oportunista emergente y resistente a múltiples antibióticos. Es la única especie del género reportada como causa de infecciones en humanos. Se caracteriza por ser un microorganismo cosmopolita y se ha recuperado de ambientes clínicos y no clínicos, como agua, suelo y plantas (Brooke 2012).

Las infecciones más comunes asociadas con *S. maltophilia* incluyen: neumonía en personas con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Nseir, Di Pompeo et al. 2006); sepsis biliar (Papadakis et al. 1995); infecciones de huesos, del tracto urinario, de los tejidos suaves (Papadakis et al. 1995) (Sakhnini, Weissmann et al. 2002; Landrum, Conger et al. 2005; Bin Abdulhak, Zimmerman et al. 2009), de los ojos (Lin, Ma et al.; Mauger, Kuennen et al.);

* De acuerdo a su composición, al número de regiones transmembrana y a las fuentes de energía y sustratos, las bombas de eflujo se clasifican en cinco familias: MFS (*major facilitator superfamily*), ABC (*adenosine-trifosphate-binding cassette superfamily*), SMR (*small multidru-resistance*), MATE (*multidrug and toxic compound extrusion*), y RND (*resistance nodulation cell division*) (Piddock 2006; Pole 2007).

endocarditis (Katayama, Tsuruya et al. ; Gutierrez Rodero, Masia et al. 1996; Aydin, Koksai et al. 2000), y meningitis (Nguyen and Muder 1994; Rojas, Garcia et al. 2009, Book et al., 2017).

El factor principal que determina que *S. maltophilia* sea patógena es su notable habilidad para producir un amplio rango de enzimas extracelulares, tales como lipasas, fibrolisinas y proteasas, potencialmente involucradas en los procesos de colonización (Denton and Kerr 1998b). *S. maltophilia* es un patógeno de baja virulencia. Ha emergido en ambientes nosocomiales, asociado con tasas de mortalidad bruta de entre 14% y 69% en pacientes con bacteremia, debido principalmente a su multirresistencia a los antibióticos.

S. maltophilia codifica intrínsecamente dos β -lactamasas: L1, β -lactamasa clase B (metalo- β -lactamasa) (T. R. Walsh, MacGowan, and Bennett 1997) y L2, una β -lactamasa clase A (cefalosporinasa sensible a ácido clavulánico) (T. R. Walsh, MacGowan, and Bennett 1997). La metalo- β -lactamasa L1 producida por *S. maltophilia* hidroliza predominantemente las penicilinas y los carbapenémicos (T. R. Walsh, MacGowan, and Bennett 1997). Esta enzima es resistente a los inhibidores comerciales de β -lactamasas y susceptible a la inhibición ocasionada por agentes quelantes. Un estudio de 17 aislamientos clínicos y nueve aislamientos ambientales de *S. maltophilia* ha sugerido que la exposición a antibióticos carbapenémicos es un factor de selección para la sobreexpresión de L1 (Denton and Kerr 1998b). También se ha propuesto que *S. maltophilia* tiene la habilidad de mantener la producción de β -lactamasa incluso en ambientes con cambio de pH, lo cual se correlaciona con los diversos lugares de donde se ha aislado. La cefalosporinasa L2 producida por *S. maltophilia* hidroliza predominantemente cefalosporinas y aztreonam (T. R. Walsh, MacGowan, and Bennett 1997) y su sitio activo es una serina. L2 puede ser inhibida por ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam.

Afortunadamente los genes que codifican L1 y L2 no son fácilmente transferibles (T. R. Walsh, MacGowan, and Bennett 1997). Sin embargo, se ha identificado que los elementos que movilizan el resistoma de *Stenotrophomonas* son los elementos integrativos conjugativos (**ICE**, por sus siglas en inglés), los **integrones**. Estos juegan un papel importante debido a que se desplazan entre el ambiente hospitalario y el extrahospitalario, diseminando los genes de resistencia.

Los **ICE** son conocidos como portadores de genes de resistencia a antibióticos. El primer ICE que se describió fue Tn916, que confiere resistencia a tetraciclina (Franke and Clewell 1981) y tiene un rango amplio de hospedero.

Los **integrones** se definen como plataformas de ensamble, o sea, elementos de DNA que pueden adquirir marcos de lectura abiertos, insertar casetes de genes exógenos y convertirlos en genes funcionales asegurando su correcta expresión (Cambray, Guerout, and Mazel 2010). En este género, solo se han detectado integrones en *S. maltophilia*. En un estudio, su prevalencia fue del 60% en aislamientos hospitalarios (en los que se observó que las cepas que los contenían eran significativamente más resistentes a antibióticos) y ninguno estaba contenido en plásmidos (Liaw, Lee, and Hsueh 2010). En cambio, en otro estudio su prevalencia fue del 22% y fue interesante observar que dos aislamientos contenían integrones vacíos y, además, un integrón estaba contenido en un plásmido (Chang et al. 2004). En contraste con ambos, en Argentina se han reportado integrones en *S. maltophilia* con una prevalencia del 1% (Barbolla R, Catalano M, Orman BE, Famiglietti A, Vay C, Smayevsky J 2004).

Aunque hay autores que proponen que, dado que los integrones tienen una prevalencia baja en el género *Stenotrophomonas*, son los plásmidos y los ICE los que juegan un papel importante en la transferencia horizontal (Thomas and Nielsen 2005). Sin embargo, es importante enfatizar que son muy pocos los estudios que identifican plásmidos en el género y ningún genoma completo de las bases de datos muestran plásmidos.

2.2 Objetivos

- I. Delimitar especies en la colección de aislamientos ambientales de *Stenotrophomonas* mediante el uso de métodos filogenéticos y de genética de poblaciones usando datos multilocus
- II. Realizar una filogenia genómica a partir de cepas selectas de *Stenotrophomonas* ambientales
- III. Analizar si los linajes muestran propiedades fenotípicas y ecológicas distintivas
- IV. Analizar cepas de *Stenotrophomonas* pertenecientes a la colección del estudio, secuenciadas mediante métodos comerciales de identificación

2.3 Resultados

Los resultados presentados en esta sección corresponden, en su mayoría, a los publicados por Ochoa-Sánchez LE & Vinuesa P. 2017 en *Frontiers in Microbiology*. Esta sección solo es un resumen de los datos publicados. En el artículo se exponen los detalles metodológicos (**Ver Anexo 1**).

2.3.1 Delimitación de especies de la colección de aislamientos ambientales de *Stenotrophomonas*

2.3.1.1 Estructura filogenética del género *Stenotrophomonas*: Identificación de ocho especies, entre las cuales destaca *S. maltophilia*, y definición de hipótesis de bordes de especies

Se utilizó un método de máxima verosimilitud (ML) para buscar los árboles filogenéticos y obtener la hipótesis global de la estructura filogenética del género con base en 194 multilocus STs no redundantes (**Figura 5**). En el presente trabajo se generaron las secuencias para los siete *loci* del esquema de MLST para *S. maltophilia* disponible en pubmlst.org de los 108 aislamientos de *Stenotrophomonas* ambientales, que comprenden 63 haplotipos. La mejor hipótesis, resultante de 1,001 búsquedas de árboles independientes, se presenta en la **Figura 5A**. Encontramos una cepa relacionada con *Stenotrophomonas humi*, tres de *Stenotrophomonas acidaminiphila* (se cuenta con la secuencia del genoma completo de una de ellas: ZAC14D2_NAIMI4_2 (Vinuesa and Ochoa-Sánchez 2015) y siete cepas cercanas a *Stenotrophomonas terrae*. El clado Smc (complejo de *S. maltophilia*) aparece en forma colapsada. El árbol se enraizó usando *Xanthomonas* como grupo externo.

En la **Figura 5B**, aparece el complejo *Stenotrophomonas maltophilia* (Smc) con sus grupos filogenéticos delimitados. La mayor parte de nuestros aislamientos se agrupan en este complejo, que comprende a *S. maltophilia sensu lato* (Smsl) y a otros cuatro clados que denominamos (Smc1, Smc2, Smc3, Smc4). Nuestros análisis sugieren fuertemente que estos últimos cuatro corresponden a especies crípticas pertenecientes a este complejo.

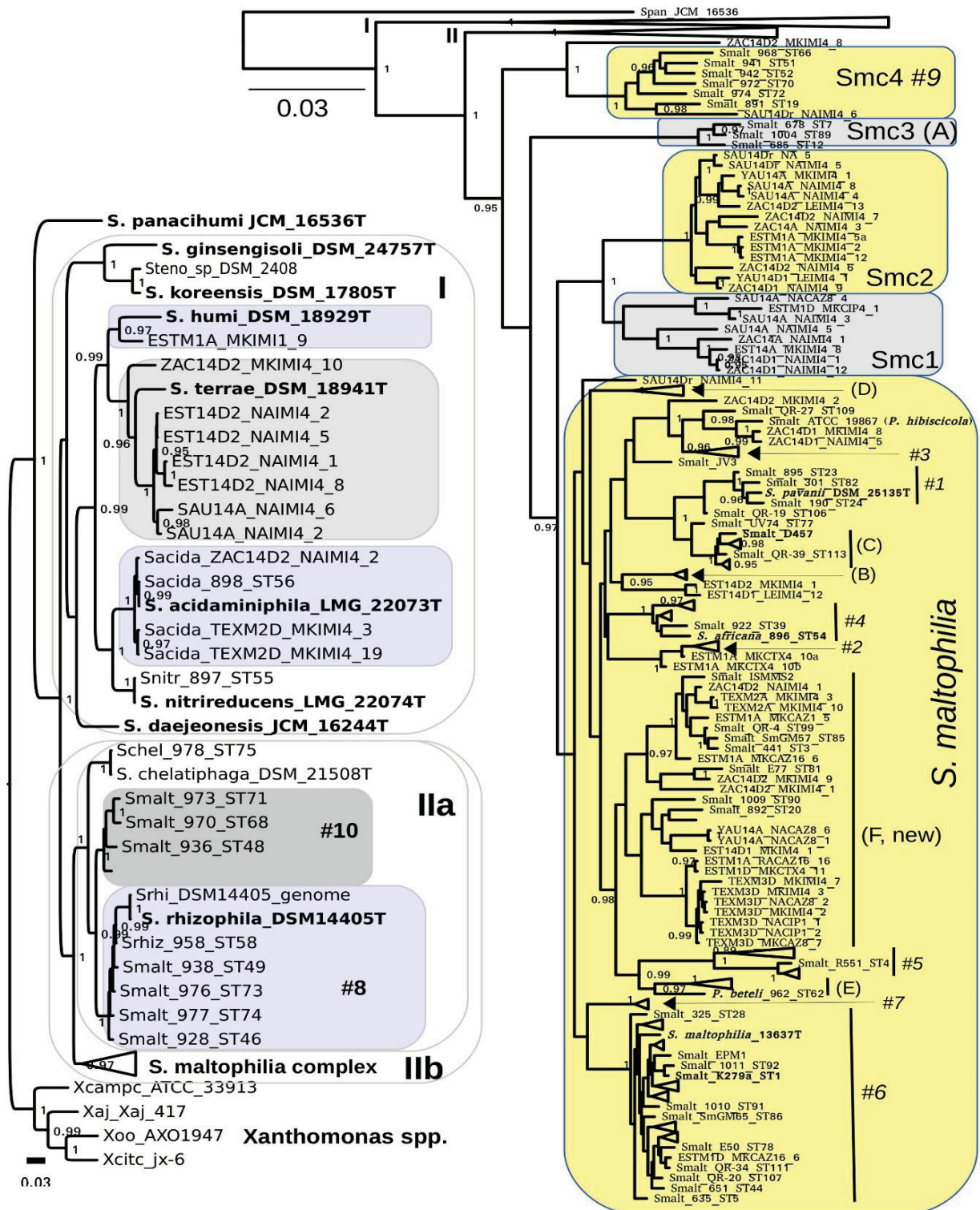


Figura 5. Filogenia de máxima verosimilitud (ML) de las secuencias de multilocus de las especies del género *Stenotrophomonas*

Según modelo GTR+G y usando el alineamiento concatenado (7 loci) de 194 ST no redundantes. Los clados están etiquetados utilizando los códigos de la A a la E de Kaiser et al., 2009 y del #1 al #10 de Hauben et al., 1999, para una referencia cruzada fácil. **A.** Árbol de las especies no *maltophilia*. El clado I incluye nuestras cepas, correspondientes a la especie *S. humi*, al complejo *S. terrae*, y a la especie *S. acidaminiphila*. El clado incluye dos especies muy significativas del género (*S. chelatiphaga* y *S. rhizophila*). El clado IIb corresponde al complejo *S. maltophilia* (Smc) y aparece colapsado. Las cepas tipo aparecen en negritas. El genotipo #10 representa una especie no descrita, que no debería fusionarse con el clado de *S. rhizophila* #8. **B.** Clado abierto del complejo *S. maltophilia* (Smc), que incluye *S. maltophilia* sensu lato (Smsl), Smc1, Smc2, Smc3, Smc4. Las áreas sombreadas indican la asignación de especie según la hipótesis de nuestro trabajo, bajo el modelo coalescente multiespecies, utilizando el factor de Bayes y un análisis de genética de poblaciones.

2.3.1.2 Delimitación de especies en el complejo *S. maltophilia* (*S. maltophilia* sensu stricto y cuatro nuevas especies) mediante la delimitación bayesiana basada en el coalescente multiespecies y análisis de factores de Bayes

La evidencia de este análisis filogenético se usó para definir diversas hipótesis de límites de especies, las cuales se evaluaron formalmente en un marco bayesiano, bajo el modelo de coalescencia multiespecies (MSC) (Ranala y Yang, 2003, Edwards et al., 2007; Degnan y Rosenberg, 2009). Además, las hipótesis a análisis de factor de Bayes (BF) (Kass y Raftery, 1995).

Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que evalúa la utilidad de este marco estadístico bayesiano para la delimitación de especies bacterianas. Este método se está perfilando como una estrategia exitosa y prometedora para la delimitación de especies en plantas y animales (Fujita et al., 2012; Aydin et al., 2014; Grummer et al., 2014).

El modelo MSC es independiente de la concatenación de genes y reconoce el hecho de que los árboles de genes tienen historias evolutivas separadas pero integradas dentro de un árbol de especies compartido (Degnan y Rosenberg, 2006; Rosenberg, 2013). El modelo básico de MSC asume que la discordancia de los árboles genéticos es únicamente el resultado de la coalescencia estocástica de los linajes genéticos dentro de la filogenia de una especie. Las poblaciones, más que los alelos individuales, constituyen las unidades para inferir la filogenia en el marco del MSC. Este modelo conecta eficazmente la inferencia filogenética tradicional con la genética de poblaciones, y proporciona estimaciones de topología, tiempos de divergencia y tamaños de población (Rannala y Yang, 2003; Edwards et al., 2007; Heled and Drummond, 2010).

El análisis del factor de Bayes respalda fuertemente la hipótesis de delimitación de especies presentada en la Figura 5B. Utilizamos divisiones conservadoras dentro del complejo *S. maltophilia* (**Tabla 2**). Smc1 y Smc2 corresponden a *Stenotrophomonas* ambientales de México recuperadas solo en este estudio.

Tabla 3. Análisis de factor de Bayes para la hipótesis de delimitación de cinco especies dentro del complejo *S. maltophilia*, más los genogrupos #8 y #10, basados en las probabilidades marginales calculadas para cada hipótesis por nuestra vía de muestreo

Species model ^a	marginal lnL estimate	Model rank	ln-BF ^b (vs. best)	ln-BF ^c (vs. previous)
split1	-31347.16515	1 (best)	NA	NA
lump_Smal+Smc1	-31384.34206	2	4.308835**	4.308835** (2 vs. 1)
lump_Smal+Smc12	-31498.71633	3	5.714071***	5.432623*** (3 vs. 2)
lump_Smal+Smc123	-31521.18269	4	5.852303***	3.805166** (4 vs. 3)
lump_Smal+Smc1234	-31593.24923	5	6.19882***	4.970737** (5 vs. 4)

^a El mejor modelo (split1) supone que el genogrupo #10 es un clado hermano de *S. rhizophila* (Figura 5A) y divide el Smc en *S. maltophilia* (Smal) y cuatro clados de especies adicionales (Smc1-Smc4) de acuerdo a la Figura 5B. Los siguientes modelos agrupan consecutivamente el clado *S. maltophilia* con los clados Smc1-Smc4, con lump_Smal+Smc1234 que representa todo el complejo de *S. maltophilia* como una sola especie. El lnL marginal para el modelo lump_clades_ # 8 + # 10es -31465.00904, lo que resulta en un ln-BF = 5.462508 cuando se compara con el modelo Split 1 (mejor). ^b Los factores ln-Bayes están calculados en función de las estimaciones de verosimilitud marginal ln-BF = log(2(M0-M1)), donde M0 es el mejor modelo (modelo 1), que se compara con cada uno de los siguientes. * Indica soporte positivo [ln (BF) es n el rango de 1.1-3]; indica un soporte fuerte [ln (BF) es n el rango de 3-5]; *** indica apoyo fuerte [ln (BF) es n el rango de 5]. ^c Los factores de Bayes se calculan como se describió anteriormente, pero implican a M0 como el modelo anterior al modelo M1 de la lista de modelos clasificados. NA=no aplica.

2.3.1.3 Análisis de la estructura genética de las poblaciones ambientales del complejo *S. maltophilia*

Con un valor conservador de $K = 4$, nuestro análisis muestra evidencia de una subestructura que aparece entre *S. maltophilia sensu lato* y los clados Smc1, Smc2 y Smc4 (**Figura 6**). Los linajes Smc1, Smc2 y Smsl están genéticamente diferenciados entre sí (rango 9 - 45) y la divergencia de las poblaciones (Dxy) es superior al 4.5% (**Tabla 3**). El alto índice de fijación (rango 0.43 - 0.59) denota una diferenciación marcada entre las poblaciones. Esto es consistente con los números bajos de migrantes efectivos (rango 0.34 - 0.66) que se estimaron en la generación. Esto indica un flujo genético limitado entre estos linajes. Asimismo, los índices G y NI indican diferencias de fijación entre las especies, debidas a diferencias no-sinónimas. Esto sugiere que la selección positiva puede estar conduciendo a la divergencia de especies.

Tabla 4. Pruebas de neutralidad McDonald-Kreitman (MK), diferenciación genética y estimaciones de flujo genético entre aislamientos ambientales de los linajes Smc1, Smc2 y *S. maltophilia* recuperados de ríos Mexicanos basado en el conjunto de datos concatenado (3591 sitios)

Lineages	No. Fixed diffs.	Dxy	^a K _{ST}	F _{ST}	Nm	NI	G	^b p-value
Smc1-Smc2	45	0.04616	0.13791***	0.57819	0.36	0.328	6.709	0.00959**
Smc1-Smal	9	0.04542	0.06654***	0.43022	0.66	0.247	3.133	0.07672
Smc2-Smal	28	0.04924	0.09508***	0.59384	0.34	0.312	6.020	0.02515*

Dxy es la distancia genética interpoblacional. K*_{ST} es el índice de Hudson de diferenciación genética de la población. F_{ST} es el índice de fijación. Nm representa el número de migrantes por generación. NI es el índice de neutralidad y G es la razón de verosimilitud o prueba G de independencia. ^a El significado de la estadística estimada se calculó usando la prueba de permutación con 10000 iteraciones. Valores de bp para la prueba G. * Valor p<0.05; ** valor p<0.01; *** valor de p<0.001.

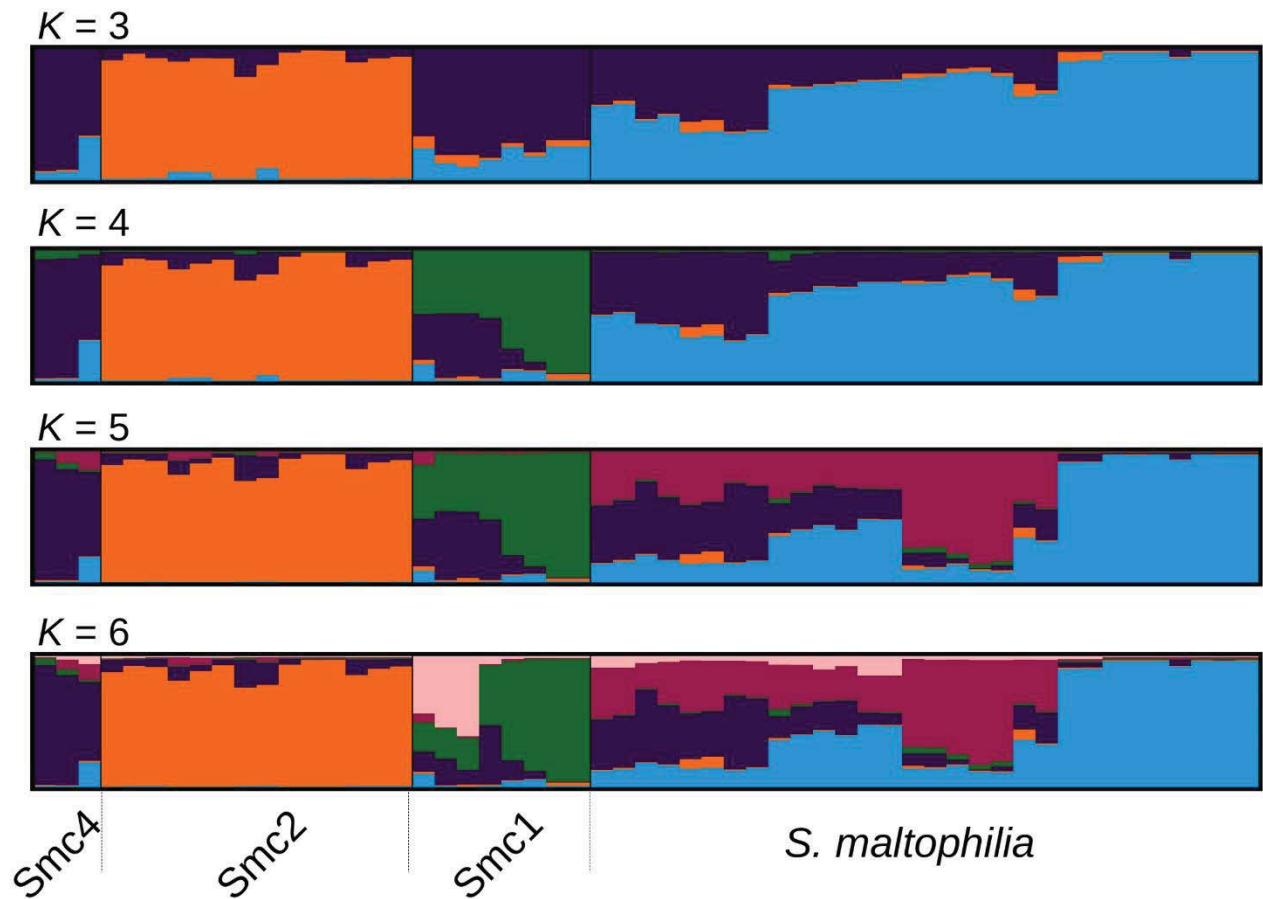


Figura 6. Análisis de la estructura poblacional de nuestras cepas, correspondientes al complejo *S. maltophilia* a Smc1, a Smc2 y a Smc4

Las barras se alinearon óptimamente mediante el programa STRUCTURE para los valores indicados de K. Se muestran las proporciones de ancestría de cada individuo.

2.3.1.4 Determinación de los polimorfismos de ADN y las tasas de recombinación en poblaciones ambientales Smc y Sterr

De acuerdo con el análisis estadístico descriptivo básico de polimorfismos de ADN, se evaluaron las hipótesis de neutralidad y el crecimiento poblacional para los linajes de las poblaciones mexicanas con 10 aislamientos o más (Smc1, Smc2, Smsl y Sterr). Los valores se determinaron en función de la diversidad nucleotídica promedio por sitio (π) de las cepas. Los linajes se clasificaron en el siguiente orden decreciente de π : Smsl > Smc1 > Sterr > Smc2 (Tabla 4).

Tabla 5. Estadística descriptiva de polimorfismos de DNA, pruebas de crecimientos de población y neutralidad para los aislamientos ambientales de Smc1, Smc2, *S. maltophilia* (Smal) y *S. terrae* (S. terr) linajes recuperados de ríos mexicanos con base en el conjunto de datos concatenados (3591 sitios)

Species	No. Seqs	S	Eta	π	h/Hd	Theta /site	Tajima's D	R ₂	p-value
Smc1	11	258	280	0.02502	9/0.945	0.02662	-0.29156 (NS)	0.1390	0.45
Smc2	15	173	185	0.01393	14/0.990	0.01584	-0.45427 (NS)	0.1199	0.19
Smal	51	500	560	0.02652	33/0.929	0.03470	-0.85761 (NS)	0.0903	0.17
Sterr	10	318	328	0.02388	7/0.067	0.04455	-1.30647 (NS)	0.1482	0.49

Para conocer el impacto de la recombinación vs. la mutación en la generación de polimorfismos, se estimó el valor R/theta. La relación entre el número medio de eventos de recombinación y los eventos de mutaciones fue mayor a 1, en Smc1. En cambio, para *S. terra* y Smc2 esta relación fue de casi 2 y de casi 3, respectivamente. Esto indica que los eventos de recombinación homóloga introducen significativamente más polimorfismos dentro de los genomas de *Stenotrophomonas* que mutaciones puntuales (**Tabla 5**).

Tabla 6. Estimaciones de recombinación para aislamientos ambientales de Smc1, Smc2, *S. maltophilia* (Smal) y *S. terrae* (Sterr)

Lineages	R/theta	1/delta	nu
Smc1	1.10774 (0.07076)	0.0006789 (3.213e-08)	0.0152529 (7.570e-07)
Smc2	1.89989 (0.12028)	0.0009080 (3.121e-08)	0.00864951 (3.081e-7)
Smal	2.95326 (0.10044)	0.0010379 (1.302e-08)	0.0129774 (1.648e-7)
Sterr	0.87233 (0.05113)	0.0021663 (3.443e-07)	0.0650391 (1.2279e-5)

Para cada linaje, se indica la media posterior y su varianza aparece entre paréntesis.

2.3.2 Filogenia genómica del género *Stenotrophomonas*

2.3.2.1 Validación y refinamiento de la delimitación de especies realizada con MLSA mediante aproximaciones filogenómicas

Desde una perspectiva genómica, y poniendo particular atención en la estructura taxonómica de *S. maltophilia sensu lato*, se secuenciaron cinco cepas de las genopecies definidas como Smc1 y cinco de las definidas como Smc2. Implementando la tubería de GET_PHYLOMARKERS (diseñada por los autores de (Vinuesa, Ochoa-Sánchez, and Contreras-Moreira 2018), estas cepas se compararon con todas las secuencias de genomas disponibles para el género *Stenotrophomonas* hasta agosto de 2017. Los resultados fueron consistentes con la hipótesis de bordes de especie mencionada anteriormente. (Ver artículo completo en el **Anexo 4**.) En conclusión, en este trabajo se identificaron 10 especies. Los aislamientos del complejo *S. maltophilia* (Smc) fueron dominantes y se pudieron separar de manera consistente por lo menos cinco linajes principales: Smc1, Smc2, Smc3 y Smc4 y *S. maltophilia sensu lato*. Este último muestra una marcada estructura (heterogeneidad) genética interna, lo cual sugiere que contiene múltiples especies crípticas adicionales.

2.3.3 Análisis de asociación de las propiedades fenotípicas y ecológicas de los linajes: *S. maltophilia* como única productora de metalo- β -lactamasas

2.3.3.1 Análisis de correspondencia múltiple (MCA)

Se llevó a cabo un análisis de correspondencia múltiple para visualizar la asociación entre los perfiles de resistencia a los antibióticos, los fenotipos de producción de β -lactamasas y la

asignación de especies. Se incluyeron solo las especies con más de 10 aislamientos (Sm1, Smc1, Smc2 y *S. terrae*) para los análisis estadísticos. *S. maltophilia* forma una nube compacta y perfectamente independiente, caracterizada por una fuerte asociación con su perfil multirresistente y su condición de productora de metalo-β-lactamasas. Este grupo muestra una preferencia por los sedimentos de sitios contaminados. Por otro lado, encontramos que los linajes Smc1 y Smc2 están más asociados con el perfil de no multirresistencia y muestran preferencia por la columna de agua de sitios limpios o moderadamente contaminados (**Figura 7**).

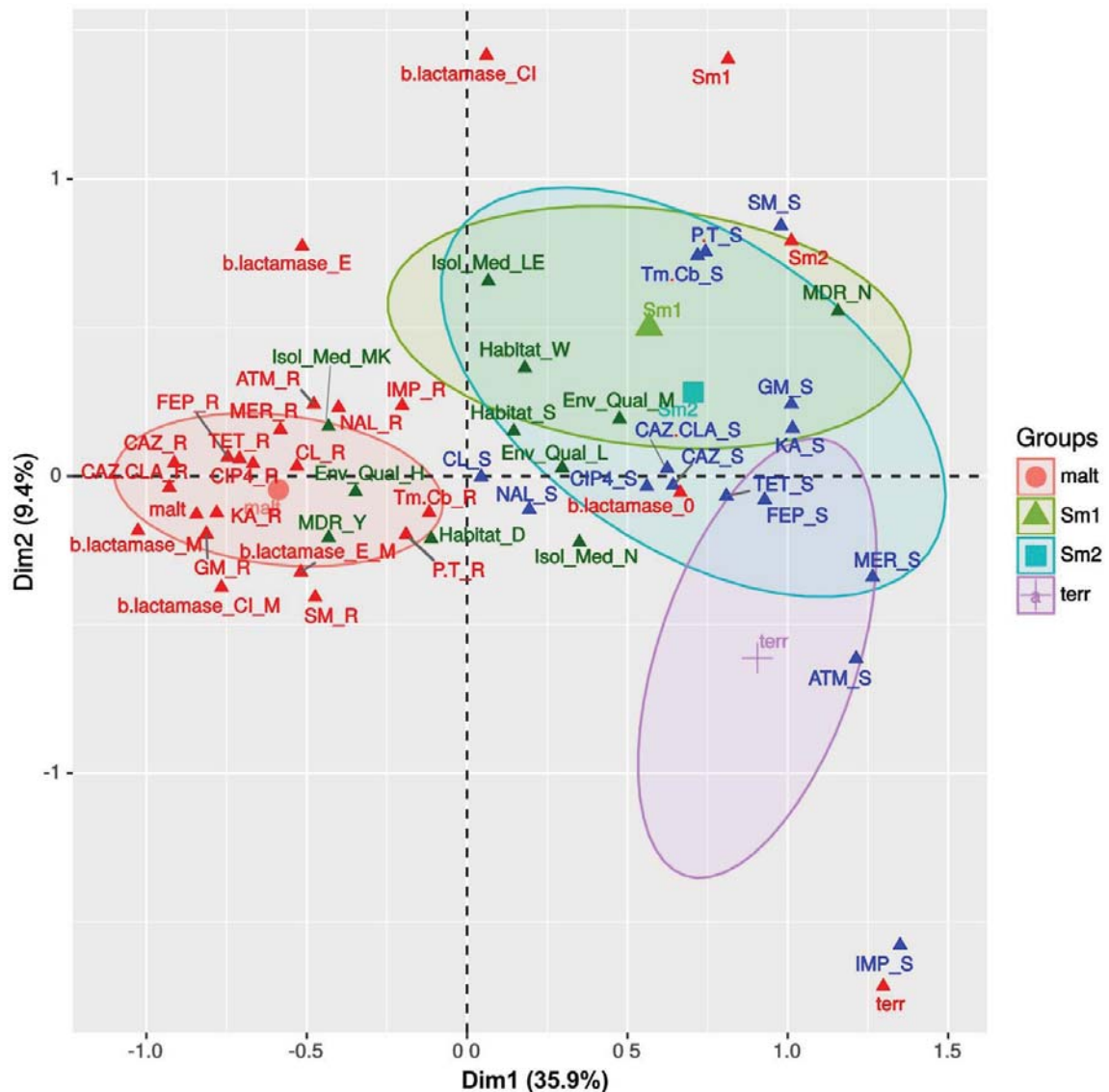


Figura 7. Análisis de correspondencia múltiple

Asociación entre perfiles de resistencia, fenotipos de producción de β-lactamasas y asignación de especie. Las 17 variables activas (IMP, imipenem; MER, meropenem; CAZ, ceftazidima; CAZ.CLA, ceftazidima con ácido clavulánico; FEP, cefepime; ATM, aztreonam, b. lactamase, especies; TmCb, trimetoprim + carbenicilina; CL, cloranfenicol; SM, streptomina; GM, gentamicina; KA, kanamicina; P.T, piperacilina/tazobactam; NAL, ácido nalidixico; CIP4, ciprofloxacino; TET, tetraciclina; b.lactamasa; especies) y las cuatro variables categóricas suplementarias [Habitat, Env_Qual (environmental quality -calidad ambiental), Isol_Med (isolation médium – medio de aislamiento), MDR (multi-drug resistance – multirresistencia)] se muestran ordenadas a lo largo de las dos primeras dimensiones que, en conjunto, explican el 45.3% de la varianza total. Se excluyeron algunas variables como CTX4 (cefotaxima), debido a la falta de variabilidad en los estados observados. Abreviaturas: malta=*S. maltophilia*; Sm1=Smc1; Sm2=Smc2; terr=*S. terrae*.

2.3.3.2 Análisis de la varianza

También se llevó a cabo un análisis ANOVA robusta (con medias recortadas) de una vía para determinar, por un lado, si había diferencias significativas entre el número de resistencias a los antibióticos individuales y el número de resistencias a las familias de antibióticos en Smsl, Smc1, Smc2 y, por otro lado, si los aislamientos de Smsl recuperados de sitios con nivel de contaminación alto y bajo presentaban el mismo número de resistencias individuales y por familias. Concluimos que las cepas de Smsl expresan una cantidad de resistencias significativamente mayor a los antibióticos individuales (12.63) y a las familias de antibióticos

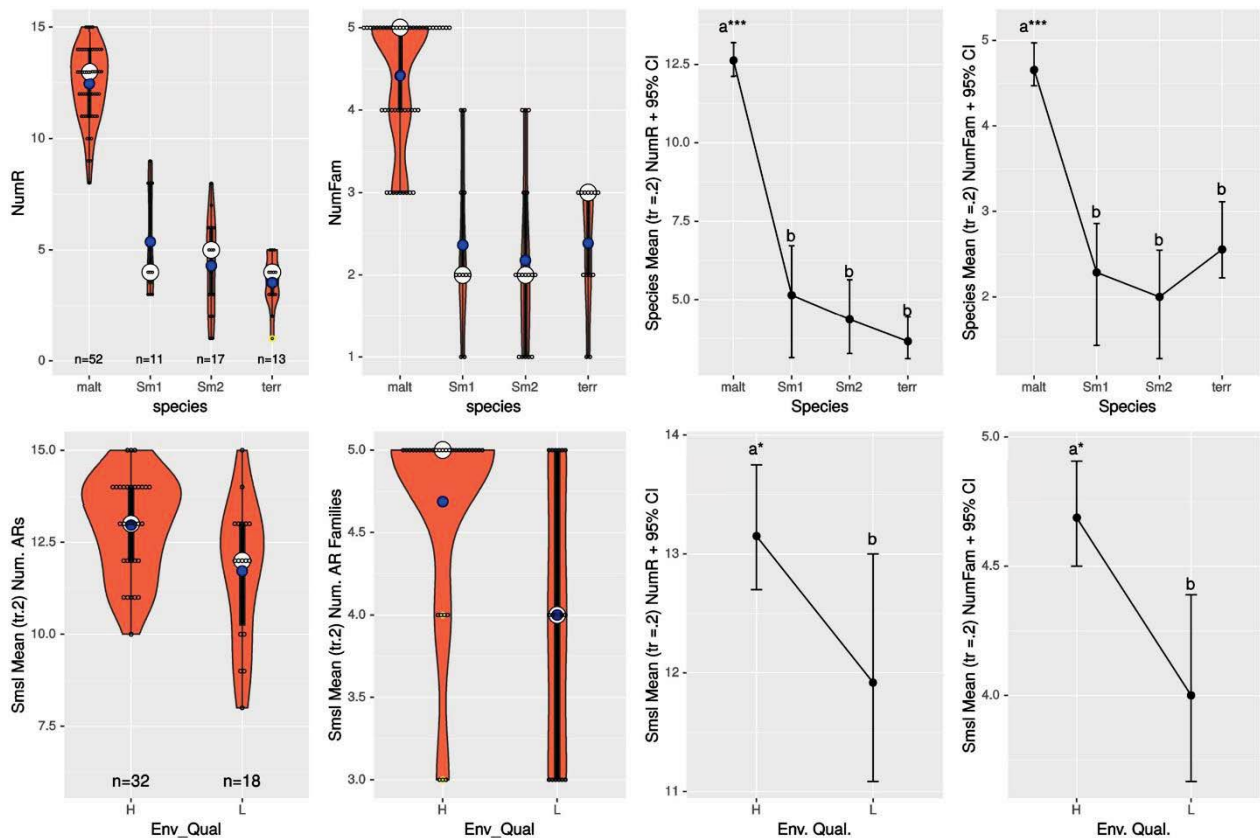


Figura 8. ANOVA de una vía muestra a *S. maltophilia* como MDR, donde los aislamientos de sitios contaminados presentan mayor número de resistencias a antimicrobianos

Se muestran gráficos de violín y diagramas de caja para los datos de número de resistencias a antimicrobianos individuales (NumR) y familias distintas de fármacos (NumFam) para aislamientos ambientales mexicanos. El punto blanco muestra la mediana y el azul, la media de la distribución de observaciones individuales, representadas como pequeños círculos abiertos. Los puntos amarillos indican puntos de datos atípicos. Los paneles de la fila superior corresponden a los análisis de los aislamientos mexicanos clasificados en las cuatro especies / linajes indicados en los ejes X. Los paneles inferiores corresponden a aislamientos mexicanos de *S. maltophilia* recuperados de sitios de alta y baja contaminación, según los criterios indicados en la Tabla 1. Se excluyeron los 4 aislamientos de *S. maltophilia* recuperados de sitios con nivel de contaminación intermedio, que ya que solo se tomaron en cuenta las poblaciones de organismos con > 10. Abreviaturas: Env. Qual = calidad ambiental, H = high (alto), L = low (bajo), malt = *S. maltophilia*, terr = *S. terrae*.

En conclusión, estos datos confirman que solo el linaje del complejo *S. maltophilia* (Smc), definido como *S. maltophilia* sensu lato (Smsl), es multidrogorresistente. Además, los aislamientos de este linaje provenientes de sitios contaminados son más resistentes.

2.3.3.3 Gráficas de asociación de la expresión de fenotipos de β -lactamasas

Se realizaron dos gráficas de asociación con base en los resultados de expresión de fenotipos de β -lactamasas. Encontramos una asociación significativa entre las especies y el tipo de β -lactamasas que expresan (**Figura 9**) y entre las especies y la calidad ambiental de su hábitat. La expresión de metalo- β -lactamasas estuvo asociada significativa y exclusivamente con los aislamientos de Smsl. Los linajes Smc1 y Smc no expresaron ningún tipo de β -lactamasas y los aislamientos de *S. terrae* no mostraron expresión de ningún tipo de estas enzimas (**Figura 9**).

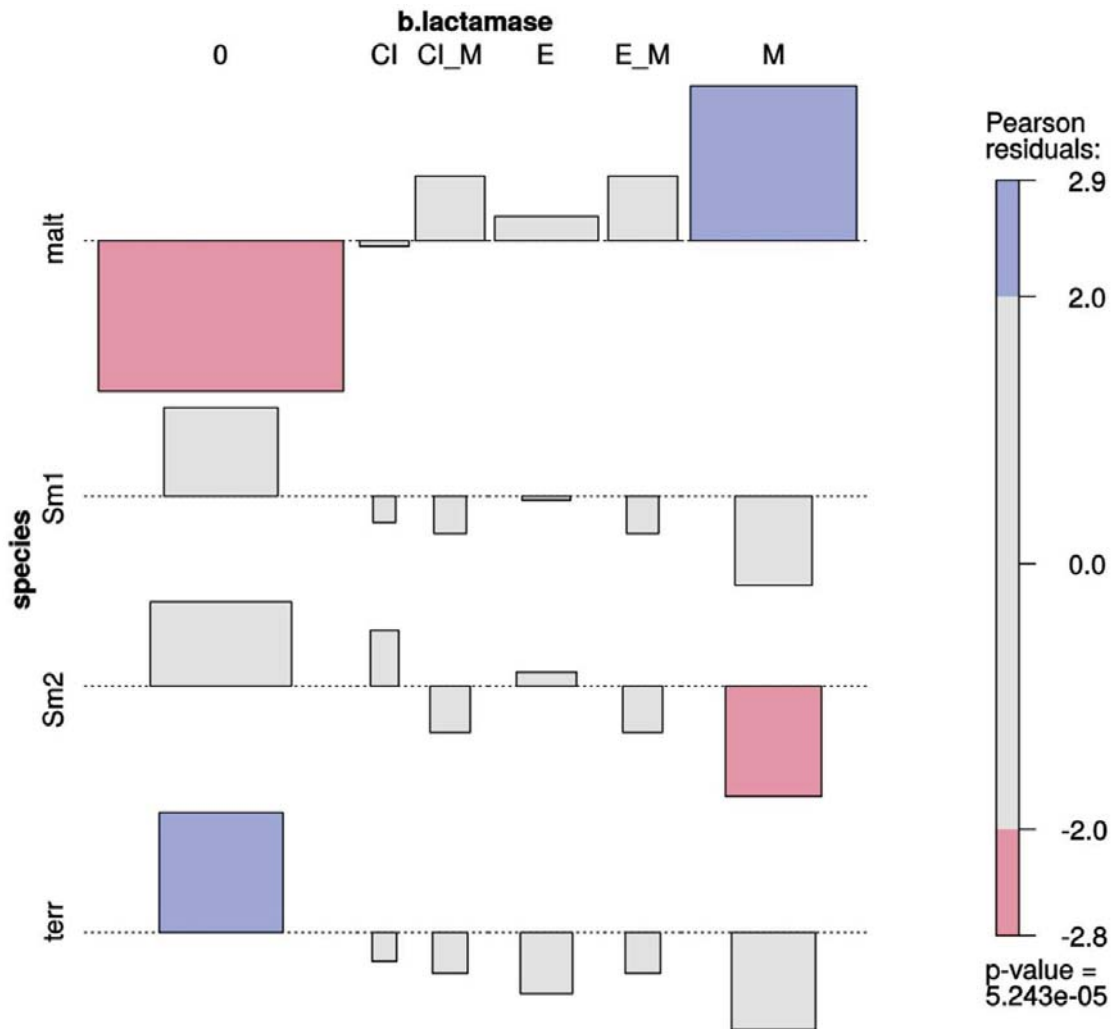


Figura 9. Gráfico de asociación bidireccional de las especies de *Stenotrophomonas* con > 10 aislamientos ambientales mexicanos y su fenotipo de producción de β -lactamasas

Las barras representan los residuos de Pearson. El código de color y la altura de las barras indican el nivel de significancia y la magnitud de los residuos. Los anchos de las barras son proporcionales al tamaño de la muestra. Los códigos de β -lactamasa son los siguientes: 0= no se detectó actividad de β -lactamasa; CI=cefalosporinasa de clase A o clase C (AmpC) inducible por clavulanato; CI_M= cefalosporinasa inducible por clavulanato más metalo- β -lactamasa (MBL); E = β -lactamasa de espectro extendido (ESBL); E_M = ESBL más MBL; M = MBL.

2.3.3.4 Asociación de especies de *Stenotrophomonas* y hábitat de aislamiento

Se realizó un análisis estadístico de asociación multivía para determinar si la prevalencia de especies de *Stenotrophomonas* es independiente de su hábitat de aislamiento (sedimento vs. columna de agua), del nivel de contaminación del hábitat, y del medio de aislamiento. El valor de p resultó ser menor a 0.00001 ($p < 0.00001$), lo cual rechaza con fuerza la hipótesis nula de no asociación entre especies y hábitats, es decir, el hábitat de aislamiento no determinó la presencia de *Stenotrophomonas*. Observamos que *S. maltophilia* se recuperó mayormente en medio MacConkey y estuvo significativamente asociada con sedimentos contaminados. El linaje Smc1 mostró una asociación moderada con la columna de agua limpia, aunque algunos aislamientos también se recuperaron en medio NAA de sedimentos contaminados. En contraste, los aislamientos del linaje Smc2 estuvieron significativamente sobrerrepresentados en la columna de agua limpia y subrepresentados en los sedimentos. Estos resultados sugieren que existe un alto nivel de especialización ecológica. Cabe señalar que los aislamientos de *S. terrae* se recuperaron principalmente en medio NAA de sedimentos de sitios limpios (**Figura 10**).

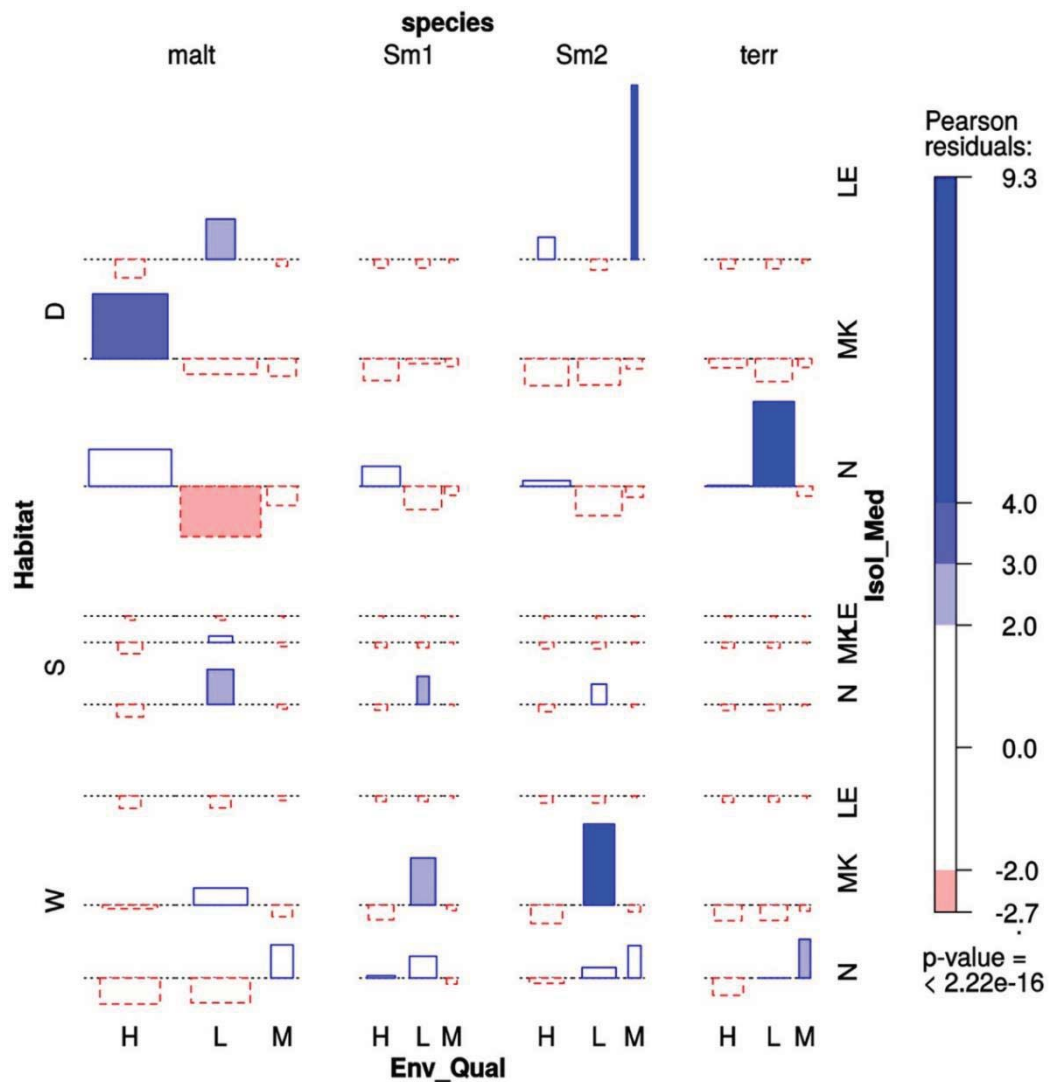


Figura 10. Gráfico de asociación de cuatro vías con los resultados del análisis de χ^2 multivía de las especies de *Stenotrophomonas* con respecto al hábitat, el medio de aislamiento y el nivel de contaminación del sitio de aislamiento

Hábitat (W = columna de agua, S = suelo inundado, D = Sedimento), medio de aislamiento (N = NAA; MK = medio MacConkey; LE = medio Leed) y nivel de contaminación (H=alto; L=bajo; M=intermedio, con base en el recuento de coliformes termotolerantes y *E. coli*, como se define en la Tabla 1). La barra de la gráfica representa los residuos de Pearson. El código de color y la altura de las barras indican el nivel de significancia y la magnitud de los residuos. El ancho de las barras indica la proporción del tamaño de muestra.

2.3.4 Métodos comerciales demuestran poca sensibilidad para la identificación de especies *Stenotrophomonas* no *maltophilia*

Se analizaron 31 cepas (previamente secuenciadas) de las diferentes especies identificadas del género en este estudio usando galerías API y 13 cepas, clasificadas en 5 especies por los análisis filogenéticos, con el método automatizado sensitre para medir su sensibilidad y especificidad y detectar las especies del complejo *maltophilia* con los métodos más comúnmente utilizados en

los hospitales* **Tabla 6.** Los métodos resultaron ser 100% sensibles, sin embargo, fueron poco específicos 23-30%. Estos valores sugieren que este tipo de pruebas para identificación de especies del género *Stenotrophomonas* no son adecuadas. Esta situación fomenta el uso innecesario de antibióticos y, en consecuencia, promueve la selección de bacterias multirresistentes. Además, eleva los costos del tratamiento y puede llevar incluso a la muerte del paciente por falla terapéutica. **(Esta sección está basada en datos no publicados).**

Tabla 7. Clasificación de especies de *Stenotrophomonas* con base en diferentes metodologías

Cepa	Genoma	API	Sensititre
ESTM1A_MKCAZ1_5	<i>S. maltophilia</i>	<i>S. maltophilia</i>	NA
ESTM1A_MKCTX4_10a	<i>S. maltophilia</i>	<i>S. maltophilia</i>	<i>S. maltophilia</i>
ESTM1A_MKCTX4_10b	<i>S. maltophilia</i>	<i>S. maltophilia</i>	NA
ESTM1A_MKIMI1_9	<i>S. humi</i>	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	<i>S. maltophilia</i>
ESTM1D_MKCIP4_1	<i>sm1</i>	<i>S. maltophilia</i>	NA
TEXM2A_MKIMI4_3	<i>S. maltophilia</i>	No válida	<i>S. maltophilia</i>
TEXM2D_MKIMI4_3	<i>S. acidaminiphila</i>	<i>S. maltophilia</i>	NA
TEXM3A_NACIP1_4	<i>S. maltophilia</i>	<i>S. maltophilia</i>	NA
TEXM3D_MKCAZ8_7	<i>S. maltophilia</i>	<i>S. maltophilia</i>	<i>S. maltophilia</i>
TEXM3D_NACIP1_4	<i>S. maltophilia</i>	<i>S. maltophilia</i>	NA
SAU14A_NAIMI4_2	<i>S. terrae</i>	<i>S. maltophilia</i>	<i>Chryseobacterium indologenes</i>
SAU14A_NAIMI4_3	<i>sm1</i>	<i>S. maltophilia</i>	<i>S. maltophilia</i>
SAU14A_NAIMI4_5	<i>sm1</i>	<i>S. maltophilia</i>	NA
SAU14Dr_NAIMI4_11	<i>S. maltophilia</i>	<i>S. maltophilia</i>	NA
EST14D2_NAIMI4_8	<i>S. terrae</i>	<i>S. maltophilia</i>	<i>Shewanella putrefaciens</i>
YAU14A_MKIMI4_1	<i>sm2</i>	No válida	NA
YAU14A_NACA28_1	<i>S. maltophilia</i>	<i>S. maltophilia</i>	<i>S. maltophilia</i>
YAU14D1_LEIMI4_1	<i>sm2</i>	<i>S. maltophilia</i>	NA
ZAC14A_NAIMI4_1	<i>sm1</i>	<i>S. maltophilia</i>	<i>S. maltophilia</i>
ZAC14D1_NAIMI4_6	<i>sm1</i>	<i>S. maltophilia</i>	NA
ZAC14D1_NAIMI4_9	<i>sm2</i>	<i>S. maltophilia</i>	<i>S. maltophilia</i>
ZAC14D2_NAIMI4_1	<i>S. maltophilia</i>	<i>S. maltophilia</i>	NA
ZAC14D2_NAIMI4_2	<i>S. acidaminiphila</i>	No válida	NA
ZAC14D2_NAIMI4_6	<i>sm2</i>	<i>S. maltophilia</i>	NA
ZAC14D2_NAIMI4_7	<i>sm2</i>	<i>S. maltophilia</i>	NA
ZAC14D1_MKIMI4_8	<i>S. maltophilia</i>	<i>S. maltophilia</i>	NA
ZAC14D2_LEIMI4_13	<i>sm2</i>	No válida	<i>S. maltophilia</i>
SAU14A_NAIMI4_8	<i>sm2</i>	<i>S. maltophilia</i>	NA
EST14A_MKIMI4_1	<i>sm1</i>	<i>S. maltophilia</i>	<i>S. maltophilia</i>
ZAC14D1_NAIMI4_1	<i>sm1</i>	<i>S. maltophilia</i>	NA
ESTM1A_MKIMI1_9	<i>S. humi</i>	<i>S. maltophilia</i>	NA
ESTM1A_MKIMI4_2	<i>sm2</i>	NA	<i>S. maltophilia</i>

NA= No aplica

* Para ello se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$\text{sensibilidad} = \frac{VP}{VP+FN} \times 100 \quad \text{especificidad} = \frac{VN}{VN+FP} \times 100$$

donde VP = verdaderos positivos, FN = falsos negativos, VN = verdaderos negativos y FP = falsos positivos.

2.3.5 Pruebas de susceptibilidad para *Stenotrophomonas* frente a antibióticos de elección (CLSI, EUKAST): Levofloxacino como una opción para el tratamiento de infecciones ocasionadas por *S. maltophilia*

Se llevaron a cabo pruebas de susceptibilidad (**datos no publicados**) para *Stenotrophomonas* frente a antibióticos de elección (trimethoprim-sulfametoxazol y levofloxacino) (CLSI, 2017) y antibióticos de última generación (colistina y tigeciclina) para el tratamiento de enfermedades ocasionadas por *S. maltophilia*. Puesto que este microorganismo es productor intrínseco de β -lactamasas, también incluimos en los análisis agentes antibióticos con inhibidores de estas enzimas (ampicilina-sulbactam, amoxicilina-ácido clavulánico y ticarcilina-ácido clavulánico). Además, se incluyeron en el perfil de antibióticos otras especies del género de las cuales contábamos con más de 10 individuos (Sm1, Sm2 y *S. terrae*), puesto que aún no se han realizado estudios sobre su susceptibilidad.

S. maltophilia resultó ser la especie con mayor número de resistencias a los antibióticos. Fue resistente a la mayoría de los antibióticos probados. De especial cuidado deben ser trimethoprim-sulfametoxazol y colistina, ya que se han empezado a observar resistencias considerables de la especie ante estos agentes. Observamos que levofloxacino es un antibiótico prometedor para el tratamiento de infecciones ocasionadas por este patógeno.

Sm1 presentó altas resistencias ante cefoxitín y amoxicilina-ácido clavulánico. Cabe señalar que la mitad de las cepas probadas resultaron ser resistentes a trimethoprim-sulfametoxazol y ampicilina-sulbactam. Sm2 y *S. terrae* mostraron resistencias principalmente a los antibióticos en combinación con inhibidores de β -lactamasas y a cefoxitín (**Figura 11 y 12**).

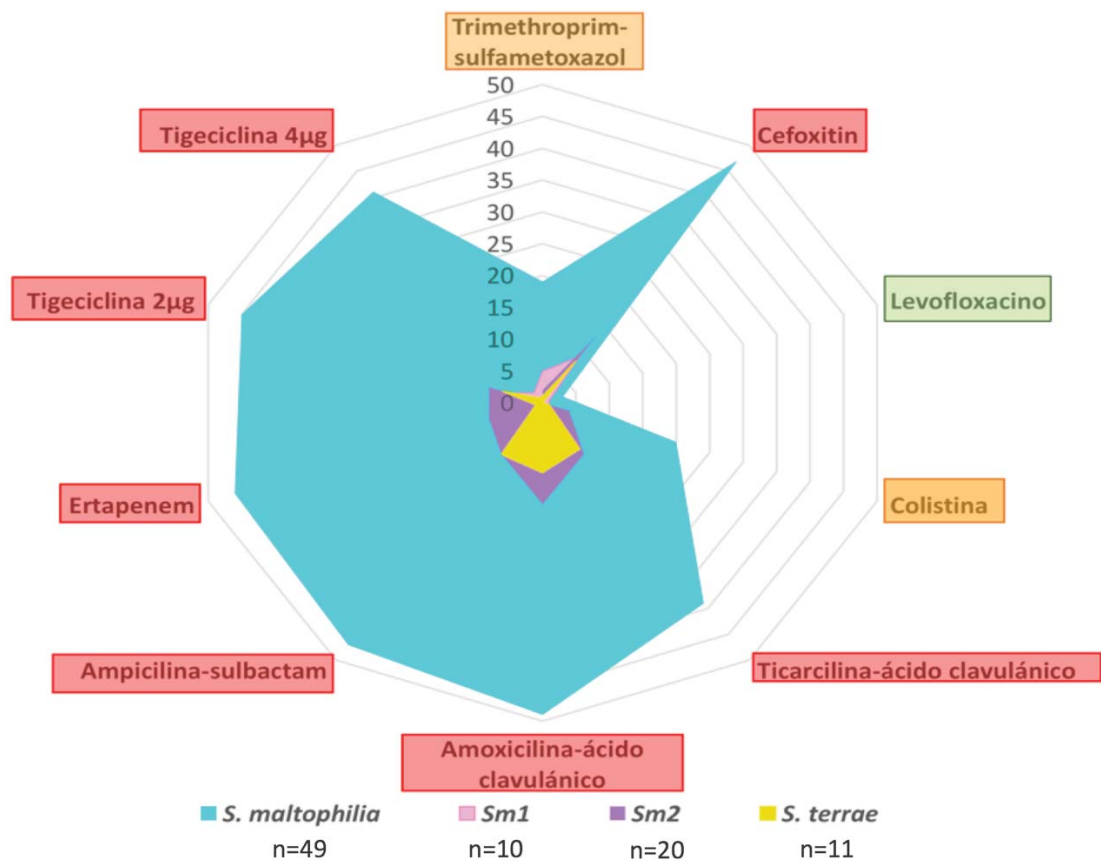


Figura 11. Análisis de red de la susceptibilidad de *Stenotrophomonas* frente a antibióticos de elección, antibióticos de última generación e inhibidores de β -lactamasas

La red representa el número de individuos que se incluyeron de cada especie para el análisis. El color azul corresponde a las cepas resistentes de *S. maltophilia* a cada uno de los antibióticos probados. El color rosa corresponde a las cepas resistentes de Sm1. El color violeta corresponde a las cepas resistentes de Sm2. El color amarillo corresponde a las cepas resistentes de *S. terrae*. Los rectángulos rojos corresponden a los antibióticos ante los cuales se observa mayor resistencia de las cepas. Los rectángulos anaranjados corresponden a los antibióticos ante los que la mitad de las cepas muestran resistencia y, por lo tanto, deben utilizarse con precaución. El rectángulo verde corresponde a levofloxacin, el único antibiótico ante el cual la mayoría de las cepas fue sensible.

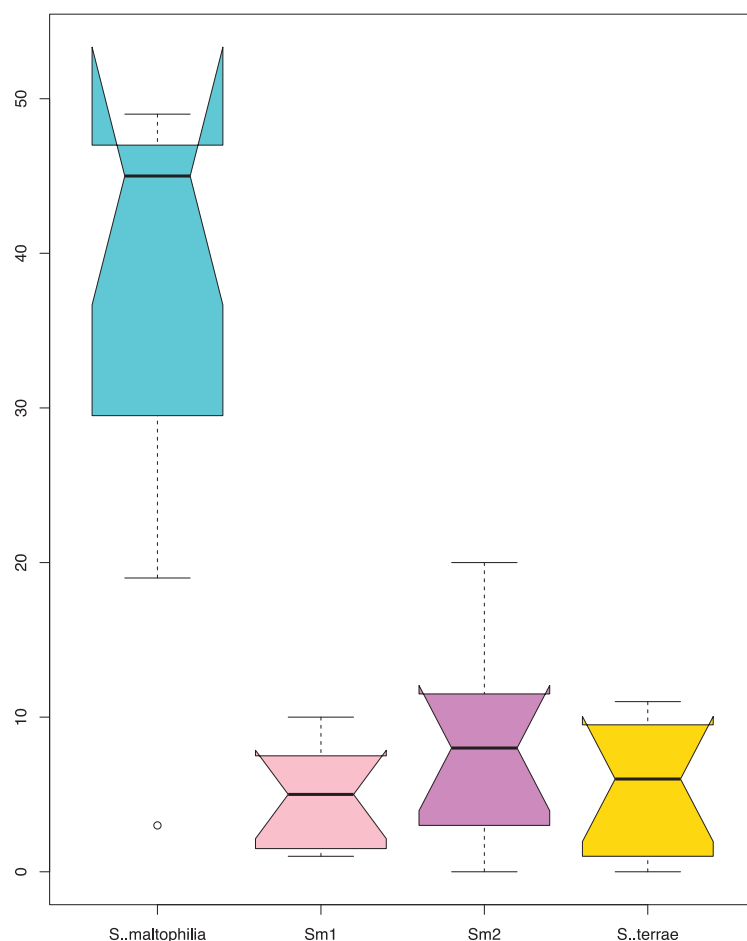


Figura 12. Diagramas de caja para el número individual de resistencias a antimicrobianos de los aislamientos ambientales mexicanos de *Stenotrophomonas*

El color azul corresponde a *S. maltophilia*. El color rosa corresponde a Sm1. El color violeta corresponde a Sm2. El color amarillo corresponde a *S. terrae*. La línea negra gruesa en cada caja corresponde a la mediana de la muestra. Las líneas que sobresalen de las cajas corresponden al valor mínimo (la inferior) y al valor máximo (la superior) de los datos. Los círculos pequeños representan los valores extremos.

2.3.6 Ejemplos puntuales del impacto de la contaminación antropogénica sobre los elementos genéticos móviles de *Stenotrophomonas acidaminiphila*

De nuestra colección de *Stenotrophomonas*, se seleccionaron 60 aislamientos —con base en su posición filogenética, sus perfiles de resistencia, y la presencia o ausencia de elementos genéticos móviles— para llevar a cabo la secuenciación de su genoma completo. De este grupo, se identificaron tres cepas de *S. acidaminiphila* (**Figura 5A**) provenientes de ambientes con alto grado de contaminación fecal: ZAC14D2_NAIMI4_2, TEXM2D_MKIMI4_3 y TEXM2D_MKIMI4_19.

Las cepas TEXM2D_MKIMI4_3 y TEXM2D_MKIMI4_19 que están relacionadas filogenéticamente se observan en el árbol conformando un clado muy diferenciado, con escasa distancia evolutiva entre ellas. Estas cepas presentaron perfiles de susceptibilidad muy diferentes. La cepa TEXM2D_MKIMI4_3 presentó resistencia a 12 antibióticos pertenecientes a

cinco familias de antibióticos, mientras que la cepa TEXM2D_MKIMI4_19, solo a cuatro antibióticos que corresponden a dos familias. Esto se debió a la presencia de un integrón de clase 1, que contiene los genes de resistencia blaOXA-2 y aac(6)-Ib, precedidos por la integrasa IntI1A **Figura 13A**. El alelo de blaOXA-2 es idéntico a uno de *Enterobacter cloacae*, (filogenia presentada en la **Figura 13B**) sugiriendo transferencia desde una *Enterobacteriaceae*. Esta región está flanqueada por transposasas (STAC3_32580 y tnpA), que posiblemente estuvieron involucradas en la movilización del integrón. Nótese que hay un gap en el ensamblaje río abajo de STAC3_32580 (**Figura 13A**). Al ordenar los contigs de TEXM2D_MKIMI4_3 con el genoma completo de referencia *S. acidaminiphila* ZAC14D2_NAIMI4_2 (Vinuesa and Ochoa-Sánchez 2015), sugiere que el integrón va ligado a una región de resistencia a cobre (operón cop completo) y otros metales. Los genes STAC3_32490 y STAC3_32500 forman un sistema de dos componentes probablemente involucrados en la regulación del mismo dado su alto parecido al sistema de dos componentes IrlS e IrlR de *Burkholderia pseudomallei*. Involucrado en el control de la homeóstasis de metales pesados (A. L. Jones, DeShazer, and Woods 1997); (Van Der Lelie et al. 1997). Estos genes tienen 100% de similitud y 100% de cobertura con CusS y CusR de múltiples especies y géneros de beta proteobacterias. A unas pocas kilobases río arriba del operón cop se encuentra otra transposasa, por lo que esta región tiene una historia compleja de movilización y ensamblaje por transferencia horizontal.

En resumen, esta es la primera vez que se identifica un integrón de clase 1 en *Stenotrophomonas acidaminiphila*. Pudimos observar dos fenómenos de interés: 1) todas las cepas recuperadas de esta especie son sensibles a la mayoría de los antimicrobianos probados en este estudio, excepto la cepa TEXM2D_MKIMI4_3 que presenta el integrón, y 2) todas las cepas de la especie se recuperaron de ambientes con alto grado de contaminación.

Por otro lado, en la cepa de referencia *S. acidaminiphila* ZAC14D2_NAIMI4_2 (Vinuesa and Ochoa-Sánchez 2015) localizamos una isla genómica (GEI_Stac2, 10.2Kb, G+C=0.63%) que porta un gen que anotamos como una nueva cloranfenicol O-acetil transferasa de tipo B (catB), no descrita en Gamma proteobacteria, y distantemente relacionada con homólogos en *Bacteroidetes* y *Cyannobacteria*, como muestra la filogenia presentada en la (**Figura 14**). Este gen fue amplificado mediante PCR, clonado en el vector TOPO2 PCR, y transformado en *E. coli* DH5 α , demostrando que confiere resistencia a cloranfenicol 50mg/L y que por lo tanto es un novedoso gen tipo catB.

Estos resultados nos sugieren que la contaminación antropogénica es determinante en la adquisición de elementos genéticos móviles responsables de la transferencia horizontal de resistencia a antimicrobianos, tal y como postulamos en nuestra hipótesis.

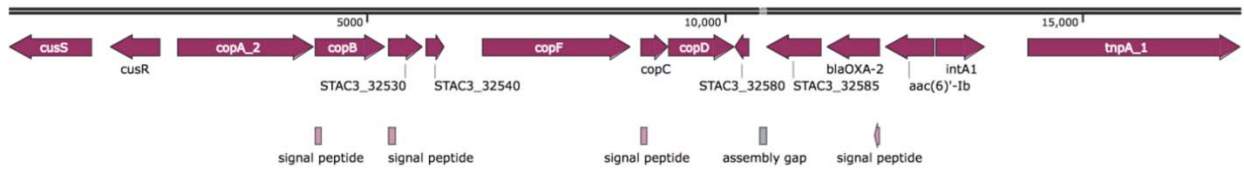


Figura 13A. Resistencia adquirida en *S acidaminiphila* (TEXM2D_MKIMI4_3) debido a que codifica un integrón de clase 1 que contiene bla-OXA-2 una β-lactamasa de clase D que no se ha reportado previamente en *Stenotrophomonas*



Figura 13B. Filogenia de máxima verosimilitud de la β-lactamasa de clase D bla-OXA-2 con los 30 blastp hits Sugiere que bla-OXA-2 del integrón de clase 1 de la cepa de *S. acidaminiphila* (ZAC14D2_NAIMI4_2) está involucrada en transferencia horizontal con *Enterobacter*

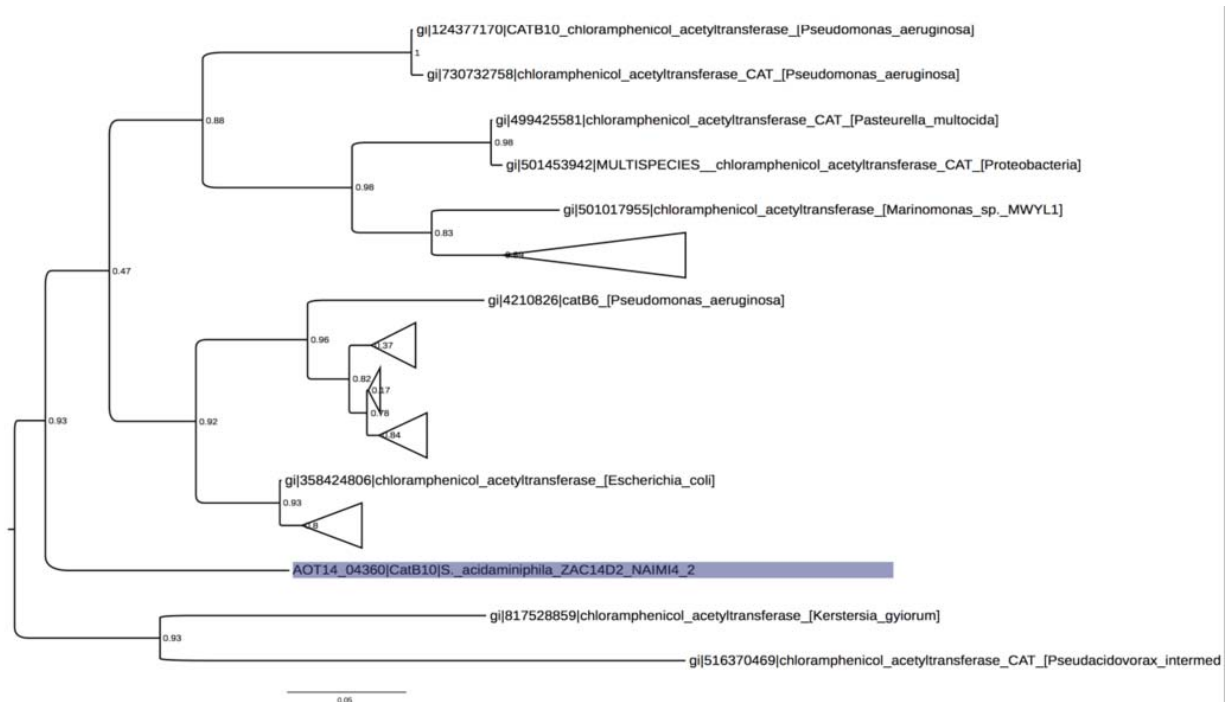


Figura 14. Filogenia de máxima verosimilitud de la cepa ZAC14D2_NAIMI4_2 de la proteína AOT14_04360 que codifica a una nueva cloranfenicol O-acetiltransferasa, con 50 blastp hits

2.4 Discusión

La delimitación de las especies del género *Stenotrophomonas* que realizamos con los aislados de nuestra colección usando una combinación de métodos filogenéticos y de genética de poblaciones reveló una amplia diversidad de especies de *Stenotrophomonas* en los ambientales muestreados. De manera conservadora, identificamos al menos seis especies, dos de ellas claramente nuevas (Smc1 y Smc2). Este es el primer estudio donde el modelo coalescente multiespecies —utilizado para delimitar especies de mamíferos (Rannala and Yang 2003; Edwards, Liu, and Pearl 2007; Degnan and Rosenberg 2009)— acoplado con análisis de factor de Bayes (Factors, Kass, and Raftery 1995) se usa para la delimitación de especies microbianas. En nuestro análisis, la topología de la filogenia de máxima verosimilitud inferida a partir del conjunto de datos concatenado es congruente con el árbol inferido a partir del modelo coalescente multiespecies. La diferencia más notable entre ambos se observa en dos linajes (Smc1 y Smc2) en relación con Smsl. En el árbol de máxima verosimilitud, las ramas ordenan a los clados hermanos de la siguiente manera: Smc2-Smc1-Smsl, donde Smc2 es el clado basal y Smsl es el linaje más derivado. Por otra parte, en el árbol de especies bayesiano, Smsl es el clado basal con respecto a Smc1 y Smc2. Esta diferencia puede deberse a un artefacto derivado de la concatenación de loci usada para estimar el árbol de máxima verosimilitud. Una ventaja del modelo coalescente es que no requiere la concatenación. No obstante, la diferencia topológica

puede deberse también a que el árbol coalescente refleja la heterogeneidad genética de las cepas agrupadas en el linaje Smsl, que probablemente incluye múltiples especies crípticas adicionales, como sugiere la alta diversidad y la marcada estructura interna del clado, reveladas por el análisis de estructura. Además, estos resultados apoyan nuestros análisis genotaxonómicos (Vinuesa, Ochoa-Sánchez, and Contreras-Moreira 2018). Por ello, la rama correspondiente al Smsl se bifurca antes en el árbol de especies, al corresponderse con un tamaño poblacional ancestral mucho mayor.

A pesar de las decisiones conservadoras tomadas en este estudio, el análisis de factor de Bayes, proporciona un soporte estadístico fuerte a favor de separar el complejo *S. maltophilia* en cinco linajes evolutivos: *S. maltophilia sensu lato* (Smsl) y las genoespecies crípticas Smc1, Smc2, Smc3 y Smc4. Identificamos también tres aislados de *S. acidaminiphila*, una población de aislados cercanos a *S. terrae* y un aislado similar a *S. humi*. El análisis también muestra que el genogrupo 8, hermano de *S. rhizophila*, es *S. bentonitica* y constituye un linaje independiente, (Vinuesa, Ochoa-Sánchez, and Contreras-Moreira 2018), lo cual podría tener implicaciones importantes en el área de la biotecnología, ya que esta especie puede promover el crecimiento de plantas y llevar a cabo funciones de biocontrol (Vasileuskaya-Schulz et al. 2011). *S. rhizophila* es una especie segura ya que es sensible a la mayoría de los antibióticos y no presenta enzimas de resistencia; además es fácil de separar de *S. maltophilia*, especie ampliamente descrita como patógena (Berg and Martinez 2015). La consistencia que encontramos entre todas las estrategias usadas, incluido el análisis de pangenoma (Vinuesa, Ochoa-Sánchez, and Contreras-Moreira 2018) apoyan fuertemente la delimitación que proponemos.

Existen modelos de especiación bacteriana que sugieren que las especies con una relación cercana exhiben cierto grado de particionado o uso diferencial de recursos y, consecuentemente, ocupan diferentes nichos. Así, las especies pueden beneficiarse o verse afectadas por la ganancia de un gen a través de transferencia horizontal o de alguna mutación adaptativa. A partir de estos modelos, se ha propuesto que los linajes cercanos de especies bacterianas se identifiquen con base en el flujo reducido de genes entre ellos, mientras que las especies del mismo linaje presentarán una alta recombinación genética (Shapiro 2014); (Cadillo-Quiroz et al. 2012). En este trabajo, nosotros mostramos que los linajes mexicanos Smsl, Smc1, y Smc2 encajan bien en este modelo.

De acuerdo con la prueba estadística KST (Hudson, Boos, and Kaplan 1992), con base en los polimorfismos de ADN se observa una diferenciación genética significativa entre todos los linajes

simpátricos. Esta prueba es consistente con los resultados obtenidos mediante el análisis de STRUCTURE. Por otro lado, el número de migrantes entre estos linajes fue insignificante, lo cual muestra niveles bajos de flujo de genes entre ellos. Sin embargo, las estimaciones de Rho/theta obtenidas (1.11 para Smc1 y casi 3 para Smsl), nos señalan que la recombinación es una fuerza importante de cohesión génica en estos linajes. Los altos niveles de recombinación en el linaje Smsl sugieren que en este grupo la especiación se encuentra en curso, lo cual se aprecia en los bordes vagos entre los sublinajes (Shapiro, Leducq, and Mallet 2016; Hanage, Fraser, and Spratt 2005). Esta situación también puede observarse en los resultados del análisis STRUCTURE y los análisis filogenéticos, a partir del poder resolutivo provisto por el esquema de siete genes de MLST. Es por esto que nosotros nos referimos a este linaje de forma conservadora como *S. maltophilia* sensu lato (Smsl). Con el análisis pangenómico, pudimos confirmar que Smc contiene las genopecies Smc1, Smc2, Smc3 y Smc4. Además, en el clado de *S. maltophilia* sensu lato se proponen, conservadoramente, ocho linajes nuevos con base a la evidencia consistente derivada del análisis filogenómico del core, pan-genoma y agrupamiento de valores de diversidad nucleotídica promedio entre genomas (ANI_b) (Vinuesa, Ochoa-Sánchez, and Contreras-Moreira 2018).

Como lo predicen los modelos de especiación desarrollados recientemente para bacterias (Koeppel et al. 2008; Vos 2011; Shapiro and Polz 2015), la marcada diferenciación genética detectada entre las poblaciones ambientales simpátricas de Smsl, Smc1 y Smc2 apunta a su asociación significativa con las preferencias de hábitat, a partir de sus perfiles de susceptibilidad a antibióticos y a sus fenotipos de expresión de β -lactamasas. Estos atributos sugieren fuertemente que los linajes tienen fenotipos y, por lo tanto, nichos ecológicos diferenciados. Las preferencias de hábitat pueden proveer una separación microgeográfica entre las poblaciones que coexisten en el mismo río. Esto podría explicar, en parte, el reducido flujo genético entre ellas, a pesar de ser linajes hermanos. Esto contribuye a su diferenciación genética. Estas características también se han observado en otros microorganismos acuáticos como *Desulfolobus* (Oakley et al. 2010), *Exiguobacterium* (Rebollar et al. 2012) y *Vibrio* (Shapiro 2014) (Friedman, Alm, and Shapiro 2013). Nuestros resultados apoyan la creciente evidencia que señala que la partición de nicho es un factor principal que promueve la divergencia evolutiva entre poblaciones procariontas simpátricas estrechamente relacionadas, incluso cuando presentan altos niveles de recombinación (Shapiro and Polz 2015).

En cuanto a los atributos fenotípicos del género, la resistencia a los antibióticos se discute frecuentemente en la literatura. En general, se ha argumentado que existe una alta variación de fenotipos de resistencia antimicrobiana en *S. maltophilia* (Deredjian et al. 2016). Sin embargo, nuestro argumento es que esta variación reportada en la literatura se debe a una delimitación inapropiada de las especies, debida al uso de métodos pobres de tipificación, que no pueden discriminar linajes dentro del complejo *S. maltophilia*.

La mala identificación de *Stenotrophomonas* tiene repercusiones en diferentes niveles. Por un lado, podría afectar la aplicación de las cepas seguras en agricultura y biotecnología. Por otro lado, puede haber consecuencias graves derivadas de la pobre especificidad de los métodos utilizados regularmente para la identificación bacteriana en la clínica: elevación de los costos del tratamiento, posible aparición de efectos secundarios adversos, fomento de la multiresistencia, e incluso la muerte de los pacientes.

Esta situación se ha desencadenado de estudios que han identificado a todo el género *Stenotrophomonas* como intrínsecamente resistente a múltiples fármacos (Brooke 2012; Berg and Martinez 2015). En contraste, nuestro estudio revela una asociación muy significativa entre el linaje Smsl y la producción de metalo- β -lactamasas, que no detectamos en los linajes Smc1 y Smc2. Por lo tanto, la resistencia intrínseca a los antibióticos solo se debe asumir para cepas Smsl, tanto de origen clínico como ambiental, pero no para los linajes que quedan fuera de este.

Finalmente, es relevante volver a mencionar el hecho de haber encontrado elementos genéticos móviles portadores de determinantes de resistencia en cepas de *S. acidaminiphila* susceptibles a antibióticos en ambientes con alta contaminación antropogénica. Esto sugiere que tal contaminación puede ser un importante factor que promueve la transferencia y selección de determinantes de resistencia antimicrobiana entre bacterias de dichos hábitats, incluso cuando estas carecen de plásmidos.

2.5 Conclusión

Los resultados a los que llegamos a través del uso de métodos de genética de poblaciones y de filogenética muestran que es posible llevar a cabo una delimitación robusta de los bordes de especies naturales en poblaciones de *Stenotrophomonas*. Los análisis genómicos presentados para 10 cepas de los linajes simpátricos Smc1 y Smc2 apoyan plenamente su estado de especies separadas. Gracias a esta delimitación evolutiva de especies, pudieron encontrarse asociaciones estadísticamente significativas entre los diversos linajes detectados con perfiles de resistencia

diferenciados, así como preferencias de hábitat contrastantes. Solo el linaje aquí definido como *S. maltophilia* sensu lato (Smsl) es multidrogo-resistente y productor de metalo- β -lactamasas. Smsl presenta en promedio resistencia a 12 de los 15 combinaciones y antibióticos analizados siendo por lo tanto pan-resistentes. Cabe señalar que de los antibióticos recomendados por el (CLSI 2017) entre los que tenemos a ticarcilina-ácido clavulánico, ceftazidima, levofloxacino, trimetoprima con sulfametoxazol y cloranfenicol, solo levofloxacino parece ser una buena opción para el tratamiento ocasionado por estos macroorganismos. Debido a que es el antibiótico en el que se observó mayor susceptibilidad. Es necesario estar en alerta con trimetoprim-sulfametoxazol (antibiótico de elección) ya que la mitad de nuestros alimentos ya presentan resistencia a este agente.

2.6 Perspectivas

- Realizar análisis de genómica comparativa y de poblaciones para resolver el estado de especiación de los sublinajes dentro de Smsl
- Estudiar la ecología y la evolución tanto de la resistencia intrínseca como de la adquirida
- Realizar análisis de patogénesis y virulencia dentro de los diferentes sublinajes
- Llevar a cabo los análisis antes propuestos acompañados de cepas del género aisladas de ambientes clínicos para realizar comparaciones integrativas
- Realizar propuestas de esquemas antibióticos para el tratamiento de enfermedades causadas por especies del género *Stenotrophomonas*, con base en análisis genómicos y fenotípicos

Capítulo 3. *Acinetobacter*

3.1 Antecedentes: Microbiología, epidemiología y taxonomía del género

En la actualidad, *Acinetobacter* es uno de los géneros con más relevancia en el área clínica debido a su multirresistencia a antibióticos. Beijerinck et al. (1911) aislaron cepas de una especie de este género a partir de un medio mínimo con acetato de calcio, pero la incluyeron en otro género denominándola *Micrococcus calcoaceticus*. Posteriormente, Brisou y Prévot (1954) la caracterizaron y propusieron la existencia de un género distinto al que llamaron *Acinetobacter*. Años después (Baumann 1968) continuaron la caracterización de este género.

Tabla 8. Taxonomía del género *Acinetobacter*

Dominio	Bacteria (Woese, Kandler, and Wheelis 1990)
Filo	Proteobacteria (Garrity and Lilburn 2005)
Clase	Gammaproteobacteria (Garrity and Lilburn 2005)
Orden	Pseudomonadales (Orla-Jensen, 1921)
Familia	Moraxellaceae (S. Il Kim, Yoo, and Kahng 2001) (Lwoff, 1939)
Género	<i>Acinetobacter</i> (Brisou and Prevot 1954)
Especie principal	<i>Acinetobacter baumannii</i> (Brisou and Prevot 1954)

Microbiológicamente, las bacterias de este género se caracterizan por ser no móviles; negativas a Gram, oxidasa, nitrato e indol; positivas a catalasa, y estrictamente aerobias. No presentan pigmentación, con óptimos de crecimiento a temperaturas de entre 33° y 37° C (Vallenet et al. 2008) y en ambientes con pH y niveles de nutrientes variables. Son microorganismos altamente adaptados a vivir en ambientes diversos, tanto naturales como antropogénicos (Vila, Martí, and Sánchez-Céspedes 2007). Aunque prevalecen en ambientes naturales, como suelos, ríos, océanos (Kostka et al. 2011; Mahjoubi et al. 2013), sedimentos en manglares, sedimentos marinos en la Antártida, ambientes vírgenes (Kuhn, Bellicanta, and Pellizari 2009; Rocha et al. 2013), han sido recuperados también de aguas negras, lodos activados (Doughari et al. 2011) y sitios contaminados por hidrocarburos (Kostka et al. 2011; Mahjoubi et al. 2013). Esta diversidad ecológica también es indicativa de su diversidad genética, lo cual implica un reto para su correcta clasificación. Este género incluye tanto especies patógenas como no patógenas (de Berardinis et al. 2009).

Hasta ahora no ha sido posible delimitar adecuadamente las especies conforman el género. Es por ello que se han propuesto técnicas moleculares de identificación, que, con el paso del tiempo, han mejorado considerablemente el proceso. Entre estas técnicas destacan la secuenciación de genes individuales (16S rRNA, *rpoB*, *gyrB*); la hibridación DNA-DNA, y la secuenciación de genomas completos, que suministran buena información para los estudios

taxonómicos del género (Rafei et al. 2014; Jung and Park 2015) (**Anexo 10**). Actualmente, el género contiene 62 especies (validadas y no validadas – <http://www.bacterio.net/acinetobacter.html> 2018).

A pesar de los esfuerzos realizados y del uso de técnicas de frontera, sigue habiendo problemas para delimitar las especies. Un ejemplo de esto es lo que sucede con el complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (Acb), que consiste en cinco especies patogénicas (*A. baumannii*, *A. nosocomialis*, *A. pittii*, *A. seifertii* y *A. dijkschoorniae*) y una especie no patogénica (*A. calcoaceticus*) (Bouvet and Grimont 1986; Nemeč et al. 2010; Cosgaya et al. 2016; Gerner-Smidt, Tjernberg, and Ursing 1991). La escasa habilidad para distinguir las especies del complejo y para determinar su reservorio impide analizar con especificidad la susceptibilidad de las cepas. Esto redundaría en un tratamiento incorrecto de los pacientes infectados. Además, existe un sesgo fuerte en la información, ya que los cinco miembros del complejo suelen identificarse como *A. baumannii*, es decir, se utiliza la designación *A. baumannii* para todos (Harding, Hennon, and Feldman 2018). Por todo esto, se encuentran secuencias mal clasificadas en los repositorios genómicos. El problema con una mala clasificación es que se hereda a futuras publicaciones y, por lo tanto, será difícil identificar con certeza la especie de la cual se habla. Por otro lado, solo con la correcta delimitación de especies podremos aprovechar las cepas del género en procesos de biorremediación o como blanco para el uso de nuevos fármacos (Tacconelli et al. 2017).

Acinetobacter spp. incluye especies que suelen aislarse de infecciones nosocomiales (Peleg, Seifert, and Paterson 2008), cuya prevalencia se ha reportado entre el 30% y el 70%. La más importante en clínica es *Acinetobacter baumannii* (Houang et al. 2001).

A. baumannii es un cocobacilo (Med et al. 1999) no fermentativo, comúnmente encontrado en agua y suelo. *A. baumannii* es famosa por su persistencia ambiental: puede sobrevivir hasta por cinco meses en superficies inanimadas (Kramer, Schwebke, and Kampf 2006). Se ha identificado que es más resistente a condiciones secas, pues ensancha su espacio periplásmico y por consiguiente, engruesa su pared celular (Houang et al. 2001). Es la especie con mayor prevalencia en infecciones hospitalarias, debido principalmente a su multirresistencia a los antimicrobianos. La Organización Mundial de la Salud colocó a *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos en la posición número uno (prioridad crítica) de los patógenos que se deben estudiar prioritariamente y para los cuales se necesitan urgentemente nuevos fármacos (WHO, 2017). *A. baumannii* tiene, además, un lugar entre los microorganismos patogénicos más peligrosos agrupados por la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América (IDSA) como

patógenos ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp.*) (Pendleton, Gorman, and Gilmore 2013; Rice 2008; Bush and Jacoby 2010). Estas bacterias son las causantes más comunes de infecciones nosocomiales, que amenazan la vida de enfermos críticos y de individuos inmunocomprometidos (Rice 2008). Son capaces de eludir la acción biocida de los antibióticos y colectivamente representan nuevos paradigmas en cuanto a patogénesis, transmisión y resistencia. El estudio de los ESKAPE es esencial para el trabajo en la investigación sobre quimioterapia antimicrobiana (Rice 2008).

A. baumannii tiene la tasa de mortalidad e incidencia más alta de todas las especies bacterianas como agente de infecciones nosocomiales oportunistas (Clark, Zhanel, and Lynch 2016). *A. baumannii* tiene una prevalencia superior al 75% en África, Asia y América Latina y alcanza el 90% en algunas partes de Europa y el Medio Oriente. Esta discrepancia apunta muy probablemente a la falta de estudios en los países en vías de desarrollo.

A. baumannii es un patógeno oportunista, que se puede encontrar en unidades de cuidados intensivos y salas de cirugía donde el uso intensivo de antibióticos ha promovido la selección de resistencia contra los antimicrobianos (Vila, Martí, and Sánchez-Céspedes 2007; Med et al. 1999). Puede ocasionar septicemia, neumonía e incluso la muerte (J. M. Cisneros et al. 1996; José M. Cisneros et al. 2005; McQueary et al. 2012). Se ha aislado en hospitales alrededor del mundo (Tognim et al. 2004; Lolans et al. 2006; Perez et al. 2007), así como en soldados estadounidenses y canadiense heridos en Iraq (Yun et al. 2006; Schafer et al. 2007; Scott et al. 2007) y Afganistán (Tien et al. 2007; Centers for Disease Control and Prevention 2004).

Aunque la mayoría de las infecciones nosocomiales está asociada a *A. baumannii* (H Seifert, Schulze, and Baginski 1994), otras especies del género también se han asociado con infecciones nosocomiales (Nemec et al. 2001). Hay un incremento en reportes de infecciones comunitarias y nosocomiales causadas por especies de *Acinetobacter no-baumannii* (Espinal, Roca, and Vila 2011). Ello se debe al desarrollo y uso de nuevas tecnologías para la identificación basadas en secuencias moleculares. No obstante, aún hay deficiencias para delimitar las especies del género.

Entre las especies *no-baumannii* aisladas en la clínica, se han reportado las siguientes: *Acinetobacter haemolyticus*, que es un agente causal de la endocarditis (Castellanos M.E et al. 1995); *A. johnsonii*, que está asociada con infecciones del torrente sanguíneo relacionado con el uso del catéter (H Seifert, Schulze, and Baginski 1994); *A. pittii*, *A. nosocomialis* (Fitzpatrick,

Ozer, and Hauser 2016) (Karah et al. 2011; Kouyama et al. 2012) y *A. calcoaceticus*, que se han asociado a varios casos de neumonía y bacteremia (Mostachio et al. 2012). También se han encontrado otras especies como *A. Iwoffi* y *A. junii* asociadas a este tipo de infecciones (Rathinavelu, Zavros, and Merchant 2003; Karah et al. 2011).

La multirresistencia a los antibióticos que caracteriza a todo el género *Acinetobacter* se debe principalmente a la interacción de sus tres componentes: impermeabilidad de la membrana, expresión de bombas de eflujo y expresión de enzimas. Los antibióticos carbapenémicos son la opción de última elección para tratar infecciones causadas por bacterias multirresistentes como estas.

Una de las características clave de *A. baumannii* es su pangenoma abierto, que contiene una variedad de elementos genéticos móviles, entre los que destacan los integrones y los transposones (ubicados en islas genómicas, algunas de las cuales se conocen como islas de resistencia debido a la presencia de múltiples genes de resistencia) y los plásmidos (Figueiredo et al. 2012). El mecanismo de multirresistencia antimicrobiana está asociado con estos elementos. (Fournier et al. 2006; Cooper, Tsimring, and Hasty 2017) **Anexo 11**.

Varios estudios han mostrado la alta prevalencia de integrones clase 1 entre las bacterias. El mayor número de genes de resistencia MBL adquiridos en *A. baumannii* se han encontrado en integrones clase 1, que con frecuencia contienen una variedad de casetes génicos de resistencia (Peleg, Seifert, and Paterson 2008; Potron, Poirel, and Nordmann 2015).

A pesar de los reportes existentes sobre la alta prevalencia de integrones clase 1 en *A. baumannii*, estudios realizados en países de Latino América, como Chile, Argentina y Brasil, han demostrado también una amplia distribución de integrones clase 2 en esta especie (M. Pagano et al. 2013; Fonseca et al. 2011). Se ha demostrado que los integrones clase 2 obtenidos de aislamientos en Brasil están insertados en el transposon Tn7, que tiene casetes génicos con genes *dfrA1* (resistencia a trimetoprim), *sat2* (resistencia a estreptomicina) y *aadA1* (resistencia a espectinomicina y estreptomicina) (Fonseca et al. 2011). Más de 130 casetes génicos, con genes de resistencia, se han identificado en los integrones (Fournier et al. 2006).

Pagano et al., 2015 han investigado la asociación entre los integrones clase 1 y 2 y los casetes génicos (CC109/1 y CC113/79) de los linajes clonales de *A. baumannii*. Estos autores han planteado la hipótesis de que la cantidad elevada de integrones clase 2 predominantes en América Latina se debe a la alta prevalencia del clon tipo CC113/79. En este mismo estudio, una prevalencia similar se observó en *A. nosocomialis* (Mariana Pagano, Martins, and Barth 2016).

Los genes de resistencia también se transmiten a través de plásmidos. En *A. baumannii*, el tamaño de los plásmidos oscila entre 2 kb y 100 kb (Hamidian, Ambrose, and Hall 2016; Gallagher et al. 2015). Los plásmidos grandes de *A. baumannii* son a menudo el foco de análisis, principalmente debido a la presencia de múltiples genes de resistencia a antibióticos y a su naturaleza autotransmisible (Hamidian and Hall 2014; Dougan et al. 2016; Hamidian, Ambrose, and Hall 2016).

Resulta sorprendente que, a pesar de la importancia de los plásmidos en la transmisión potencial de genes de resistencia y virulencia en *A. baumannii*, se ha realizado muy poco trabajo experimental sobre la biología básica de estos plásmidos. Hasta ahora, los plásmidos en *A. baumannii* se han clasificado en 19 grupos homólogos (GR1-GR19) y hay un solo esquema de tipificación de acuerdo con sus proteínas replicasas (Rep) (Bertini et al. 2010).

En los últimos años, ha incrementado notablemente la cantidad y diversidad taxonómica de genomas completos secuenciados, así como de genomas draft del género (Touchon et al. 2014a) (Nasser et al. 2018). Ello proporciona datos sobre la resistencia, la virulencia y la filogenética, además de información útil de tipificación para la investigación de brotes (ECDC 2016).

Los estudios genómicos han mostrado que el género *Acinetobacter* están asociados con un pangenoma abierto muy grande. Esto se debe a la transferencia y adquisición de elementos genéticos móviles. También existen procesos de recombinación homóloga del genoma completo (ECDC, 2016).

Al igual que en otros géneros bacterianos, *Acinetobacter* tiene un pangenoma con una gran cantidad de genes cuya función desconocemos. En el caso de *A. baumannii*, se ha reportado que un poco más de un tercio del pangenoma (40%) es específico para cada cepa, lo cual confirma que la especie tiene un pangenoma grande (Touchon et al. 2014a).

Con respecto al genoma *core* de *Acinetobacter*, se han identificado una gran cantidad de factores de virulencia (Antunes et al. 2011). Además, se ha descrito que el genoma *core* contiene 950 familias de proteínas ortólogas y, al menos, 1,590 proteínas ortólogas que corresponden al 44% del tamaño del proteoma más pequeño de la especie (Touchon et al. 2014a).

En la última década, los investigadores que se dedican al estudio de *Acinetobacter* se han enfocado en secuenciar genomas completos y genomas *draft* de cepas del complejo *Acinetobacter-baumannii-calcoaceticus*, predominantemente hospitalarias y provenientes de la

misma región. Son pocos los estudios que abarcan otras especies del género, lo cual ha tenido como resultado que los esquemas de MLST del género *Acinetobacter* estén limitados en cuanto a las cepas y su origen. Aunque se ha informado que las cepas de brotes particulares están geográficamente extendidas, se sabe poco sobre la diversidad, la relación filogenética y los grupos clonales de los microorganismos de este género, incluida *A. baumannii* que es la más estudiada.

Para entender la emergencia evolutiva de patógenos en el género *Acinetobacter*, es importante conocer bien su filogenia. Por lo tanto, el objetivo principal de este capítulo fue diseñar e implementar un esquema de análisis multilocus (MLSA, por sus siglas en inglés) a nivel de género. Esto fue posible gracias a la aportación de investigadores franceses (Touchon et al. 2014a), quienes secuenciaron 120 genomas de alta calidad de cepas de referencia de *Acinetobacter*. Estas se seleccionaron según su prevalencia, su genotipo y fenotipo, así como su origen (ambiental o clínico). Por lo tanto, este estudio tiene el conjunto más completo y diverso de genomas de alta calidad del género.

Nosotros aprovechamos estos datos para generar un MLSA a nivel de género, ya que hasta el momento existía un esquema de MLST solo para la especie *A. baumannii*. Nuestro MLSA se implementó con éxito en un grupo de 37 cepas provenientes de aislamientos ambientales recuperados de columna de agua y sedimentos de ríos de Morelos con nivel de contaminación contrastante. Esta colección es de sumo interés debido a la escasa información disponible sobre aislamientos de *Acinetobacter* de ambientes naturales.

3.2 Objetivos

- I. Desarrollar e implementar un esquema de MLSA a nivel de género para *Acinetobacter*
- II. Analizar si existen asociaciones significativas entre los linajes, los fenotipos de resistencia y los niveles de contaminación
- III. Llevar a cabo un análisis genómico para identificar determinantes de resistencia a antibióticos y de virulencia
- IV. Visualizar el perfil de plásmidos del género *Acinetobacter*

3.3 Métodos

3.3.1 Desarrollo e implementación de un esquema de MSLA

Para desarrollar el esquema de análisis de secuencias multilocus (MLSA) se identificaron genes ortólogos del genoma *core* de todas las secuencias de los genomas de alta calidad de las cepas de referencia de origen ambiental y clínico (Touchon et al. 2014a) mediante el paquete GET_HOMOLOGUES (Contreras-Moreira and Vinuesa 2013). Utilizando el servidor Primers4clades (Contreras-Moreira et al. 2009), se eligieron y diseñaron oligonucleótidos degenerados con base en los alineamientos múltiples de las secuencias de los siguientes genes: *atpD*, *fusA*, *gyrB*, *infB*, *recA* y *rpoB* de distribución universal en proteobacterias (Figura 15) (Vinuesa et al., 2010). Primers4clades es una herramienta para el diseño de oligonucleótidos degenerados derivados de motivos conservados de secuencias de alineamientos múltiples de proteínas usando el algoritmo CODEHOP (Consensus Degenerate Hybrid Oligonucleotide Primer). El servidor fue alimentado con las secuencias no redundantes (cd-hit 95%) de los loci *atpD*, *fusA*, *gyrB*, *infB*, *recA* y *rpoB*. El servidor nos mostró un conjunto no redundante de formulaciones de pares de oligonucleótidos clasificados de acuerdo a sus propiedades termodinámicas. El servidor revisa que los amplicones no se superpongan más del 80% (Figura 15) indicando, además la degeneración de los oligonucleótidos y el nivel de resolución filogenético para cada amplicon. De estos datos se seleccionaron los oligonucleótidos con atributos óptimos (*quality* = 100%).

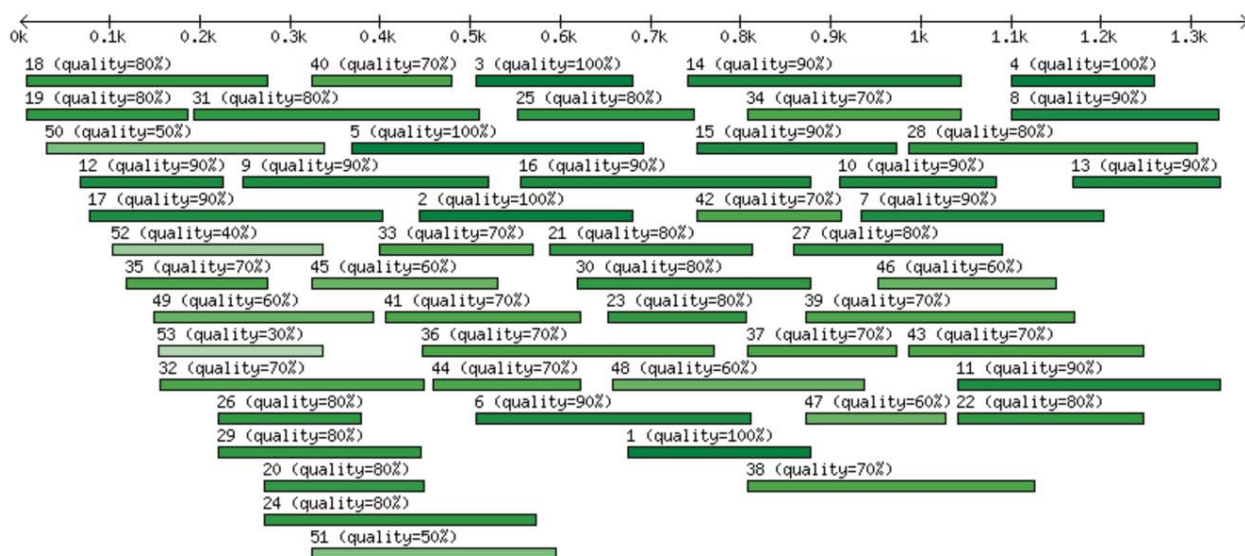


Figura 15. Mapa de distribución de los amplicones del gen *rpoB* del género *Acinetobacter*

Los valores fueron calculados con base a las propiedades termodinámicas del par de oligonucleótidos. El gradiente de color verde indica la calidad del oligonucleótido (entre más intenso el color el porcentaje es mayor).

3.4 Resultados

3.4.1 Propuesta de un nuevo esquema de MLSA a nivel de género para *Acinetobacter* y formulación de los oligonucleótidos

Se analizaron las distribuciones de longitud de rama y soporte de biparticiones de los árboles de máxima verosimilitud inferidos para cada amplicon. Ello reveló que los seis amplicones generan árboles con un buen soporte de rama y solo la filogenia de *gyrB* produce algunas ramas muy largas, como revela el test kde (Tabla 9, Figura 16 y 17).

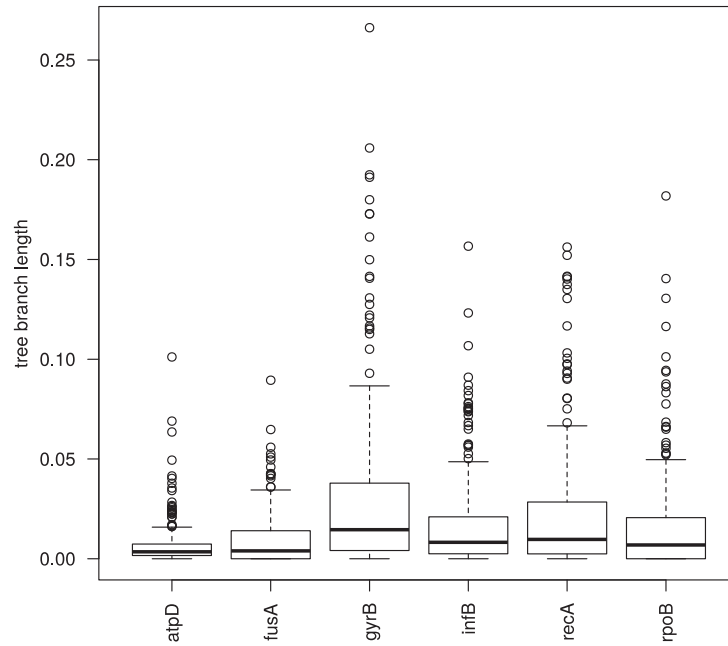


Figura 16. Distribución de longitud de rama de los seis oligonucleótidos seleccionados
SH-like support values

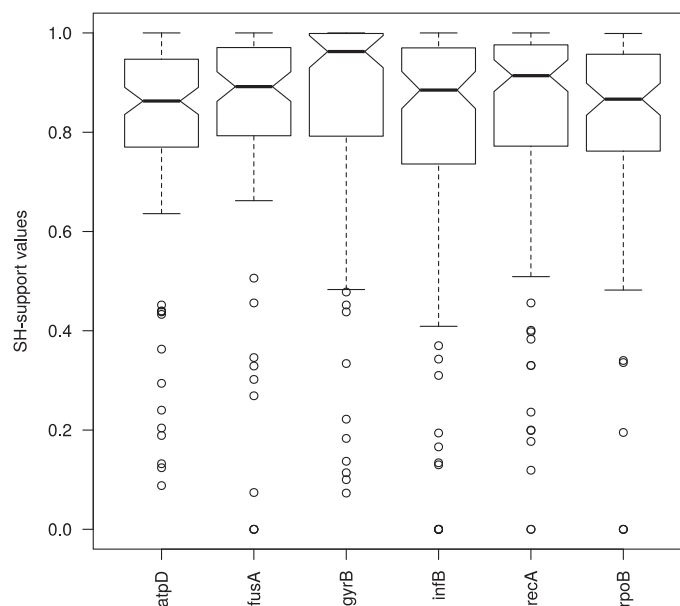


Figura 17. Valores de soporte de ramas para los seis oligonucleótidos propuestos en nuestro esquema

Tabla 9. Valores de kde obtenidos para los genes propuestos en nuestro esquema de MLST

Gen	kde topología	kde longitud de rama
<i>atpD</i>	NS	0.057703881
<i>fusA</i>	NS	0.058270213
<i>gyrB</i>	NS	0.044970234*
<i>infB</i>	NS	0.058145861
<i>recA</i>	NS	0.065666232
<i>rpoB</i>	NS	0.094711583

NS = no significativo *Valor significativo

3.4.2 Diversidad genética de *Acinetobacter* analizado con el nuevo esquema de MLSA: Identificación de nueve especies y tres posibles nuevas especies recuperadas de ríos de Morelos

Se recuperaron 37 aislamientos del género *Acinetobacter*, identificados inicialmente como tales en base a secuencias parciales del gen 16S rRNA. Estas cepas fueron sometidas a MLSA, con el nuevo esquema aquí desarrollado, pudiéndose identificar nueve especies conocidas (**Anexo 9**) y tres posibles especies nuevas, con base en la filogenia de máxima verosimilitud (ML) y las cepas de referencia ya mencionadas (Touchon et al. 2014a) sumando un total de 122 secuencias: *A. tandoii*, *A. schindleri*, *A. johnsonii*, *A. bereziniae*, *A. soli*, *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. oleivorans*, *A. junii*, *A. beijerinckii*, *A. sp1*, *A. sp2*, *A. sp3*. (**Figura 18**). La filogenia multilocus de especies que estimamos resultó ser altamente congruente con la filogenia genómica realizada por los investigadores franceses (Touchon et al. 2014a) y con la filogenia genómica que realizamos (**Figura 25**).

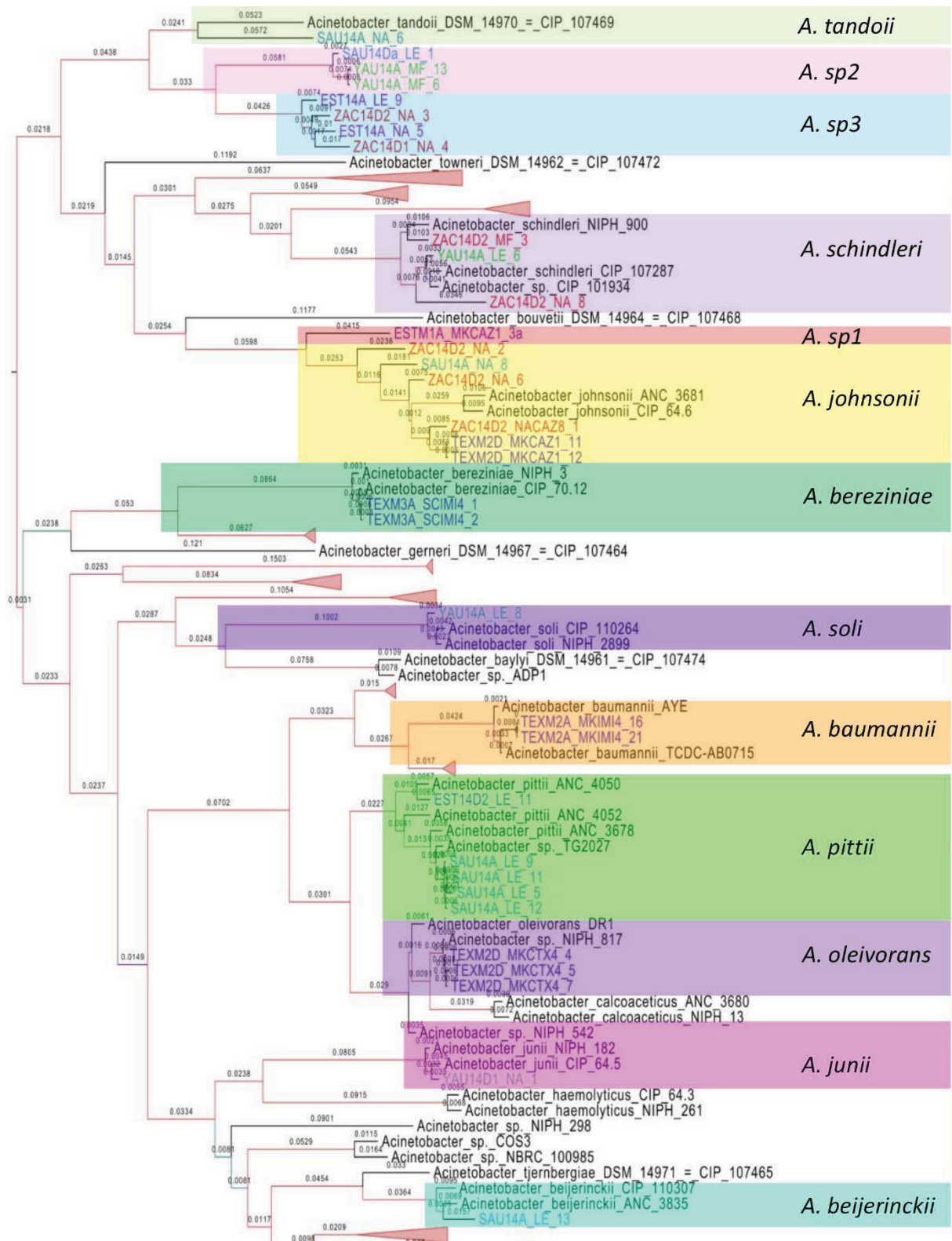


Figura 18. Filogenia de Máxima Verosimilitud (ML) con seis genes de MLSA diseñado para el género *Acinetobacter*
 La filogenia muestra el desglose taxonómico de nuestros aislamientos (n=37) y 85 cepas de referencia de (Touchon et al. 2014b).

3.4.3 Asociación entre *Acinetobacter* y el hábitat de aislamiento

Para determinar la asociación entre cada especie de *Acinetobacter* y su hábitat de aislamiento, se llevó a cabo un análisis de χ^2 multivía (**Figura 19**), partiendo del supuesto (hipótesis nula) de que la prevalencia de *Acinetobacter spp.* es independiente del hábitat de aislamiento (columna de agua o sedimento) y del nivel de contaminación (bajo, intermedio o alto). El valor de p resultó ser $2.26 \cdot 10^{-3}$, rechazando por tanto la hipótesis nula de no asociación de las especies con el hábitat y el nivel de contaminación. El análisis mostró que *A. johnsonii* y *A. oleivorans* están significativamente asociadas con sedimentos altamente contaminados; *A. pittii*, con columna de agua de sitios levemente contaminados y *A. schindleri*, con columna de agua medianamente contaminada. Cabe señalar que el número de individuos por especie fue bajo y, por lo tanto, se trata de un análisis preliminar.

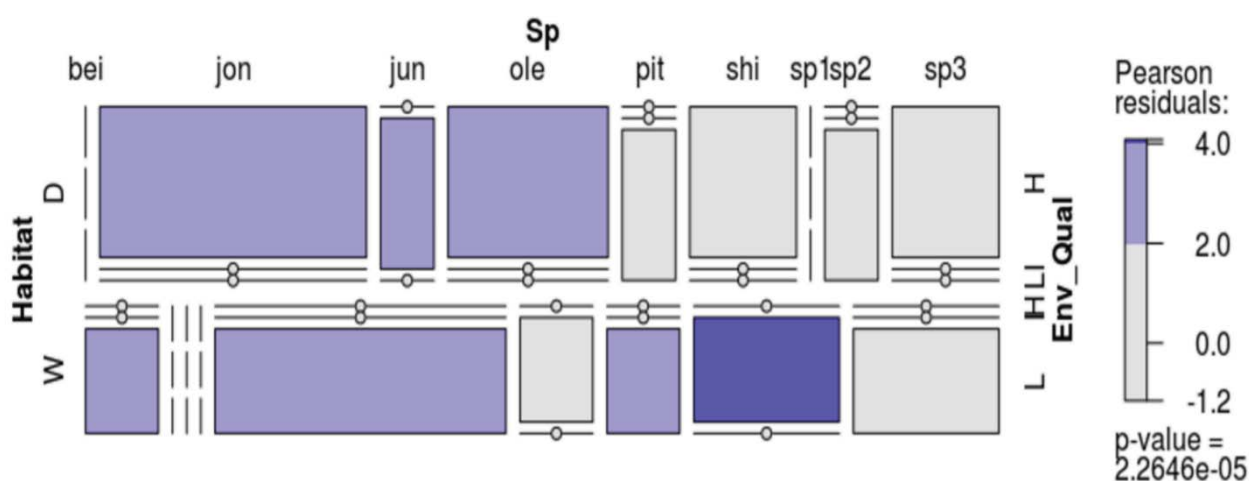


Figura 19. Gráfico de asociación de tres vías muestra los resultados del análisis χ^2 de las especies de *Acinetobacter* con respecto al hábitat y la calidad ambiental del sitio de donde fueron aisladas. Hábitat (W=columna de agua, D= sedimentos); Nivel de contaminación (Env_Qual) (H=alto; L=bajo; I=Intermedio basados en el recuento de coliformes termotolerantes y *E. coli*, como se define en la Tabla 1). La barra de la gráfica representa los residuos de Pearson, el código de color y la altura de las barras indican el nivel de significancia y la magnitud de los residuos, el ancho muestra la proporción del tamaño de muestra.

3.4.4 Resistencia de *Acinetobacter* a antimicrobianos: *A. baumannii* y *A. bereziniae* son panresistentes

Se observó que los aislamientos correspondientes a las especies *A. oleivorans*, *A. schindleri* y *A. pittii* son susceptibles a la mayoría de los antimicrobianos probados. En contraste, las especies de *A. tandoii*, *A. soli*, *A. johnsonii*, *A. sp1*, *A. sp2* y *A. sp3* son multirresistentes, mientras que *A. baumannii* y *A. bereziniae* son panresistentes. Estas resistencias se pueden observar en la **Figura 4**.

Además, se realizó un tamizado fenotípico para identificar la presencia de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y de metalo- β -lactamasas (MBL), así como para hacer asociaciones de fenotipo-genotipo. Se identificó que *A. schindleri*, *A. johnsonii*, *A. bereziniae* y *A. sp3* expresan BLEE (Figura 20).

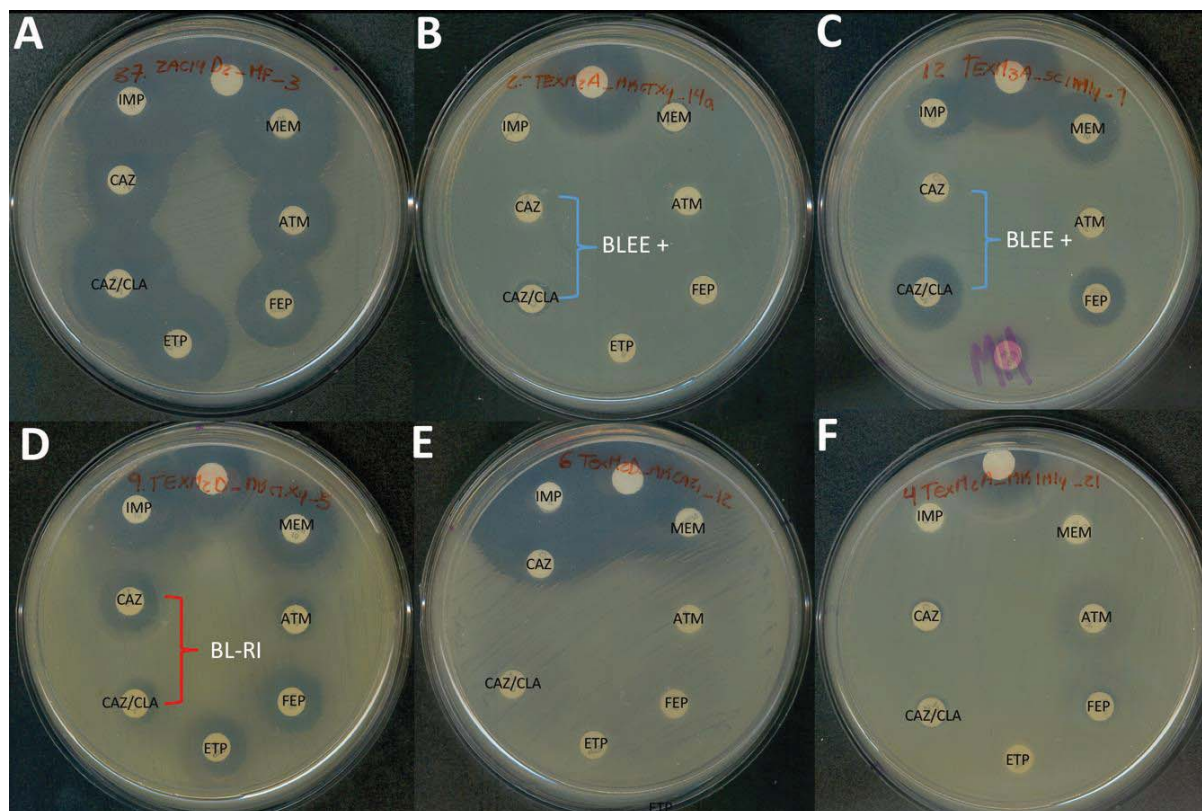


Figura 20. Diversidad de los fenotipos de susceptibilidad, resistencia y expresión de β -lactamasas detectadas entre los aislamientos de *Acinetobacter* (A-F) ambientales mexicanos

IMI: Imipenem, CAZ: Ceftazidima, CAZ/CLA: Ceftazidima-ácido clavulánico, ETP: Ertapenem, FEP: Cefepime, ATM: Aztreonam, MEM: Meropenem **A)** Se muestra una cepa de *A. schindleri* susceptible a todos los antibióticos probados en el ensayo **B)** La imagen muestra a *Acinetobacter* sp. expresando una β -lactamasa **C)** *A. bereziniae* expresando una β -lactamasa **D)** *A. oleivorans* expresa una β -lactamasa resistente a inhibidores **E)** *A. johnsonii* muestra resistencia a cefalosporinas (CAZ: Ceftazidima, FEP: Cefepime) y carbapenémicos (ETP: Ertapenem y MEM: Meropenem) y susceptibilidad a Imipenem (IMP) **F)** *A. baumannii* expresa resistencias a todos los antibióticos probados en el ensayo.

Para confirmar esto a nivel de genotipo, se llevó a cabo una amplificación por PCR de los genes de las familias más comunes de BLEE y MBL (*bla*_{KPC}, *bla*_{GES}, *bla*_{CTX}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{NDM} y *bla*_{VIM}) usando los primers descritos en el (Anexo 13). Sin embargo, no se identificaron amplicones en ninguna de las especies. Este dato sugiere que nuestros aislamientos con fenotipo positivo a BLEE, pueden corresponder a una variante nueva o poco usual.

3.4.5 Filogenia genómica y análisis genómico de 14 cepas ambientales mexicanas de *Acinetobacter*

Adicionalmente, se llevó a cabo un análisis genómico y filogenia genómica de 14 cepas de nuestra colección (**Figura 21, 26, Tabla 10 y 11**), abarcando 10 especies, que amplió y confirmó la información obtenida mediante los métodos anteriores. Por un lado, se identificó un gran número de genes relacionados con bombas de eflujo, lo que significa que nuestras cepas tienen más de un mecanismo de resistencia. Por otro lado, confirmamos que no hay una familia de BLEE o MBL conocida que coincida con el fenotipo encontrado en las cepas de TEXM2A_MKCTX4_14a, SAU14A_NA_8, TEXM3A_SCIMI4_1. Estas dos últimas cepas corresponden a *A. bereziniae*. Estos datos nos sugieren que estamos ante una BLEE nueva, de baja prevalencia o modificada.

La filogenia genómica de las 14 cepas de *Acinetobacter* ambientales es consistente con nuestra filogenia realizada a partir del esquema de MSLA aquí propuesto (**Figura 18**) y con la de (Touchon et al., 2014^a). Nuestra filogenia (**Figura 21 y 22**) muestra implicaciones taxonómicas relevantes y especies mal clasificadas del género. La implicación más relevante es que el complejo Acb de *Acinetobacter* propuesto por varios autores (Bouvet and Grimont 1986; Nemeč et al. 2010; Cosgaya et al. 2016; Gerner-Smidt, Tjernberg, and Ursing 1991), no solo contiene 5 especies. El complejo también contiene a *A. oleivorans* y *A. lactucae*. En la filogenia también se puede observar que las geno-especies 2 y 3 corresponden a lo que denominamos complejo *A. tandoii*.

Tabla 10. Características de las secuencias de genomas de cepas ambientales del género *Acinetobacter*

Espece	Estado Genoma	Tecnología secuencia	Num contigs	Num Plámidos	Nt Genoma	rRNA genes	tRNA	tmRNA	Genes	CDS	Sign pep	CRISPR
<i>A. baumannii</i> TEXM2A_MKIMI4_16	Completo	MiSeq+MinION	3	2	4166409	18	75	1	4087	3993	322	none
<i>A. beijerinckii</i> SAU14A_LE_13	Completo	MiSeq+MinION	1	0	3449386	19	74	1	3274	3180	308	2
<i>A. bereziniae</i> TEXM3A_SCIMI4_2	Completo	MiSeq+MinION	4	1	4989262	21	80	1	4805	4703	520	4
<i>A. genosp2</i> SAU14Da_LE_1	Completo	MiSeq+MinION	1	0	3536848	21	81	1	3366	3263	310	none
<i>A. genosp3</i> EST14A_LE_9	gapped_chr	MiSeq	2	0	3683970	5	66	1	3499	3427	330	none
<i>A. genosp3</i> ZAC14D2_NA_3	Completo	MiSeq	4	3	3789052	21	80	1	3766	3664	331	none
<i>A. johnsonii</i> TEXM2D_MKCAZ1_11	gapped_chr	MiSeq	4	0	3403478	3	77	1	3339	3258	310	none
<i>A. johnsonii</i> ZAC14D2_NA_2	Completo_nonCirc	MiSeq+MinION	6	5	3646670	21	85	1	3621	3514	292	none
<i>A. juni</i> YAU14D1_NA_1	Completo	MiSeq+MinION	4	3	3358694	18	74	1	3155	3062	307	2
<i>A. oleivorans</i> TEXM2D_MKCTX4_5	Completo	MiSeq+MinION	2	1	3956642	18	73	1	3740	3648	353	none
<i>A. lactucae</i> EST14D2_LE_11	gapped_chr	MiSeq	1	0	3893979	5	63	1	3644	3575	328	2
<i>A. pittii</i> SAU14A_LE_11	Completo	MiSeq+MinION	4	3	3963425	18	73	1	3932	3840	328	none
<i>A. schindleri</i> ZAC14D2_MF_3	gapped_chr	MiSeq	9	4	3213851	5	73	1	3110	3031	251	none
<i>A. schindleri</i> ZAC14D2_NA_8	Completo	MiSeq+MinION	3	2	3365928	21	86	1	3250	3142	288	none

Gapped_chr: cromosoma con gaps. Nt genoma: tamaño del genoma en nucleótidos, CDS: secuencias codificantes, Sign pep: péptidos señal.

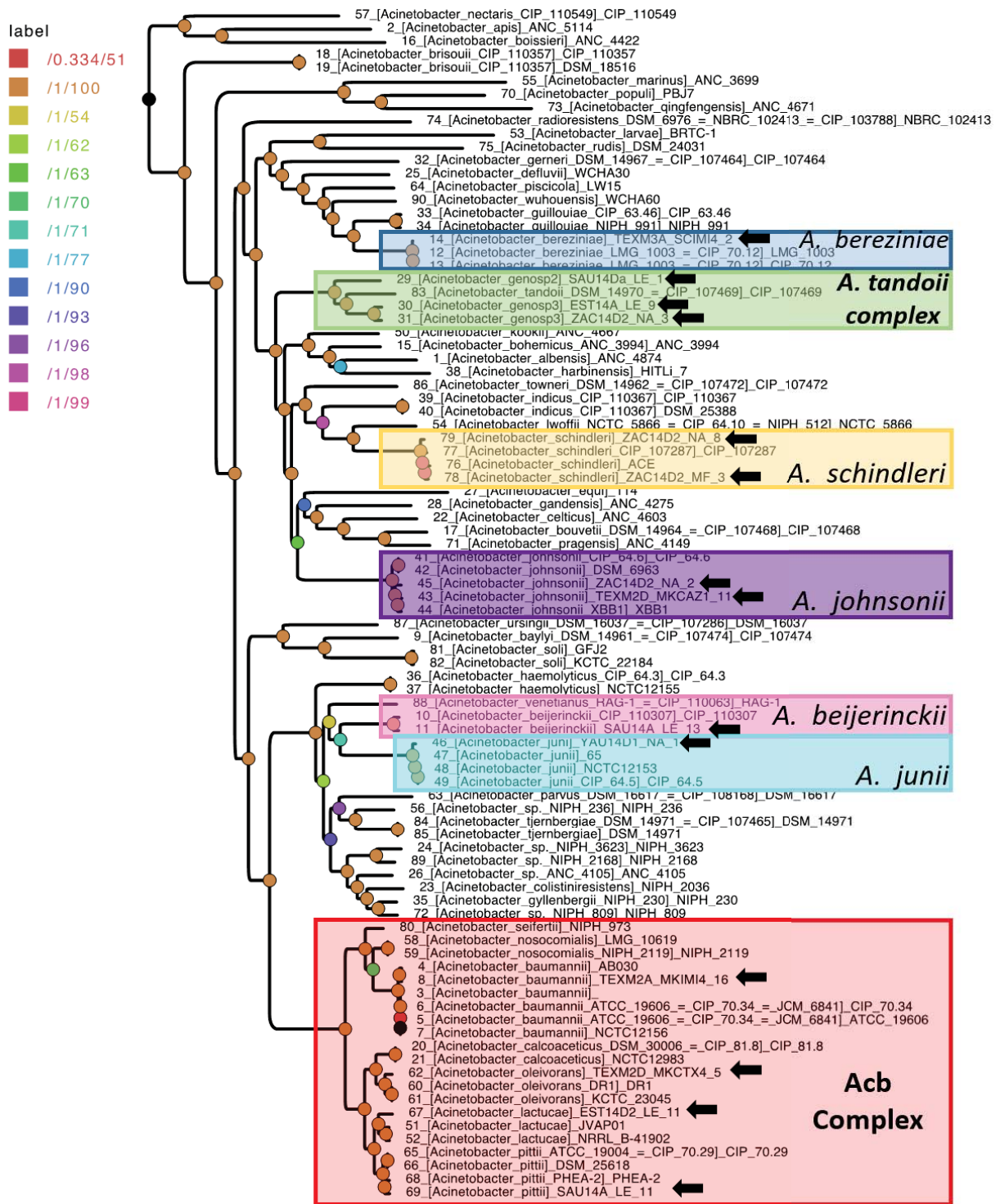


Figura 21. Filogenia de máxima verosimilitud del genoma core del género *Acinetobacter* a partir de la supermatriz obtenida por la concatenación de 834 alineamientos seleccionados con GET_PHYLOMARKERS

Los círculos de colores al inicio de las ramas denotan el nivel de soporte de las mismas (probabilidad posterior bayesiana/Bootstrap). Las flechas negras indican nuestras cepas. Los rectángulos de diferentes colores indican los clados donde se encuentran las especies de nuestra colección. La filogenia fue enraizada con *Acinetobacter nectaris*.

3.4.6 Elementos genéticos móviles en *Acinetobacter*

Se determinaron los perfiles de los plásmidos de las cepas encontradas. Se observó que las cepas *A. sp2* y *A. sp3* no contienen plásmidos, mientras que algunas especies, como *A. pittii*, contienen dos plásmidos. Por otro lado, las especies que presentan la mayor cantidad de plásmidos (de 5 a 8) son *A. schindleri* y *A. johnsonii*. Cabe señalar que el número de plásmidos fue significativamente mayor en los aislamientos recuperados de sitios contaminados (**Figura 22**). También se identificaron tres cepas con integrones: una mediante amplificación del gen *IntI1* (TEXM2A_MKCTX4_14a) y dos mediante amplificación de la región 5'-3' con los oligonucleótidos de (**Anexo 13**) (*A. bereziniae* TEXM3A_SCIMI4_2, y *A. baumannii* TEXM2A_MKIMI4_16). Mediante análisis genómicos se confirmó la presencia de integrón en dos de las cepas (*A. bereziniae* TEXM3A_SCIMI4_2, y *A. baumannii* TEXM2A_MKIMI4_16) (**Figuras 23 y 24**). El integrón de *A. baumannii* TEXM2A_MKIMI4_16 contiene los genes de resistencia *rmtB* (aminoglucósidos), *folP-2* (sulfonamidas), *antI1* (estreptomicina), *cat-2* (cloranfenicol), *aacA4* (aminoglucósidos), *neo-2* (neomicina), *emrE* (aminoglucósidos) (**Figura 23**). El integrón de *A. bereziniae* TEXM3A_SCIMI4_2 contiene los genes de resistencia *folP-2* (sulfonamidas), *antI1* (estreptomicina), *ccrA* gen que codifica una metalo- β -lactamasa (cefalosporinas y carbapenémicos), *emrE-2* (aminoglucósidos) precedidos por el gen de la integrasa de tipo 1 (**Figura 24**).

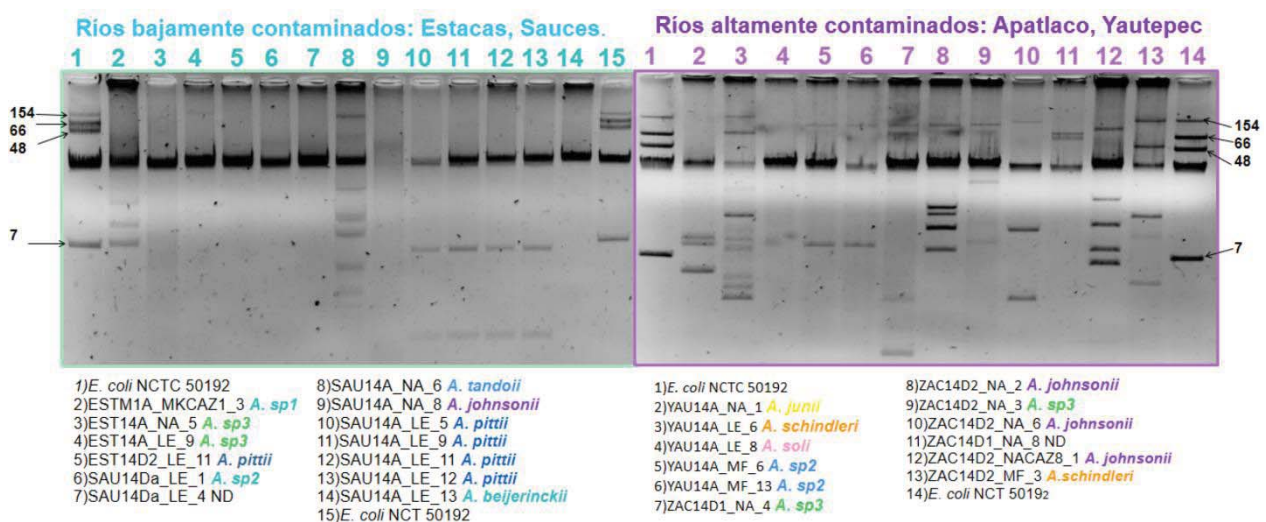


Figura 22. Perfil de plásmidos de aislamientos ambientales de especies pertenecientes al género *Acinetobacter* mediante la técnica (Kieser et al., 1984)

La foto del gel de electroforesis (izquierda) muestra los perfiles de plásmidos de cepas provenientes de sitios limpios. En el gel (derecho), los aislamientos pertenecen a muestras provenientes de ríos alta e intermedicamente contaminados. Como un referente del peso molecular se utilizó a la cepa *E. coli* NCTC 50192 que contiene cuatro plásmidos que van de 7 a 154Kb.

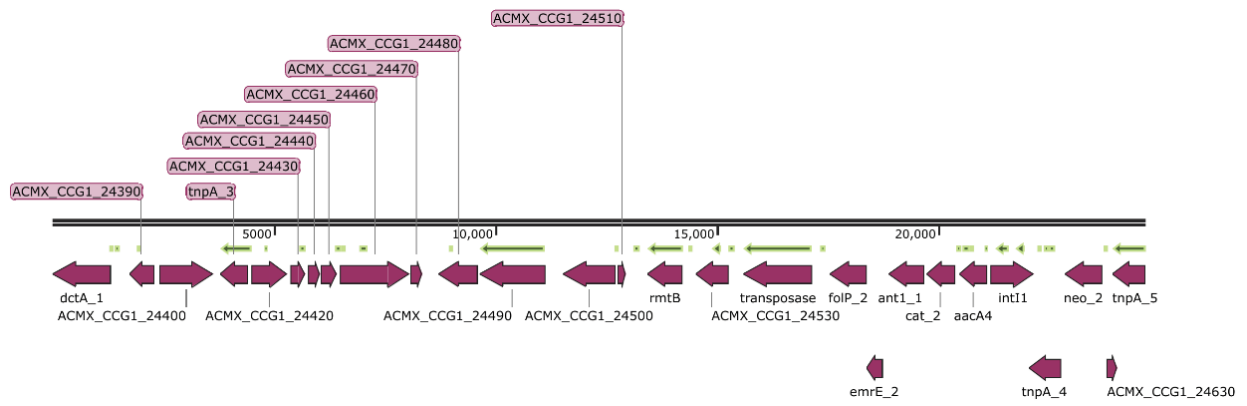


Figura 23. Integrón de clase I de *Acinetobacter_baumannii*_TEXM2A_MKIMI4_16

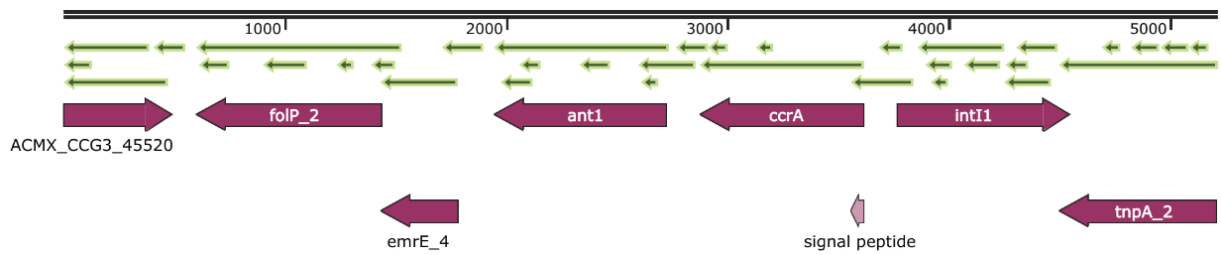


Figura 24. Integrón de clase I de *Acinetobacter_bereziniae*_TEXM3A_SCIMI4_2

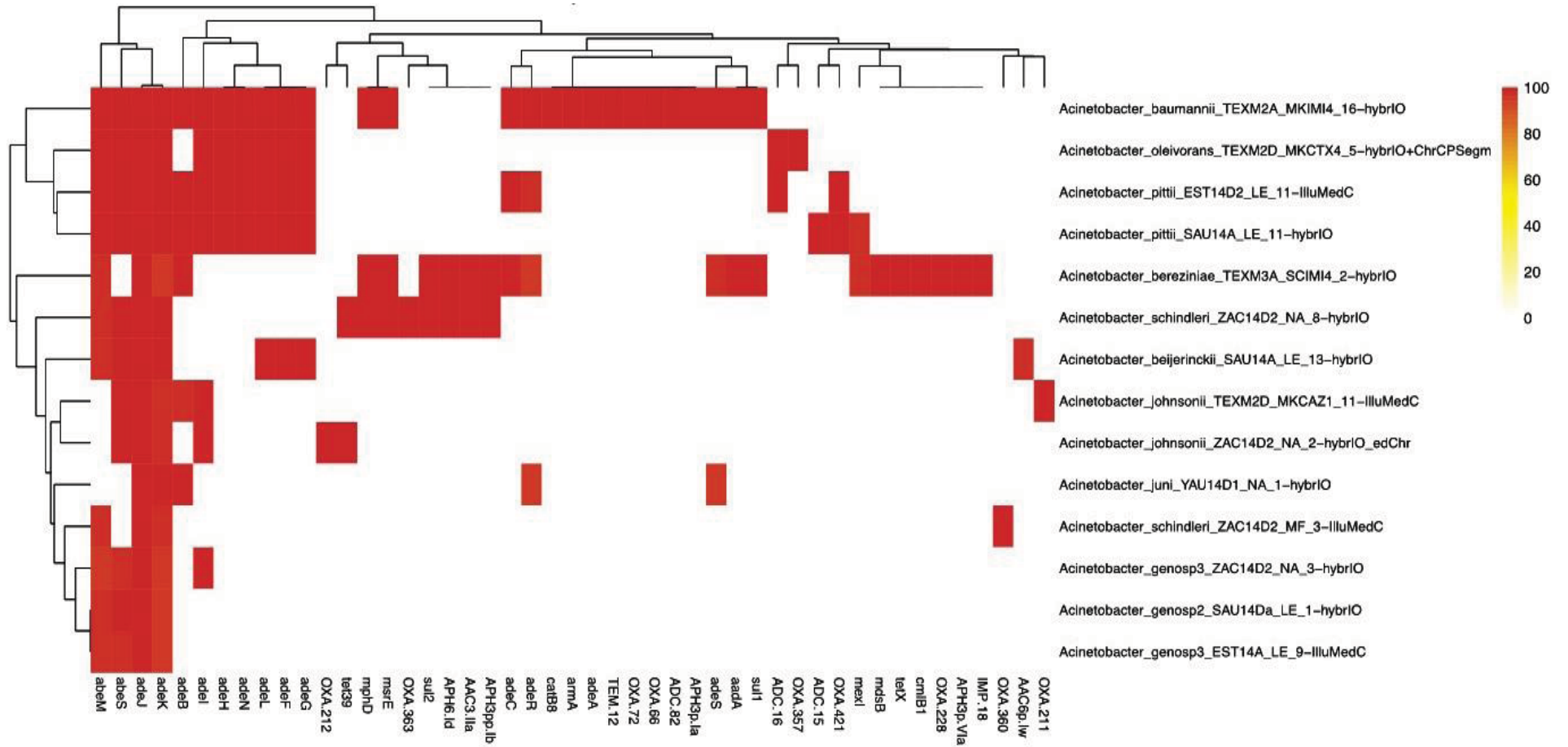


Figura 25. Genes de resistencia a antibióticos identificados en aislamientos ambientales mexicanos del género *Acinetobacter* contra la base de datos CARD. Los cuadros rojos indican la presencia de algún gen de resistencia a antibióticos.

Tabla 11. Funciones y mecanismos de acción identificados en genes de resistencia a antibióticos de nuestros aislamientos ambientales mexicanos de *Acinetobacter* que cuentan con secuencia de su genoma completo (n=14)

Especie	Gen	Función	Mecanismo de resistencia	Resistencia
<i>A. johnsonii</i> _TEXM2D_MKCAZ1_11	<i>bla-OXA211</i>	β -lactamasa	Inactivación del antibiótico	Betalactámicos
<i>A. beijerinckii</i> _SAU14A_LE_13	<i>aac6p</i>	Acetilación del antibiótico aminoglucósido en el grupo amino en la posición 6'	Inactivación del antibiótico	Aminoglucósidos
<i>A. shindleri</i> _ZAC14D2_MF_3	<i>bla-OXA360</i>	β -lactamasa	Inactivación del antibiótico	Betalactámicos
<i>A. bereziniae</i> _TEXM3A_SCIMI4_2	<i>bla-IMP18</i>	Carbapenemasa	Inactivación del antibiótico	Cefalosporinas y carbapenémicos
<i>A. bereziniae</i> _TEXM3A_SCIMI4_2	<i>aph3p.Via</i>	Aminoglucósido transferasa acetil	Alteración del sitio blanco	Aminoglucósidos
<i>A. bereziniae</i> _TEXM3A_SCIMI4_2	<i>bla-OXA228</i>	Oxacilinasas	Inactivación del antibiótico	Betalactámicos
<i>A. bereziniae</i> _TEXM3A_SCIMI4_2	<i>cmfB1</i>	Fosfotransferasa	Sistema de expulsión de tipo MFS	Macrólidos
<i>A. bereziniae</i> _TEXM3A_SCIMI4_2,	<i>tetX</i>	Monooxigenasa	Monooxigenasa dependiente de flavina	Tetraciclina
<i>A. bereziniae</i> _TEXM3A_SCIMI4_2	<i>mdsB</i>	Proteína de membrana interna	Sistema de expulsión de tipo RND (MdsABC)	Fenicol, carbapenem, cefalosporinas
<i>A. bereziniae</i> _TEXM3A_SCIMI4_2,	<i>mexI</i>	Proteína de membrana interna	Sistema de expulsión de tipo RND (MexGHI-OpmD)	Fluoroquinolonas, tetraciclinas
<i>A. pittii</i> _EST14D2_LE_11, <i>A. pittii</i> _SAU14A_LE_11	<i>bla-OXA421</i>	Oxacilinasas	Inactivación del antibiótico	Betalactámicos
<i>A. pittii</i> _SAU14A_LE_11	<i>bla-ADC15</i>	β -lactamasa	Inactivación del antibiótico	Cefalosporinas
<i>A. oleivorans</i> _TEXM2D_MKCTX4_5	<i>bla-OXA357</i>	Oxacilinasas	Inactivación del antibiótico	Betalactámicos
<i>A. oleivorans</i> _TEXM2D_MKCTX4_5, <i>A. pittii</i> _EST14D2_LE_11, <i>A. pittii</i> _SAU14A_LE_11	<i>bla-ADC16</i>	β -lactamasa	Inactivación del antibiótico	Cefalosporinas
<i>A. bereziniae</i> _TEXM3A_SCIMI4_2, <i>A. baumannii</i> _TEXM2A_MKIMI4_16	<i>sul1</i>	Dehidropteroato sintasa	Alteración del sitio blanco	Sulfonas y sulfonamidas
<i>A. bereziniae</i> _TEXM3A_SCIMI4_2, <i>A. baumannii</i> _TEXM2A_MKIMI4_16	<i>aadA</i>	Aminoglicosido nucleotidiltransferasa	Alteración del sitio blanco	Aminoglucósidos
<i>A. juni</i> _YAU14D1_NA_1, <i>A. baumannii</i> _TEXM2A_MKIMI4_16	<i>adeS</i>	Sensor quinasa	Sistema de expulsión de tipo RND (AdeABCRS)	Tetraciclina, glicilciclina
<i>A. baumannii</i> _TEXM2A_MKIMI4_16	<i>aph3p.la</i>	Aminoglucósido fosfotransferasa	Alteración del sitio blanco	Aminoglucósidos
<i>A. baumannii</i> _TEXM2A_MKIMI4_16	<i>bla-ADC82</i>	β -lactamasa	Inactivación del antibiótico	Cefalosporinas
<i>A. baumannii</i> _TEXM2A_MKIMI4_16	<i>bla-OXA66</i>	β -lactamasa	Inactivación del antibiótico	Betalactámicos
<i>A. baumannii</i> _TEXM2A_MKIMI4_16	<i>bla-OXA72</i>	β -lactamasa	Inactivación del antibiótico	Betalactámicos
<i>A. baumannii</i> _TEXM2A_MKIMI4_16	<i>bla-TEM12</i>	β -lactamasa	Inactivación del antibiótico	Cefalosporinas
<i>A. baumannii</i> _TEXM2A_MKIMI4_16	<i>adeA</i>	Proteína de fusión de membrana	Proteína de fusión de membrana	Tetraciclina, glicilciclina
<i>A. baumannii</i> _TEXM2A_MKIMI4_16	<i>armA</i>	Metiltransferasa 16S rRNA	Alteración del sitio blanco	Aminoglucósidos

Tabla 11. Funciones y mecanismos de acción identificados en genes de resistencia a antibióticos de nuestros aislamientos ambientales mexicanos de *Acinetobacter* que cuentan con secuencia de su genoma completo (n=14)

Especie	Gen	Función	Mecanismo de resistencia	Resistencia
<i>A. baumannii</i> _TEXM2A_MKIMI4_16	<i>catB8</i>	Cloranfenicol acetiltransferasa	Inactivación del antibiótico	<i>Fenicoles</i>
<i>A. baumannii</i> _TEXM2A_MKIMI4_16, <i>A. bereziniae</i> _TEXM3A_SCIMI4_2, <i>A. juni</i> _YAU14D1_NA_1, <i>A. pittii</i> _SAU14A_LE_11	<i>adeR</i>	Regulador positivo del sistema AdeABC	Subunidad del complejo de expulsión AdeABC	<i>Tetraciclina, glicilciclina</i>
<i>A. bereziniae</i> _TEXM3A_SCIMI4_2,	<i>adeC</i>	Proteína de factor de membrano externa	Sistema de expulsión de tipo RND (AdeABCRS)	<i>Tetraciclina, glicilciclina</i>
<i>A. bereziniae</i> _TEXM3A_SCIMI4_2, <i>A. shindleri</i> _ZAC14D2_NA_8	<i>aph3pp.lb</i>	Fosfotransferasa y platicamos	Alteración del sitio blanco	<i>Aminoglucósidos</i>
<i>A. bereziniae</i> _TEXM3A_SCIMI4_2, <i>A. shindleri</i> _ZAC14D2_NA_8	<i>aac3.IIa</i>	Aminoglucósido acetil transferasa	Alteración del sitio blanco	<i>Aminoglucósidos</i>
<i>A. bereziniae</i> _TEXM3A_SCIMI4_2, <i>A. shindleri</i> _ZAC14D2_NA_8	<i>aph6.Id</i>	Aminoglucósido acetil transferasa	Alteración del sitio blanco	<i>Aminoglucósidos</i>
<i>A. bereziniae</i> _TEXM3A_SCIMI4_2, <i>A. shindleri</i> _ZAC14D2_NA_8	<i>sul2</i>	Dehidropteroato sintasa	Alteración del sitio blanco	<i>Sulfonamidas</i>
<i>A. shindleri</i> _ZAC14D2_NA_8	<i>bla-OXA363</i>	β-lactamasa	Inactivación del antibiótico	<i>Betalactámicos</i>
<i>A. bereziniae</i> _TEXM3A_SCIMI4_2, <i>A. shindleri</i> _ZAC14D2_NA_8, <i>A. baumannii</i> _TEXM2A_MKIMI4_16	<i>msrE</i>	ATPasa de tipo ABC	Bomba de expulsión de tipo ABC	<i>Macrólidos</i>
<i>A. bereziniae</i> _TEXM3A_SCIMI4_2, <i>A. shindleri</i> _ZAC14D2_NA_8	<i>mphD</i>	Fosfotransferasa	Fosfotransferasa de macrólidos (MPH)	<i>Macrólidos</i>
<i>A. shindleri</i> _ZAC14D2_NA_8, <i>A. johnsonii</i> _ZAC14D2_NA_2	<i>tet39</i>	Bomba de eflujo	Sistema de expulsión tipo MFS	<i>Tetraciclinas</i>
<i>A. johnsonii</i> _ZAC14D2_NA_2	<i>bla-OXA212</i>	β-lactamasa	Inactivación del antibiótico	<i>Betalactámicos</i>
<i>A. baumannii</i> _TEXM2A_MKIMI4_16, <i>A. bereziniae</i> _TEXM3A_SCIMI4_2, <i>A. pittii</i> _SAU14A_LE_11, <i>A. pittii</i> _EST14D2_LE_11, <i>A. oleivorans</i> _TEXM2D_MKCTX4_5, <i>A. beijerinckii</i> _SAU14A_LE_13,	<i>adeG</i>	Proteína de membrana interna	Sistema de expulsión de tipo RND (AdeFGH)	<i>Tetraciclina, glicilciclina</i>
<i>A. baumannii</i> _TEXM2A_MKIMI4_16, <i>A. bereziniae</i> _TEXM3A_SCIMI4_2, <i>A. pittii</i> _SAU14A_LE_11, <i>A. pittii</i> _EST14D2_LE_11, <i>A. oleivorans</i> _TEXM2D_MKCTX4_5, <i>A. beijerinckii</i> _SAU14A_LE_13,	<i>adeF</i>	Proteína de fusión de membrana	Sistema de expulsión de tipo RND (AdeFGH)	<i>Tetraciclina, fluoroquinolonas</i>
<i>A. baumannii</i> _TEXM2A_MKIMI4_16, <i>A. bereziniae</i> _TEXM3A_SCIMI4_2, <i>A. pittii</i> _SAU14A_LE_11, <i>A. pittii</i> _EST14D2_LE_11, <i>A. oleivorans</i> _TEXM2D_MKCTX4_5, <i>A. beijerinckii</i> _SAU14A_LE_13, <i>A. sp3</i> _ZAC14D2_NA_3, <i>A. johnsonii</i> _TEXM2D_MKCAZ1_11,	<i>adeL</i>	Regulador del sistema RND (AdeFGH)	Sistema de expulsión de tipo RND (AdeFGH)	<i>Tetraciclina, fluoroquinolonas</i>
<i>A. baumannii</i> _TEXM2A_MKIMI4_16, <i>A. bereziniae</i> _TEXM3A_SCIMI4_2, <i>A. pittii</i> _SAU14A_LE_11, <i>A. pittii</i> _EST14D2_LE_11, <i>A. oleivorans</i> _TEXM2D_MKCTX4_5	<i>adeN</i>	Represor del sistema AdeIJK	Sistema de expulsión de tipo RND (AdeIJK)	<i>Macrólidos, efalosporinas, carbapenémicos, tetraciclina, fluoroquinolonas, fenicoles</i>
<i>A. baumannii</i> _TEXM2A_MKIMI4_16, <i>A. bereziniae</i> _TEXM3A_SCIMI4_2, <i>A. pittii</i> _SAU14A_LE_11, <i>A. pittii</i> _EST14D2_LE_11, <i>A. oleivorans</i> _TEXM2D_MKCTX4_5	<i>adeH</i>	Proteína de membrana externa	Sistema de expulsión de tipo RND (AdeFGH)	<i>Tetraciclina, fluoroquinolonas</i>
<i>A. baumannii</i> _TEXM2A_MKIMI4_16, <i>A. bereziniae</i> _TEXM3A_SCIMI4_2, <i>A. pittii</i> _SAU14A_LE_11, <i>A. pittii</i> _EST14D2_LE_11, <i>A. oleivorans</i> _TEXM2D_MKCTX4_5	<i>adel</i>	Proteína de fusión de membrana	Sistema de expulsión de tipo RND (AdeIJK)	<i>Macrólidos, cefalosporinas, carbapenémicos, tetraciclina, fluoroquinolonas, fenicoles</i>

Tabla 11. Funciones y mecanismos de acción identificados en genes de resistencia a antibióticos de nuestros aislamientos ambientales mexicanos de *Acinetobacter* que cuentan con secuencia de su genoma completo (n=14)

Especie	Gen	Función	Mecanismo de resistencia	Resistencia
<i>A. baumannii</i> _TEXM2A_MKIMI4_16, <i>A. bereziniae</i> _TEXM3A_SCIMI4_2, <i>A. pittii</i> _SAU14A_LE_11, <i>A. pittii</i> _EST14D2_LE_11, <i>A. juni</i> _YAU14D1_NA_1, <i>A. johnsonii</i> _TEXM2D_MKCAZ1_11,	<i>adeB</i>	Subunidad del complejo de expulsión AdeABC	Sistema de expulsión de tipo RND (AdeABCRS)	<i>Tetraciclina, glicilciclina</i>
<i>A. baumannii</i> _TEXM2A_MKIMI4_16, <i>A. oleivorans</i> _TEXM2D_MKCTX4_5, <i>A. pittii</i> _EST14D2_LE_11, <i>A. pittii</i> _SAU14A_LE_11, <i>A. bereziniae</i> _TEXM3A_SCIMI4_2, <i>A. shindleri</i> _ZAC14D2_NA_8, <i>A. beijerinckii</i> _SAU14A_LE_13, <i>A. johnsonii</i> _TEXM2D_MKCAZ1_11, <i>A. johnsonii</i> _ZAC14D2_NA_2, <i>A. juni</i> _YAU14D1_NA_1, <i>A. shindleri</i> _ZAC14D2_MF_3, <i>A. sp3</i> _ZAC14D2_NA_3, <i>A. sp2</i> _SAU14Da_LE_1, <i>A. sp3</i> _EST14A_LE_9	<i>adeK</i>	Proteína de membrana externa	Sistema de expulsión de tipo RND (AdeIJK)	<i>Macrólidos, cefalosporinas, carbapenémicos, tetraciclina, fluoroquinolonas, fenicoles</i>
<i>A. baumannii</i> _TEXM2A_MKIMI4_16, <i>A. oleivorans</i> _TEXM2D_MKCTX4_5, <i>A. pittii</i> _EST14D2_LE_11, <i>A. pittii</i> _SAU14A_LE_11, <i>A. bereziniae</i> _TEXM3A_SCIMI4_2, <i>A. shindleri</i> _ZAC14D2_NA_8, <i>A. beijerinckii</i> _SAU14A_LE_13, <i>A. johnsonii</i> _TEXM2D_MKCAZ1_11, <i>A. johnsonii</i> _ZAC14D2_NA_2, <i>A. juni</i> _YAU14D1_NA_1, <i>A. shindleri</i> _ZAC14D2_MF_3, <i>A. sp3</i> _ZAC14D2_NA_3, <i>A. sp2</i> _SAU14Da_LE_1, <i>A. sp3</i> _EST14A_LE_9	<i>adeJ</i>	Proteína de membrana interna	Sistema de expulsión de tipo RND (AdeIJK)	<i>Macrólidos, cefalosporinas, carbapenémicos, tetraciclina, fluoroquinolonas, fenicoles</i>
<i>A. baumannii</i> _TEXM2A_MKIMI4_16, <i>A. oleivorans</i> _TEXM2D_MKCTX4_5, <i>A. pittii</i> _EST14D2_LE_11, <i>A. pittii</i> _SAU14A_LE_11, <i>A. shindleri</i> _ZAC14D2_NA_8, <i>A. beijerinckii</i> _SAU14A_LE_13, <i>A. johnsonii</i> _TEXM2D_MKCAZ1_11, <i>A. johnsonii</i> _ZAC14D2_NA_2, <i>A. sp3</i> _ZAC14D2_NA_3, <i>A. sp2</i> _SAU14Da_LE_1, <i>A. sp3</i> _EST14A_LE_9	<i>abeS</i>	Proteína de expulsión	Sistema de expulsión de tipo SMR	<i>Macrólidos</i>
<i>A. baumannii</i> _TEXM2A_MKIMI4_16, <i>A. oleivorans</i> _TEXM2D_MKCTX4_5, <i>A. pittii</i> _EST14D2_LE_11, <i>A. pittii</i> _SAU14A_LE_11, <i>A. bereziniae</i> _TEXM3A_SCIMI4_2, <i>A. shindleri</i> _ZAC14D2_NA_8, <i>A. beijerinckii</i> _SAU14A_LE_13, <i>A. shindleri</i> _ZAC14D2_MF_3, <i>A. sp3</i> _ZAC14D2_NA_3, <i>A. sp2</i> _SAU14Da_LE_1, <i>A. sp3</i> _EST14A_LE_9	<i>abeM</i>	Proteína de expulsión	Sistema de expulsión tipo MATE	<i>Fluoroquinolonas, triclosan</i>

(Jia et al. 2017)

3.4.7 Asociación de las características ambientales y genéticas de 14 cepas de *Acinetobacter* mexicanas

La filogenia genómica de las 14 cepas de *Acinetobacter* ambientales muestra una diversidad importante de especies del género. Podemos observar al menos tres aspectos importantes: i) La característica de panresistente no está asociada exclusivamente en el complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*. Este atributo lo podemos observar muy marcado en *A. johnsonii*, *A. bereziniae* y *A. junii* especies que en los últimos años se han descrito como relevantes en la clínica (Regeen et al. 2014; (Feng et al. 2016); Brovedan et al. 2016; Chagas et al. 2015) ii) *A. baumannii* y *A. bereziniae* especies con fenotipo panresistente son las únicas que tienen integrones de clase 1 y fueron aisladas de sitios altamente contaminados iii) Las especies con mayor número de plásmidos fueron recuperadas de sitios altamente contaminados (**Figura 26**).

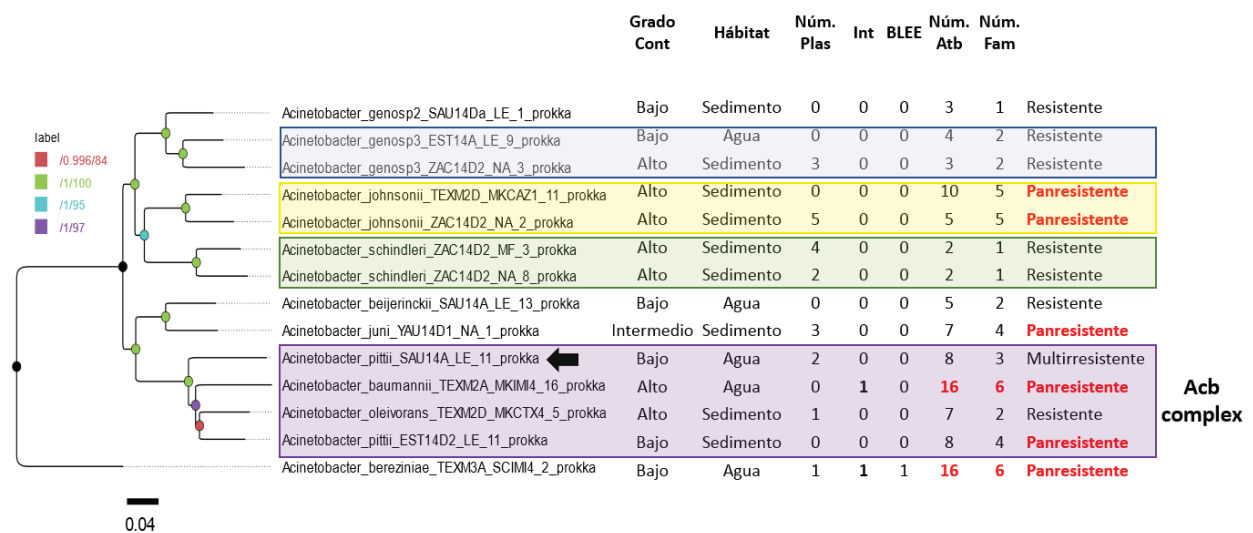


Figura 26. Filogenia genómica de 14 cepas selectas de *Acinetobacter* ambientales mexicanas

Filogenia de máxima verosimilitud del genoma core de *Acinetobacter* encontrada en la búsqueda de IQ-TREE basada en la supermatriz obtenida por concatenación de 834 alineamientos. Los círculos de colores al inicio de las ramas denotan el nivel de soporte de las ramas. El rectángulo de color morado enmarca las especies que forman el complejo de *Acinetobacter*. Las columnas de lado derecho de la filogenia muestran un resumen con las características de cada cepa. La primera columna Grado Cont= Grado de contaminación fecal del río, Hábitat de donde se obtuvo la cepa, Núm Plas = número de plásmidos identificados en cada cepa. Int = Presencia o ausencia del gen de la integrasa tipo 1. BLEE = presencia o ausencia del fenotipo de β -lactamasa de espectro extendido, Núm Atb = es el número de antibióticos individuales a los que mostró resistencia cada aislamiento probado, Núm Fam = es el número de familias de antibióticos a los que fueron resistentes cada uno de los aislamientos probados. Finalmente hacemos énfasis de su nivel de resistencia.

El esquema de MLSA que desarrollamos en este trabajo puede ser de gran utilidad en diferentes áreas, como la industria, la biorremediación y la clínica. En esta última podría implementarse para elegir adecuadamente la terapia de los pacientes para llevar una vigilancia epidemiológica certera. La diversidad de cepas que aislamos en este trabajo es relevante porque hay muy pocos estudios sobre las especies no-baumannii del género *Acinetobacter*.

A continuación, describiremos los detalles de su aislamiento y su participación en las diferentes áreas antes mencionadas.

Acinetobacter tandoii se obtuvo de la columna de agua de un sitio limpio. Esta especie se ha estudiado por su potencial para la biorremediación dada su capacidad para degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos (J. Li et al. 2017). En nuestra filogenia también se observan dos posibles nuevas especies del género, las cuales designamos como genoespecies dos y tres. De la genoespecie dos, se obtuvieron tres aislamientos provenientes de sedimentos limpios y columna de agua medianamente contaminada. Y de la genoespecie tres, se obtuvieron tres aislamientos provenientes de columna de agua limpia y sedimentos contaminados. El análisis del genoma core de las cepas y la incorporación de nuevas cepas de referencia nos permitió identificar que las cepas que denominamos genoespecie 2 y 3 realmente corresponde a lo que nosotros denominamos ***Acinetobacter tandoii complex*** resaltado en el rectángulo color verde de la **Figura 21**.

Tres de nuestros aislamientos correspondieron a ***Acinetobacter schindleri*** y están asociados a sedimentos contaminados y agua medianamente contaminada. Esta especie está relacionada con infecciones en humanos. Aunque su prevalencia es baja, es importante destacar que puede contener genes de multirresistencia a antibióticos, como *bla*_{-NDM-1} (Montaña et al. 2018).

Recuperamos tres aislamientos de ***Acinetobacter johnsonii*** a partir de columna de agua y de sedimento en los tres ambientes (limpio, medianamente contaminado y altamente contaminado), sugiriendo que tiene una amplia distribución en ambientes acuáticos. Se ha observado que esta especie también es un buen candidato para su uso en biorremediación (Jiang, Qi, and Zhang 2018). Es la especie donde identificamos un mayor número de plásmidos (5). Se ha identificado una cepa de *A. johnsonii* con nueve plásmidos conteniendo diversas carbapenemasas (NDM-1, OXA-58 y PER-1), es por ello que lo han propuesto como una especie que puede generar varias plataformas para mediar la resistencia antimicrobiana (Feng et al. 2016). Dentro de nuestros aislamientos identificamos la genoespecie 1 que por la filogenia de MLSA (**Figura 21**) está relacionada con *A. johnsonii* y presenta dos plásmidos.

Dos aislamientos correspondieron a ***Acinetobacter bereziniae*** y se aislaron de columna de agua altamente contaminada. Esta especie se aisló por primera vez de muestras clínicas de humanos (Nemec et al., 2010). Principalmente en aislamientos de América Latina, se ha

reportado que algunas cepas tienen carbapenemasas tipo OXA (Zander et al. 2014) y MBL como *bla*-_{NDM-1}, ambas identificadas en plásmidos (Brovedan et al. 2016; Chagas et al. 2015).

Acinetobacter soli es otra de las especies identificadas en este estudio. Se recuperó de un aislamiento de columna de agua altamente contaminada. La especie fue aislada por primera vez del suelo de un bosque de Corea (D. Kim et al. 2008) y también se ha identificado en piojos de animales domésticos (Kumsa et al. 2012). A pesar de que los primeros reportes indicaron que el microorganismo provenía de fuentes ambientales, ya existen reportes de la especie en ambientes clínicos. Se documentó un brote causado por *A. soli* en una unidad de cuidados intensivos de neonatos (Pellegrino et al. 2011) y en China, la bacteria infectó a un paciente que murió luego de 65 días en tratamiento. Esta cepa era multirresistente y contenía las β -lactamasas *bla*-_{OXA-58}, *bla*-_{IMP-1}, *bla*-_{NDM-1}, *bla*-_{TMB-2} (Cao et al. 2015).

Dos de nuestros aislamientos fueron clasificados como ***A. baumannii*** y pertenecen a la clona II (de las más prevalentes a nivel mundial). Se aislaron de columna de agua del río Apatlaco en Temixco. Esta es la especie de mayor relevancia clínica en el género debido a su multirresistencia y su incidencia en los nosocomios. Son muy pocos los reportes de la especie en el medio ambiente extrahospitalarios. Se ha aislado de muestras de agua del río Sena en París (Girlich, Poirel, and Nordmann 2010), de aguas residuales en Brasil (Ferreira et al. 2011) y en China (Zhang 2013), así como de plantas de tratamiento de aguas residuales en Croacia (Hrenovic et al. 2016). Por lo tanto, es muy poco lo que se sabe de la especie en ambientes naturales. Además, estos estudios han trabajado con una sola cepa, pues no se han encontrado poblaciones de la bacteria. Tampoco se ha reportado su presencia en ambientes naturales limpios, lo cual sugiere que su reservorio no está en ambientes naturales.

También aislamos cuatro cepas de ***Acinetobacter pittii***, pertenecientes exclusivamente a sitios limpios, tanto de columna de agua como de sedimento. Sin embargo, *A. pittii* ha sido aislada de aguas residuales y es un degradador eficiente de indol y sus derivados y, por lo tanto, un excelente candidato para ser usada en biorremediación (Z. Yang et al. 2017).

Una de nuestras cepas corresponde a ***A. lactucae***. Esta especie fue aislada por primera vez de una muestra de lechuga de un supermercado (Rooney, Dunlap, and Flor-Weiler 2016). La cepa EST14D2_LE_11 primeramente fue identificada como *A. pittii* en la filogenia de MLST (**Figura 18**). Sin embargo, en la filogenia genómica (**Figura 21**), se identifica como *A. lactucae* especie hermana de *A. pittii* y por lo tanto está formando parte del complejo Acb.

Por otro lado, *A. oleivorans* se aisló solo de los sedimentos de ríos altamente contaminados. También se ha encontrado en arrozales en Corea del Sur y se ha observado que es capaz de crecer en diésel y petróleo y adherirse a ellos, lo cual la podría hacer útil en procesos de biorremediación (Jung et al. 2011).

De *A. junii* solo se obtuvo un aislamiento proveniente de sedimentos medianamente contaminados. Es un patógeno oportunista que se ha reportado en hospitales como causante de infecciones en humanos. Además tiene genes de resistencia a antibióticos como *bla*_{-NDM-1} y *bla*_{-OXA-58} (Regeen et al. 2014). En estudios retrospectivos del género, se ha observado que coexiste con otra especie del mismo género, lo cual ha llevado a sugerir la transferencia de genes entre ambas especies (Baron, Dubourg, and Rolain 2018).

Una de nuestras cepas se clasificó como *Acinetobacter beijerinckii* y se aisló de columna de agua limpia. Esta especie se ha encontrado también en muestras clínicas humanas, así como en algunos animales, suelo y agua (Nemec et al. 2009). También se ha estudiado su potencial como agente de biorremediación de ambientes marinos, debido a su capacidad de degradación de petróleo crudo (Zhao et al. 2016).

3.5 Discusión

Un aspecto importante de nuestro trabajo fue el estudio de los elementos genéticos móviles (plásmidos e integrones) de las especies que aislamos. Nuestra metodología, a saber, el muestreo en sitios con grados contrastantes de contaminación, permitió comparar las especies bacterianas de origen diverso. Pudimos observar que las bacterias provenientes de los ambientes más contaminados contienen una cantidad de plásmidos mucho mayor que aquellas provenientes de ambientes más limpios. Esto es debido a que identificamos una distribución diferencial de especies de *Acinetobacter* en los diferentes sitios de muestreo.

El estudio de plásmidos en el género es limitado y está enfocado principalmente a la especie *A. baumannii* aislada de ambientes clínicos. En estos estudios es relevante destacar que se trata de plásmidos movilizables a altas frecuencias y con genes que codifican carbapenemasas (enzimas que hidrolizan antibióticos carbapenémicos) y metales como mercurio (Hamidian, Ambrose, and Hall 2016). Las carbapenemasas son de suma relevancia para los servicios de salud ya que representa una carga económica fuerte debido a las limitaciones del tratamiento y su rápida propagación. Esta es una de las razones por la cual es muy importante conocer la evolución y diseminación de plásmidos en el género. Además, existen autores que proponen a

Acinetobacter spp. como el reservorio y origen de la carbapenemasa NDM-1 debido a su capacidad de transferir esta enzima a otras enterobacteria (Toleman et al. 2012). Esta idea ha sido sustentada con datos in vitro de un estudio realizado con cepas de *Acinetobacter spp.* del Sur de Corea sobre la transferencia de plásmidos y la estabilidad donde sugieren que estos plásmidos podrían haber contribuido a la propagación de *bla-NDM1* en *Enterobacteriaceae* (Sung et al. 2014). Otros autores sustentan esta idea ya que han caracterizado plásmidos transferibles conteniendo la carbapenemasa NDM-1 en *A. soli* y *A. pittii* e identificado su movilidad entre el género (Huang et al. 2015). De igual forma a *A. pittii* conteniendo plásmidos con grupos de incompatibilidad nuevos, carbapenemasas tipo OXA y con la capacidad de transferirse con otras especies del género (Silva et al. 2018).

Investigadores en América Latina también han estudiado la transmisión de plásmidos conteniendo carbapenemasas entre *A. baumannii* y otras enterobacterias, sin embargo, los datos respecto a los plásmidos caracterizados por los autores sugieren que los plásmidos de *Acinetobacter spp.* no tienen una buena adecuación en enterobacterias (Marquez-Ortiz et al. 2017).

En otro análisis de genómica comparada con cepas de *Acinetobacter spp.* clínicas y ambientales (agua y suelo), se sugiere que plásmidos de tipo Rep_3 se pueden transferir entre *Acinetobacter spp.* de diferentes ambientes, así como replicarse en bacterias de otros géneros incluso phyla. De igual forma, en el análisis se identificaron nuevos plásmidos (Salto et al. 2018). Estos trabajos sustentan por un lado la importancia de estudiar especies *no-baumannii* y por otro lado el estudiar cepas ambientales.

Con respecto a los integrones, en este estudio pudimos observar que las cepas que los contienen (*A. baumannii* y *A. bereziniae*) son resistentes a las cinco familias de antibióticos probadas (β -lactámicos, aminoglucósidos, fenoles, tetraciclina y fluoroquinolona). Los integrones codifican para determinantes de resistencia de al menos 5 familias de antibióticos (estreptomicina, cloranfenicol, aminoglucósidos, β -lactámicos y sulfonamidas). De igual forma se trata de integrones con una estructura poco convencional lo que nos sugiere que estos integrones pueden estar subestimados en el género. Otros estudios han identificado una prevalencia del 89.3% de integrones de clase I en 56 aislamientos de *Acinetobacter spp.* (*A. baumannii* (n=30), *A. bereziniae* (n=4), *A. nosocomialis* (n=5) y *A. pittii* (n=17) de India y Pakistan. Estos integrones contienen genes de resistencia a cloranfenicol, aminoglucósidos y β -lactámicos) (L. S. Jones et al. 2015). En China se han reportado una prevalencia de integrones del 69.9% de

un total de 425 aislamientos clínicos de *A. baumannii*. Los arreglos de los integrones muestran genes que codifican resistencia a cloranfenicol, aminoglucósidos, y trimetoprim (Jing Chen et al. 2015). Son pocos los estudios respecto a integrones en especies *no-baumannii* del género y no se conoce mucho de estas plataformas en aislamientos ambientales. Un dato importante a señalar es que nuestro integrón de *A. bereziniae* y otros reportados por (L. S. Jones et al. 2015) contienen carbapenemasas. Es por ello de suma importancia seguir estudiando este tipo de plataformas y entender su diseminación entre especies del género *Acinetobacter* y *Enterobacteriaceae*.

Es necesario destacar que los estudios que se llevan a cabo sobre este género suelen centrarse en *A. baumannii* por su atributo de multirresistencia y alta prevalencia en los nosocomios. Sin embargo, aquí demostramos que hay otras especies con el mismo atributo (*A. bereziniae*, *A. johnsonii* y *A. soli*). Aunque nosotros no las hayamos aislado de muestras humanas, otros estudios ya han demostrado su capacidad de provocar infecciones en humanos (L. S. Jones et al. 2015; Feng et al. 2016). En nuestro estudio, las cepas de estas tres especies se recuperaron de ambientes altamente contaminados. Esto sugiere que la contaminación antropogénica está determinando la selección de bacterias con multirresistencia adquirida, independientemente de su resistencia intrínseca.

Respecto a los genes de resistencia identificados en los genomas del estudio se observa una alta prevalencia de determinantes de resistencia a aminoglucósidos, seguida por genes que codifican a enzimas que hidrolizan antibióticos β -lactámicos. Estas prevalencias se han descrito en otros trabajos (Espinal, Roca, and Vila 2011).

Finalmente, es pertinente enfatizar la importancia de llevar a cabo estudios en las especies *no-baumannii* de este género, ya que *A. baumannii* no es la única multirresistente a antimicrobianos y capaz de provocar infecciones en humanos. Este tipo de estudios solo será posible si la delimitación de especies se hace correctamente. En este sentido, el MLSA que nosotros propusimos resulta ser una herramienta muy eficiente para lograrlo.

3.6 Conclusión

El esquema de MLSA que estamos proponiendo aquí permite la correcta clasificación de las especies del género *Acinetobacter*. El hecho más relevante a partir de la aplicación de este esquema es que *A. baumannii* no es la única especie multirresistente y no constituye, en realidad, un complejo, ya que pudimos distinguir claramente las diferentes especies del género con un

soporte de rama significativo y formando clados muy bien separados unos de otros por ramas profundas. Además, la correcta delimitación de las especies sienta las bases para futuros estudios en el área de la clínica (tratamientos correctos) y la industria (biorremediación).

3.7 Perspectivas

- Implementar el esquema de MLSA utilizando cepas de otras especies del género con fenotipos diversos y provenientes de otros sitios de aislamiento
- Análisis de genómica comparada de cepas selectas
- Llevar a cabo análisis de virulencia en el hospedero alternativo *Galleria mellonella*
- Analizar y caracterizar los elementos genéticos móviles (plásmidos e integrones)
- Analizar la capacidad de transferencia de los elementos genéticos móviles
- Identificar y caracterizar los determinantes genéticos de fenotipos de producción de BLEE y MBL

7. Conclusiones generales

A partir de muestras ambientales, recolectadas en ríos del estado de Morelos, generamos una colección muy diversa de aislados bacterianos de los géneros *Stenotrophomonas* y *Acinetobacter*. Mediante estrategias de genética de poblaciones y de filogenética, pudimos delimitar robustamente las especies de estos géneros. Esta delimitación de especies nos permitió, a su vez, hacer asociaciones de genotipo con fenotipos de resistencia a antibióticos. Así, pudimos reconocer las especies verdaderamente multirresistentes. Esto tiene implicaciones importantes en diferentes áreas. En la clínica, permite la elección de los tratamientos más indicados y apoya el uso correcto de los antimicrobianos. En la industria, permite identificar las cepas que podrían usarse en procesos de biorremediación, en la generación de antibióticos y metabolitos secundarios, en las intervenciones de biocontrol y en la agricultura, como factores de crecimiento vegetal.

Nuestro estudio también nos permitió evaluar el impacto que tiene la contaminación antropogénica en la multirresistencia a los antimicrobianos. Observamos que las cepas multirresistentes están asociadas a ambientes altamente contaminados y tienen una mayor cantidad de elementos genéticos móviles, responsables de la multirresistencia.

Por todo lo anterior, nuestra investigación proporciona evidencia que puede servir como base para el desarrollo de políticas en diversas áreas del quehacer humano. Tanto en el ámbito de la salud como en la agricultura y la ganadería, se podrá reducir la selección de cepas multirresistentes mediante el uso adecuado de los antibióticos, por un lado, y de las aguas residuales, por otro.

8. Materiales y métodos

8.1 Sitios de muestreo

Los sitios se clasificaron en tres categorías de contaminación: **baja** (Sauces y Estacas), **intermedia** (Yautepec) y **alta** (Temixco y Zacatepec) (Tabla 1).

Los microorganismos fueron recuperados de sedimentos y columnas de agua de seis sitios correspondientes a cuatro ríos y dos arroyos con diferentes niveles de contaminación antropogénica del estado de Morelos (Tabla 1: Artículo 1 *Stenotrophomonas*). Los cuerpos de agua se clasificaron en tres según su nivel de contaminación fecal: 1) bajo (L), intermedio (I), alto (H). Esto se determinó con base en cuentas por triplicado de coliformes termotolerantes (TTCs) en mFC agar (Oxoid) y *E. coli* termotolerantes (TTEc) en agar m-TEC modificado (USEPA, 2002). Las muestras de agua se tomaron en recipientes estériles de 1 litro. Las muestras de sedimento (dos de cada sitio) se tomaron con “core” a profundidad de entre 2 y 20cm. El primer paso fue la filtración por membrana (0.45 μm) mediante método APHA (2005).

Se midieron 6 parámetros físico-químicos (pH, salinidad, temperatura, total de solutos disueltos, óxido-reducción y oxígeno disuelto) de la columna de agua utilizando un instrumento multiparamétrico HANNA H19828 en modo de medida continua durante 1 minuto a lo largo de un transecto de 10 metros (Fig. S2: Artículo *Stenotrophomonas*).

Se tomaron 3 muestras de sedimento (3 por sitio, a lo largo de 3 metros lineales), fueron tomadas de los mismos sitios en cores de plástico estériles con una profundidad de 3 a 5cm. Las muestras fueron mantenidas en hielo hasta su procesamiento en un lapso de 4 a 8hrs (APHA, 2005).

El muestro se realizó al final de la estación seca (abril-mayo), entre 2012 y 2014.

8.2 Aislamiento de microorganismos ambientales

Para el aislamiento de las bacterias se utilizaron medios oligotróficos: [Agar NAA (Aagot et al., 20001), R2A (Ultee et al. 2004), MacConkey y Led's], suplementados o no con antibióticos [Trimetroprim 30 + carbenicilina 100, ciprofloxacino 4, ceftazidima 8, cefotaxima 4, imipenem 4 ($\mu\text{g/ml}$)], se plaquearon 100 μl de diluciones seriadas (1 a 10^{-4}) en triplicado para cada muestra, posteriormente se incubaron a 30 $^{\circ}$ C por un máximo de 24 horas. Colonias aisladas fueron estriadas repetidamente en el mismo medio de aislamiento para la purificación de la cepa.

Los aislamientos fueron rutinariamente crecidos en medio LB suplementado con glicerol al 20% y congelados a -80°.

8.3 Determinación de perfiles de resistencia

Un total de 19 antibióticos pertenecientes a seis familias y cinco combinaciones de inhibidores de β -lactamasas, fueron utilizados para determinar los perfiles de resistencia de cada cepa.

Se determinaron los perfiles de resistencia de cada cepa picándolas en paralelo en cajas de agar suplementadas con antibióticos y mediante discos (BIOSEDNA). Siguiendo los puntos de corte recomendados por el (Clinical and Laboratory Standards Institute 2016) los cuales se muestran en la TS1 y TS2.

De los aislamientos representativos de los géneros de interés se realizó la identificación fenotípica de genes de resistencia que codifican para β -lactamasas, carbapenemasas de clase A, metallo- β -lactamasas y AmpC, (CLSI, 2013) (Figura 26).

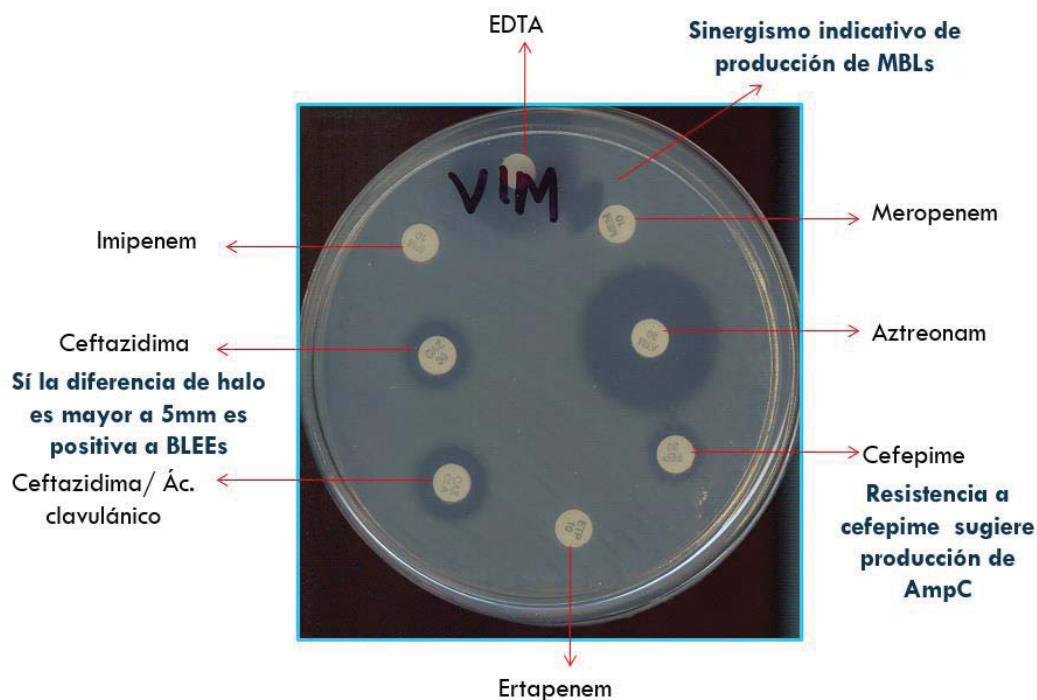


Figura 27. Ejemplo de la disposición de los sensidisco en la técnica de sinergismo de doble disco (SDD) realizado en una cepa control productora de MBL y ESBL

8.4 Amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de secuencias de 16S rDNA y su análisis filogenético

Todas las cepas fueron clasificadas a nivel de género mediante análisis filogenético de 16S rRNA gen (*rrs*) (Vinuesa et al. 2005), las secuencias fueron amplificadas con oligonucleótidos universales fD1/rD1 (Weisburg et al. 1991).

Solo la cadena forward fue secuenciada para cada amplicon con el primer fD1, utilizando la secuenciación-Sanger realizada comercialmente por Macrogen (South Korea). Las lecturas crudas fueron recortadas basadas en valores Phred utilizando phred (Ewing et al. 1998) y clasificados a nivel de género utilizando una tubería programada en Perl donde cada secuencia fue comparada vía blastn (Camacho et al., 20009) contra un caso local de alta calidad con una longitud completa de secuencias bacterianas *rrs* de cepas tipo descargadas en el servidor RDP-II (Cole et al. 2007), recuperando los 5 mejores hits. Las secuencias pre-alineadas se utilizaron para generar alineamientos de secuencia múltiples para ello se utilizó clustalw2 (Larkin et al. 2007). El resultado del alineamiento fue sometido a un análisis filogenético de maximum-likelihood con phylml3 (Guindon et al. 2010), bajo el mejor modelo de sustitución seleccionado por jModelTest2 (Darriba et al. 2012).

8.5 Identificación fenotípica de BLEEs y MBLs

Se realizó mediante sinergismo de doble disco (DDST) modificada (Clinical and Laboratory Standards Institute 2013), se utilizaron discos de imipenem (10µg), meropenem (10µg), utilizado EDTA (0.5M) como agente quelante, adicionalmente se agregaron disco de ertapenem (10µg), aztreonam (30 µg) para confirmar la no degradación del antibiótico, característica típica de la presencia de una metalo-betalactamasa además ceftazidima y ceftazidima con ácido clavulánico para comprobar la presencia de β-lactamasas de espectro extendido, así como un disco de cefoxitin (10µg), el cual indica la posible presencia de AmpC. Los discos se colocaron a una distancia de 2cm de centro a centro en medio de cultivo Mueller-Hilton. En la prueba, una deformación del halo entre el EDTA y alguno de los discos conteniendo imipenem, meropenem, se considera como positiva para la producción de la metaloenzima. Si la diferencia es mayor o igual a 5mm entre ceftazidima y ceftazidima clavulánico es indicativo de una β-lactamasa. Finalmente, la resistencia de cefoxitin es indicativo de la posible presencia de AmpC.

8.6 Secuenciación de genomas completos de cepas selectas

Se seleccionaron cepas representativas de cada grupo de estudio para secuenciación de su genoma para lo cual se utilizó tecnología MiSeq (2x300bp) contratando el servicio provisto por la Universidad del Estado de Arizona (DNASU). La extracción de DNA total se realizó utilizando el kit comercial de QUIAGEN (DNeasy Blood & Tissue Kit 250).

8.7 Metodología capítulo 1: *Stenotrophomonas*

La metodología empleada para el capítulo 1 de *Stenotrophomonas* se menciona en el artículo **Anexo 1**.

8.8 Metodología empleada en el capítulo 3: *Acinetobacter*

8.8.1 Amplificación de PCR y análisis filogenético de máxima verosimilitud de secuencias de multilocus

Para el análisis de secuencias multilocus (MLSA) de aislamientos ambientales de *Acinetobacter* se identificaron genes ortólogos del genoma núcleo de todas las secuencias de genomas completas del género *Acinetobacter* mediante el paquete GET_HOMOLOGUES (Contreras-Moreira and Vinuesa 2013). Seis loci fueron seleccionados para el diseño de oligonucleótidos utilizando el servidor Primers4clades (Contreras-Moreira et al. 2009). Los amplicones fueron purificados y secuenciados comercialmente por las dos cadenas en Macrogen (Corea del Sur). Alineamientos de genes individuales fueron concatenados y la matriz resultante fue sujeta a una selección de modelo con jModelTest2 (Darriba et al. 2012), para su análisis filogenético bajo maximum likelihood (ML) criterio con PhyML3 (Guindon et al. 2010).

8.8.2 Perfil de plásmidos

El contenido plasmídico fue analizado por el método descrito por Kieser (1984). **Anexo 15**.

8.8.3 Secuenciación, ensamble, anotación y análisis de genomas

Se secuenciaron 14 cepas pertenecientes al género *Acinetobacter*. Mediante tecnología Ilúmina MiSeq (2x300bp) contratando el servicio provisto por la Universidad del Estado de Arizona (DNASU). Diez de las cepas fueron además secuenciadas con la tecnología de tercera generación Oxford nanopore con el equipo MinION contratando el servicio del Instituto de Biotecnología-UNAM. Se generaron ensambles híbridos (10) con unicycler (Wick et al. 2017). Se utilizo el programa SPAdes (Bankevich et al. 2012) para los ensambles obtenidos con ilumina. La anotación de los genomas se realizó con prokka (Seemann 2014). La extracción de DNA total se realizó utilizando el kit comercial de QUIAGEN (DNeasy Blood & Tissue Kit 250). El análisis filogenómico

del pangenoma del género *Acinetobacter* se realizó utilizando el paquete GET_HOMOLOGUES (Contretras-Moreira B & Vinuesa P. et al. 2013) y para estimar la matriz del pangenoma y construir el árbol de especies se utilizó el paquete GET_PHYLOMARKERS (Vinuesa P. et al., 2018). En primer lugar, se filtraron las secuencias para evitar alineaciones recombinantes. Se estimó un árbol de especies de máxima verosimilitud a partir del conjunto concatenado de alineamientos de alto nivel de ADN utilizando IQ-TREE (**Figura 21**).

9. Anexos

Anexo 1. Artículo 1: Evolutionary Genetic Anlysis Uncovers Multiple Species with Distinct habitat preferences and Antibiotic Resistance Phenotypes in the *Stenotrophomonas maltophilia* complex

Anexo 2. Material suplementario del artículo 1. Evolutionary genetic analysis uncovers multiple species with distinct habitat preferences and antibiotic resistance phenotypes in the *Stenotrophomonas maltophilia* complex

Anexo 3. Genome announcements: Complete Genome Sequencing of *Stenotrophomonas acidaminiphila* ZAC14D2_NAIMI4_2, a Multidrug-Resistant Strain Isolated from Sediments of a Polluted River in Mexico, Uncovers New Antibiotic Resistance Genes and a Novel Cass-II Lasso Peptide Biosynthesis Gene Cluster

Anexo 4. Artículo GET_PHYLOMARKERS, a Software Package to Select Optimal Orthologous Clusters for Phylogenomics and Inferring Pan-Genome Phylogenies, Used for a Critical Geno-Taxonomic Revision of the Genus *Stenotrophomonas*

Anexo 5. Material suplementario del artículo GET_PHYLOMARKERS, a Software Package to Select Optimal Orthologous Clusters for Phylogenomics and Inferring Pan-Genome Phylogenies, Used for a Critical Geno-Taxonomic Revision of the Genus *Stenotrophomonas*

Anexo 6. Lista de especies pertenecientes al género *Stenotrophomonas*

Anexo 7. Métodos de tipificación epidemiológica molecular utilizados en *Stenotrophomonas*

Anexo 8. Genómica comparada del género *Stenotrophomonas*

Anexo 9. Lista de especies de *Acinetobacter* que han sido reportadas y fueron identificadas en nuestro estudio.

Anexo 10. Métodos de tipificación epidemiológica molecular que se han utilizado en *Acinetobacter*.

Anexo 11. Genómica comparado del género *Acinetobacter*

Anexo 12. Oligonucleótidos utilizados en este estudio

Anexo 13. Recetas de medios utilizados en este estudio

Anexo 14. Metodología de extracción de plásmidos (Kiesser et al., 1984)



Evolutionary Genetic Analysis Uncovers Multiple Species with Distinct Habitat Preferences and Antibiotic Resistance Phenotypes in the *Stenotrophomonas maltophilia* Complex

Luz E. Ochoa-Sánchez and Pablo Vinuesa*

Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mexico

OPEN ACCESS

Edited by:

Sergey M. Stolyar,
University of Idaho, United States

Reviewed by:

Prabhu B. Patil,
Institute of Microbial Technology
(CSIR), India
Peter Young,
University of York, United Kingdom

*Correspondence:

Pablo Vinuesa
vinuesa@ccg.unam.mx

Specialty section:

This article was submitted to
Evolutionary and Genomic
Microbiology,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 03 December 2016

Accepted: 31 July 2017

Published: 17 August 2017

Citation:

Ochoa-Sánchez LE and Vinuesa P
(2017) Evolutionary Genetic Analysis
Uncovers Multiple Species with
Distinct Habitat Preferences
and Antibiotic Resistance Phenotypes
in the *Stenotrophomonas maltophilia*
Complex. *Front. Microbiol.* 8:1548.
doi: 10.3389/fmicb.2017.01548

The genus *Stenotrophomonas* (*Gammaproteobacteria*) has a broad environmental distribution. *Stenotrophomonas maltophilia* is its best known species because it is a globally emerging, multidrug-resistant (MDR), opportunistic pathogen. Members of this species are known to display high genetic, ecological and phenotypic diversity, forming the so-called *S. maltophilia* complex (Smc). Heterogeneous resistance and virulence phenotypes have been reported for environmental Smc isolates of diverse ecological origin. We hypothesized that this heterogeneity could be in part due to the potential lumping of several cryptic species in the Smc. Here we used state-of-the-art phylogenetic and population genetics methods to test this hypothesis based on the multilocus dataset available for the genus at pubmlst.org. It was extended with sequences from complete and draft genome sequences to assemble a comprehensive set of reference sequences. This framework was used to analyze 108 environmental isolates obtained in this study from the sediment and water column of four rivers and streams in Central Mexico, affected by contrasting levels of anthropogenic pollution. The aim of the study was to identify species in this collection, defined as genetically cohesive sequence clusters, and to determine the extent of their genetic, ecological and phenotypic differentiation. The multispecies coalescent, coupled with Bayes factor analysis was used to delimit species borders, together with population genetic structure analyses, recombination and gene flow estimates between sequence clusters. These analyses consistently revealed that the Smc contains at least 5 significantly differentiated lineages: *S. maltophilia* and Smc1 to Smc4. Only *S. maltophilia* was found to be intrinsically MDR, all its members expressing metallo- β -lactamases (MBLs). The other Smc lineages were not MDR and did not express MBLs. We also obtained isolates related to *S. acidaminiphila*, *S. humi* and *S. terrae*. They were significantly more susceptible to antibiotics than *S. maltophilia*. We demonstrate that the sympatric lineages recovered display significantly differentiated habitat preferences, antibiotic

resistance profiles and β -lactamase expression phenotypes, as shown by diverse multivariate analyses and robust univariate statistical tests. We discuss our data in light of current models of bacterial speciation, which fit these data well, stressing the implications of species delimitation in ecological, evolutionary and clinical research.

Keywords: multilocus sequence analysis, species delimitation, multidrug resistance, multispecies coalescent, population genetic structure, recombination, metallo-beta-lactamase, multivariate statistics

INTRODUCTION

Bacterial species identification and delimitation are non-trivial tasks, which are critical in certain settings such as the clinic, bioterrorism and industry. More generally, the conclusions drawn from evolutionary and ecological analyses are strongly dependent on organismal classification, as species are the relevant units of diversity (Vinuesa et al., 2005b; Koepfel et al., 2008; Shapiro et al., 2016). Proper species delimitation is a requisite to discover the species-specific phenotypic attributes underlying their ecological niche differentiation (Cadillo-Quiroz et al., 2012; Shapiro et al., 2012; Cordero and Polz, 2014).

We hypothesized that problems with species delimitations have hindered progress in systematic, taxonomic and ecological research on the ubiquitous genus *Stenotrophomonas* (Gammaproteobacteria, *Xanthomonadales*, *Xanthomonadaceae*) (Palleroni and Bradbury, 1993), which currently comprises 12 validly described species¹. This limitation particularly affects the *S. maltophilia* species complex (Smc) (Svensson-Stadler et al., 2011), which has long been recognized to have a broad ecological distribution, being associated with humans, animals, plants and diverse anthropogenic and natural environments (Berg et al., 1999; Ryan et al., 2009; Berg and Martinez, 2015). Although different genotyping methods, particularly AFLPs (Hauben et al., 1999), rep-PCR (Adamek et al., 2011) and multilocus sequence analysis/typing (MLSA/MLST) (Kaiser et al., 2009; Vasileuskaya-Schulz et al., 2011) have clearly revealed the existence of multiple genomic groups within the Smc, proper recognition of species borders within the complex has not yet been satisfactorily achieved. This has ultimately hindered the discovery of statistically significant associations between species and traits such as habitat preferences, antibiotic resistance phenotypes and pathogenicity potential (Adamek et al., 2011; Berg and Martinez, 2015; Deredjian et al., 2016). *S. maltophilia* is an important globally emerging and multidrug-resistant (MDR) opportunistic pathogen causing difficult-to-treat infections (Chang et al., 2015). High mortality rates are reported mainly in the immunocompromised, cancer and cystic fibrosis patients, as well as those with central venous catheters or long-lasting antibiotic therapy (Looney et al., 2009; Brooke, 2012). Therefore, the identification of significant genotype-phenotype associations is critical for the safe use of particular strains from the Smc with high potential for diverse environmental biotechnologies such as bioremediation, plant growth promotion and protection (Ryan et al., 2009; Berg and Martinez, 2015).

¹<http://www.bacterio.net/stenotrophomonas.html>

The main objectives of this study were: (i) to identify genetically cohesive and differentiated sequence clusters (genospecies) among a collection of environmental *Stenotrophomonas* isolates by using a combination of state-of-the-art phylogenetic and population genetic methods; (ii) to test whether such lineages exhibit distinct phenotypic and ecological attributes, as predicted by current models of bacterial speciation. We used the multilocus dataset for the genus available at pubmlst.org (Kaiser et al., 2001; Vasileuskaya-Schulz et al., 2011), and extended it with sequences extracted from complete (Crossman et al., 2008; Lira et al., 2012; Zhu et al., 2012; Davenport et al., 2014; Vinuesa and Ochoa-Sánchez, 2015) and draft (Patil et al., 2016) genome sequences to assemble a comprehensive MLSA dataset with representative strains of 11 out of 12 validly described *Stenotrophomonas* species. We used this reference dataset to study our collection of environmental *Stenotrophomonas* isolates ($n = 108$) recovered from the sediments and water column of several rivers with contrasting levels of contamination in the state of Morelos, Central Mexico.

For an initial exploration of this dataset, we used thorough maximum-likelihood tree searching. The evidence from this phylogenetic analysis was used to define diverse species border hypotheses, which were formally evaluated in a Bayesian framework under the multispecies coalescent (MSC) model (Rannala and Yang, 2003; Edwards et al., 2007; Degnan and Rosenberg, 2009) by subjecting them to Bayes factor (BF) analysis (Kass and Raftery, 1995). To the best of our knowledge, this is the first study that evaluates the utility of this Bayesian statistical framework for bacterial species delimitation, which is emerging as a successful and promising strategy for species delimitation in plants and animals (Fujita et al., 2012; Aydin et al., 2014; Grummer et al., 2014). The MSC model is independent of gene concatenation and acknowledges the very well known fact that gene trees have independent evolutionary histories embedded within a shared species tree (Degnan and Rosenberg, 2006; Rosenberg, 2013). The basic MSC model assumes that gene tree discordance is solely the result of stochastic coalescence of gene lineages within a species phylogeny. Populations, rather than alleles sampled from single individuals, are the units to infer phylogeny in the MSC framework, effectively connecting traditional phylogenetic inference with population genetics, providing estimates of topology, divergence times and population sizes (Rannala and Yang, 2003; Edwards et al., 2007; Heled and Drummond, 2010).

Current microbial speciation models predict that bacterial species-like lineages should be identifiable by significantly reduced gene flow between them, even when recombination levels are high within species. Such lineages should also display

differentiated ecological niches (Koeppel et al., 2008; Cadillo-Quiroz et al., 2012; Shapiro and Polz, 2014). This study shows the power of modern phylogenetic and population genetic methods to delimit species borders in bacteria and demonstrates that the SMC, as currently defined in pubmlst.org, genome databases and literature, contains multiple genospecies that are ecologically and phenotypically differentiated. We discuss our findings and approaches in the light of current models of bacterial speciation, highlighting the practical implications and ecological relevance of proper species delimitation.

MATERIALS AND METHODS

Sampling Sites and Isolation of Environmental *Stenotrophomonas* Strains

Stenotrophomonas strains were recovered from the sediments and water columns at six sites of four rivers and streams in the State of Morelos, Central Mexico (Table 1 and Supplementary Figure S1). These sites experience different levels of anthropogenic pollution, broadly classified as low (L), intermediate (I) and high (H), based on triplicate counts of thermo-tolerant coliforms (TTCs) on mFC agar (Oxoid). Thermotolerant *Escherichia coli* (TTEc) counts were obtained on modified m-TEC agar (USEPA, 2002), using the one-step membrane filtration (0.45 μm) method (APHA, 2005). Water samples were taken in sterilized 1L recipients at 5–20 cm depth (2 per site). Six physico-chemical parameters of the water columns were measured using a HANNA multi-parametric HI9828 instrument operated in continuous measurement mode, for 1 min, along a 10 m transect (Supplementary Figure S2). Sediment samples (3 per site, along a 3 m linear transect) were taken from the same sites in sterile plastic cores dug 2–3 cm deep into the sediment. Samples were kept on ice until processing within 4–8 h (APHA, 2005). Sampling took place at the end of the dry season (April–May), between 2012 and 2014. Oligotrophic [NAA (Aagot et al., 2001) and R2A (Ultee et al., 2004) agar] and rich media [LAM (Jawad et al., 1994) and MacConkey], supplemented or not with antibiotics [trimethoprim 30 carbenicillin 100, ciprofloxacin 4, ceftazidime 8, cefotaxime 4, imipenem 4 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)] were used to isolate bacteria from these samples by plating 100 μl of serial dilutions

(1 to 10e^{-4}) in triplicate for each sample and incubation at 30°C for up to 48 h. Single colonies were repeatedly streaked on the same media for strain purification. Bacteria were routinely grown on LB and stored frozen in this medium supplemented with 20% (V/V) glycerol at -80°C .

Determination of Antibiotic Resistance and β -Lactamase Expression Profiles

A total of 15 antimicrobials from 6 families and two inhibitor/ β -lactamase combinations were used to determine the resistance profiles of each strain by streaking them in parallel on agar plates supplemented with the antibiotics and concentrations indicated in Supplementary Table S1. Double disk synergism (DDS) assays were performed to determine the expression phenotypes of specific β -lactamase types [Ambler class A extended spectrum beta-lactamases (ESBLs), class B metallo- β -lactamases (MBLs) and class C cephalosporinases (AmpC)], as detailed in the legend to Supplementary Figure S11. The antibiotic breakpoint concentrations and growth inhibition zones were interpreted according to the 26th edition of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2016) values for *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas aeruginosa* or *Enterobacteriaceae*, when not available for the first or second genus, respectively (cutoff values are shown in Supplementary Tables S1, S2).

PCR Amplification of 16S rDNA Sequences and Their Phylogenetic Analysis

All strains recovered were classified at the genus level by phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene (*rrs*) sequences amplified with the universal fD1/rD1 primers (Weisburg et al., 1991), as previously described (Vinuesa et al., 2005a), and detailed in the supplementary material (Supplementary Protocol 1).

PCR Amplification and Maximum Likelihood Phylogenetic Analysis of Multilocus Sequence Data

For multilocus sequence analysis (MLSA) of environmental *Stenotrophomonas* isolates we used the primers and conditions reported at <http://pubmlst.org/smaltophilia/>, except for

TABLE 1 | Sampling sites for this study in Morelos, Mexico and pollution level based on counts of thermotolerant fecal coliforms (TTFc) and thermotolerant *E. coli* (TTEc) colony forming units (cfu/100 ml) measured in the water column.

River	Site name	Code	Coordinates ^a	TTFc ^b	TTEc ^c	PoLevel ^d
Apatlaco	Temixco	TEX	18°51'14.4"N 99°13'20.4"W	5.66e5	3.6e5	H
Apatlaco	Zacatepec	ZAC	18°38'23.4"N 99°11'44.5"W	5.34e5	3.2e5	H
Sauces	Los Sauces (river)	SAU	18°41'50.0"N 99°07'45.7"W	240	97	L
Sauces	Los Sauces (flooded soil)	SAUr	18°41'50.0"N 99°07'45.7"W	966	166	L
Estacas	Las Estacas	EST	18°43'57.5"N 99°06'48.3"W	83	17	L
Yautepec	Bonifacio García	YAU	18°43'24.0"N 99°06'53.3"W	1.96e3	833	I

^aSee supplementary Figure S1 for maps and pictures of the sampling sites. ^bThermo-tolerant fecal coliform counts were performed on mFC agar using the membrane-filtration method. ^cThermo-tolerant *E. coli* counts were performed on mTEC agar using the membrane-filtration method. ^dPollution level, coded as high (H > 1000), intermediate (200 < I < 1000) and low (L < 200), based on the colony forming units (cfu) of thermo-tolerant *E. coli*.

the mutM_steno_6F (5'-ytdcccgaagtmgaaacyac-3') and mutM_steno_684R (5'-gcagyctctgytcaartacc-3') primers, which were designed *de novo* using the Primers4Clades server (Contreras-Moreira et al., 2009) fed with *mutM* orthologues identified using the GET_HOMOLOGUES package (Contreras-Moreira and Vinuesa, 2013) from *Stenotrophomonas* genome sequences (data not shown). PCR amplicons were purified and commercially sequenced at both strands by Macrogen, (South Korea). Raw reads were assembled with the phredphrap script (de la Bastide and McCombie, 2007), codon-based multiple sequence alignments (MSA) generated with an in-house Perl script, and MSA borders stripped to match the reference pubmlst.org profiles. Individual gene alignments were concatenated and the resulting matrix subjected to model selection with jModelTest2 (Darriba et al., 2012) for phylogenetic analysis under the maximum likelihood criterion in PhyML3 (Guindon et al., 2010). Tree searches were initiated from 1000 random seed trees and a BioNj phylogeny, under the BEST moves option, as previously described (Vinuesa et al., 2008).

Identification of the 7 MLSA Loci in Genome Sequences Retrieved from GenBank

We selected 24 complete (Crossman et al., 2008; Lira et al., 2012; Zhu et al., 2012; Davenport et al., 2014; Vinuesa and Ochoa-Sánchez, 2015) and draft (Patil et al., 2016) genome sequences available in GenBank to expand our dataset with additional key reference strains. The orthologs of the seven MLSA loci were identified from single-copy homologous gene clusters computed with the GET_HOMOLOGUES package (Contreras-Moreira and Vinuesa, 2013). We found that the *gap* gene in the draft genome sequence of strain *S. ginsengisoli* DSMC24757^T (Acc. No. LDJM00000000) (Patil et al., 2016) contains a thymidine insertion at position 602 that causes a frame-shift mutation and a premature end of the gene. Consequently, the last 72 sites of this sequence were re-coded as '?' (missing characters).

Sequence Data Availability

The sequences generated in this study for multilocus sequence analysis were deposited in GenBank under accession numbers KX895367-KX896038.

Bayesian Species Delimitation Using the Multispecies Coalescent and Bayes Factors

Bayesian species delimitation from multilocus data under the MSC model was performed using the recent *BEAST2 module (version 0.7.2) for BEAST 2 (Heled and Drummond, 2010; Bouckaert et al., 2014), to evaluate a set of explicit hypotheses of species-boundaries. *BEAST2 was run using the best fitting partitioning scheme (see Supplementary Protocol 2) and the TrN+G model with empirical frequencies, without rate estimation. Trees were unlinked across partitions, setting the ploidy level to 1 for each gene tree and assuming a constant IO population model. A non-correlated relaxed log-normal clock (Drummond et al., 2006) was assumed for each partition, fixing

the clock rate of the first partition and estimating the remaining ones. A non-calibrated Yule prior was set on the species tree. The default 1/x population mean size prior was changed for a proper inverse gamma prior (Baele et al., 2013), with shape parameter $\alpha = 2$ and scale parameter $\beta = 2$ and an initial value of 0.05. The upper and lower bounds were set to 0.001 and 1000.0, respectively. Path sampling was used to estimate the marginal likelihoods of each species delimitation model in *BEAST2 runs for BF calculations (Lartillot and Philippe, 2006; Baele et al., 2012; Grummer et al., 2014), with the MODEL_SELECTION 1.3.1 package. Each *BEAST2 chain was run for 10^8 generations, sampling the posterior every 20000th, with 10 replicate runs and the alpha value set to 0.3, applying 50% burnin. A final triplicate *BEAST2 analysis was set up to get the final estimate of the multispecies phylogeny under the best delimitation model with the same parameters, priors, chain length and sampling frequency described above. Convergence and mixing of replicate runs was checked in tracer², as well as the effective sample size values for each parameter. The species tree corresponding to the best species-delimitation hypothesis was visualized with densitree (Bouckaert, 2010), on combined post-burnin (50%) species tree files generated with logcombiner. A summary tree was generated from the latter with treannotator and visualized with FigTree v1.4.2³.

DNA Polymorphism, Population Structure and Recombination Analyses

Descriptive statistics for DNA polymorphisms, population differentiation, gene flow, diverse neutrality and population growth tests, as well as coalescent simulations, were computed with DNAsp v.5.10.01 (Rozas et al., 2003), as previously described (Vinuesa et al., 2005b). Bayesian analysis of population structure based on multilocus sequence data was performed in STRUCTURE v2.3.4 under the admixture and correlated gene frequencies models (Pritchard et al., 2000; Falush et al., 2003, 2007). Twenty runs were launched for each *K* value between 2 and 10, with 10^5 steps sampled after a burnin of 2×10^5 chain iterations. The best *K* value was defined by the Evanno (Evanno et al., 2005) and Pritchard (Pritchard et al., 2000) methods, as implemented in CLUMPAK (Kopelman et al., 2015). Estimation of recombination rates of selected lineages was performed with ClonalFrameML v1.0.9 (Didelot and Wilson, 2015), using ML trees and Ti/Tv ratios estimated under the HKY85+G model with PhyML3 (Guindon et al., 2010).

Statistical Analyses

All statistical and graphical analyses were performed with base R (R Development Core Team, 2016) and add-on packages. Basic data manipulation, transformation and graphical displays were achieved with functions of the tidyverse metapackage⁴. Tests for normality, homoscedasticity, outliers and skew were performed

²<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>

³<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>

⁴<https://CRAN.R-project.org/package=tidyverse>

with the *car*⁵ and *moments*⁶ packages. Robust ANOVA and associated *post hoc* analyses (Wilcox, 2016) were performed with the *WRS2* package⁷. Empirical distributions of test statistics were generated by bootstrapping with the *boot* package⁸. Multivariate association plots for categorical data were performed with the *vcd* package⁹. Multiple correspondence analysis (MCA) was performed with the *FactoMineR*¹⁰ and *factoextra* packages¹¹.

RESULTS

Evaluation of Different Isolation Media for the Recovery of *Stenotrophomonas* from Aquatic Ecosystems with Contrasting Degrees of Fecal Contamination

We sampled 6 sites located in four rivers/streams of Morelos (Supplementary Figure S1) that were ranked into three categories based on their pollution level (low, intermediate, high), based on counts of thermotolerant fecal coliforms and *E. coli* (Table 1). Additional physicochemical parameters of each sampling site are presented in Supplementary Figure S2. Classification of the isolates at the genus level was based on the phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequences ($n = 697$), as shown in Supplementary Figure S3. *Stenotrophomonas* was the second most abundant genus ($n = 154$, 22.1%) recovered in our collection, after *Pseudomonas* ($n = 239$, 34.3%), as shown in Supplementary Figure S4. The inset in Supplementary Figure S4 shows a Trellis barplot summarizing the relative efficiency of the different microbiological media tested for the recovery of *Stenotrophomonas*. The analysis reveals that environmental *Stenotrophomonas* strains can be efficiently recovered on the oligotrophic NAA medium supplemented with imipenem (8 $\mu\text{g/ml}$; >90% recovery efficiency). The rich McConkey medium amended with imipenem is also useful (4 $\mu\text{g/ml}$; ~60%), selecting non-fermenting (whitish) colonies.

Phylogenetic Structure of the Genus *Stenotrophomonas* and the Definition of Species Border Hypotheses

We used intense maximum likelihood (ML) tree searching (see Materials and Methods) to obtain a global hypothesis of the phylogenetic structure of the genus based on 194 non-redundant multilocus STs (Figure 1). This dataset contains sequences retrieved from pubmlst.org (seven loci for 103 STs representative of all the “classic” genogroups and clusters defined in previous works (Kaiser et al., 2009; Vasileuskaya-Schulz et al., 2011), plus 24 selected reference strains from different species for which

the genome sequences were retrieved from GenBank and the 7 loci extracted, as explained in methods. This comprehensive set of reference strains comprises 11 out of 12 validly describes species of the genus as of April 2017. Recently *S. tumulicola* (Handa et al., 2016) was added to the list¹² (last access April 10th, 2017), which is the only species missing from our analysis, as it lacks a genome sequence or MLSA data in pubmlst.org. To this set we added the sequences generated in this study for 108 environmental isolates from Mexican rivers, comprising 63 haplotypes (distinct multilocus sequence types). Figure 1A presents the best hypothesis found among 1001 independent tree searches (the lnL profile of the tree search is shown in Supplementary Figure S5A), displaying the Smc clade in collapsed form. The ML tree was rooted using four *Xanthomonas* species as the outgroup, chosen based on the evidence of a comprehensive ML phylogeny of nearly full-length 16S rRNA gene sequences for all type strains currently described in the order *Xanthomonadales* (Supplementary Figure S6). *S. panacihumi* (Yi et al., 2010) represents the most basal lineage of the genus, which is consistent with its position on the 16S rRNA gene phylogeny (Supplementary Figure S6). However, this species was described based on the *rrs* sequence analysis of a single isolate and currently has a non-validated taxonomic status. Two large clades follow, labeled I and II on Figure 1A. All species grouped in clade I are of diverse environmental origin, lacking strains reported as opportunistic pathogens. Three of our environmental isolates tightly cluster with the type strain of *S. acidaminiphila* (Assih et al., 2002), including strain ZAC14D2_NAIMI4_2, for which we have recently reported its complete genome sequence (Vinuesa and Ochoa-Sánchez, 2015). The type strain of this species (AMX19^T, LMG22073^T) was isolated from the sludge of a lab-scale anaerobic chemical waste water reactor in Iztapalapa, Mexico City, 1999 (Assih et al., 2002). A single isolate of our collection is phylogenetically related to *S. humi*, while 7 others form a perfectly supported clade with the type strain of *S. terrae* (Heylen et al., 2007). In conclusion, all environmental isolates grouped in clade I were conservatively classified as indicated by the labeled boxes on Figure 1A, based on the very strong support of the monophyletic clusters formed with the corresponding type strains.

Clade IIa groups strains of *S. chelatiphaga* and *S. rhizophila* and clade IIb groups strains of the *S. maltophilia* complex (Figure 1A). Both of them hold human opportunistic pathogens and environmental isolates, and suffer from taxonomic problems. The taxonomic inconsistency of classifying strains of genogroups #8 and #10 as *S. maltophilia* was previously recognized (Vasileuskaya-Schulz et al., 2011). They cluster within the *S. chelatiphaga*–*S. rhizophila* clade, making *S. maltophilia* polyphyletic. *S. maltophilia* strains of genogroup #8 were already recognized to belong to *S. rhizophila*, but the taxonomic status of its sister clade, genogroup #10, holding strains labeled as *S. maltophilia*, was not clarified (Vasileuskaya-Schulz et al., 2011).

Figure 1B shows the same phylogeny presented in Figure 1A, but collapsing clades I and IIa, and displaying the Smc strains grouped in cluster IIb. All terminal clades containing only

⁵<https://cran.r-project.org/package=car>

⁶<https://cran.r-project.org/package=moments>

⁷<https://cran.r-project.org/package=WRS2>

⁸<https://cran.r-project.org/package=boot>

⁹<https://cran.r-project.org/package=vcd>

¹⁰<https://cran.r-project.org/package=FactoMineR>

¹¹<https://cran.r-project.org/package=factoextra>

¹²www.bacterio.net/stenotrophomonas.html

reference sequences were also collapsed to avoid excessive cluttering. Supplementary Figure S5B displays the same tree but without collapsing those clusters. The Smc clade was conservatively split into 5 potential species (labeled boxes in **Figure 1B**) based on the deep and strongly supported branches subtending MLSA phylogroups Smc1-Smc4, and taking into account the location of the well characterized *S. maltophilia* model strains K279a (Crossman et al., 2008), D457 (Lira et al., 2012) and the type strain of the species ATCC 13637^T (Davenport et al., 2014). The latter three are spread across the clade labeled as *S. maltophilia* (**Figure 1B**). Each of the phylogroups Smc1 to Smc4 currently holds ecologically coherent groups of strains: Smc1 and Smc2 contain exclusively Mexican river isolates recovered in this study, Smc3 groups cystic fibrosis isolates and Smc4 predominately rhizosphere isolates from diverse plants and parts of the world. In contrast, the large *S. maltophilia* clade holds heterogeneous groups of isolates of clinical and environmental origin, including the previously defined MLSA phylogroups A to E (Kaiser et al., 2001; Vasileuskaya-Schulz et al., 2011) and AFLP genogroups #1 to #10 (Hauben et al., 1999). We conservatively define a new MLSA phylogroup F, comprising isolates of clinical and environmental origin from different continents, but dominated by river isolates reported herein (**Figure 1B**). We note that *S. pavanii* DSM 25135^T, an endophytic N₂-fixing bacterium isolated from sugarcane in Brazil (Ramos et al., 2010), is clearly nested within genogroup #1, closely related to the reference strain *S. maltophilia* D457 (**Figure 1B**). This represents an additional taxonomic inconsistency for the *S. maltophilia* clade not previously reported. Here we suggest

that *S. pavanii* is a late heteronym of *S. maltophilia*. *S. africana*, nested within genogroup #4, had already been described as a later heterotypic synonym of *S. maltophilia* (Coenye et al., 2004; Kaiser et al., 2009), the same as *Pseudomonas beteli* 962^T, related to MLSA genogroup E, and *P. hibiscicola* ATCC19867, related to genogroup #3 (Hauben et al., 1999; Vasileuskaya-Schulz et al., 2011). The latter two species were already recognized in 1990 to be misclassified based on the analysis of an extensive set of phenotypic features, being synonyms of *S. maltophilia* (Van Den Mooter and Swings, 1990). The taxonomic status of *S. tumulicola* (Handa et al., 2016) could not be revised in the present work because it lacks multilocus sequence data.

Bayesian Species Delimitation Based on the Multispecies Coalescent (MSC) Model and Bayes Factor (BF) Analysis of Marginal Likelihoods

We used a recent software implementation of the MSC model (Heled and Drummond, 2010; Bouckaert et al., 2014) to test the explicit species delimitation hypotheses highlighted in **Figures 1A,B** by means of BF analysis of marginal likelihoods (Grummer et al., 2014) in a formal Bayesian statistical framework. The best partitioning scheme (see Supplementary Protocol 2 and Figure S7) was used for all *BEAST2 runs. Of particular interest to this work was the evaluation of the following five species delimitation hypotheses within the Smc: split1 (species assignments as defined by the shaded areas on **Figures 1A,B**), lump_*S. maltophilia*+Smc1,

TABLE 2 | Bayes factor (BF) analysis for five species delimitation hypotheses within the *S. maltophilia* complex, plus genogroups #8 and #10, based on marginal likelihoods computed for each hypothesis by path sampling (see Materials and Methods).

Species model ^a	marginal lnL estimate	Model rank	ln-BF ^b (vs. best)	ln-BF ^c (vs. previous)
split1	-31347.16515	1 (best)	NA	NA
lump_Smal+Smc1	-31384.34206	2	4.308835**	4.308835** (2 vs. 1)
lump_Smal+Smc12	-31498.71633	3	5.714071****	5.432623*** (3 vs. 2)
lump_Smal+Smc123	-31521.18269	4	5.852303***	3.805166** (4 vs. 3)
lump_Smal+Smc1234	-31593.24923	5	6.19882***	4.970737** (5 vs. 4)

^aThe best (split1) model assumes that genogroup #10 is a sister clade of *S. rhizophila* (**Figure 1A**) and splits the Smc into *S. maltophilia* (Smal) and four additional species clades (Smc1-Smc4), according to **Figure 1B**. The following models consecutively lump the *S. maltophilia* clade with the Smc1-Smc4 clades, with lump_*S. maltophilia* + Smc1234 representing the whole *S. maltophilia* complex as a single species (**Figures 1A,B**). The marginal lnL for the Lump_clades_#8+#10 model is -31465.00904, resulting in a ln-BF = 5.462508*** when compared against the split1 (best) model. ^bThe ln-Bayes factors are computed based on the marginal likelihood estimates $\ln\text{-BF} = \log(2(M_0 - M_1))$, where M_0 is the best model (model 1), which is compared against each of the following ones. * indicates positive support [$\ln(\text{BF})$ is in the range of 1.1–3]; ** indicates strong support [$\ln(\text{BF})$ is in the range of 3–5]; *** indicates overwhelming support [$\ln(\text{BF}) > 5$]. ^cThe ln-Bayes factors are computed as described above, but involve M_0 as the model preceding model M_1 from the ranked model list. NA, not applicable.

TABLE 3 | McDonald–Kreitman (MK) neutrality tests, genetic differentiation and gene flow estimates between environmental isolates of the Smc1, Smc2 and *S. maltophilia* (Smal) lineages of the *S. maltophilia* complex recovered from Mexican rivers based on the concatenated dataset (3591 sites).

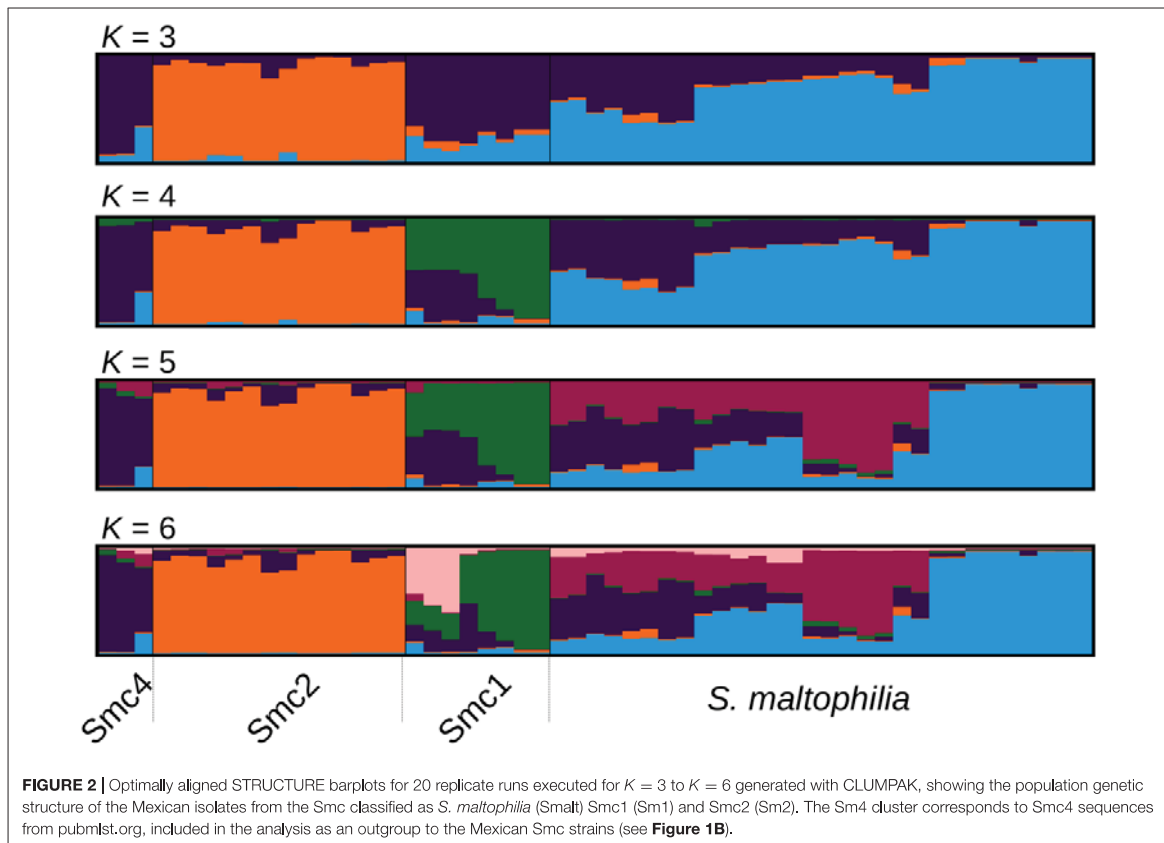
Lineages	No. Fixed diffs.	Dxy	^a K* _{ST}	F _{ST}	Nm	Ni	G	^b p-value
Smc1-Smc2	45	0.04616	0.13791***	0.57819	0.36	0.328	6.709	0.00959**
Smc1-Smal	9	0.04542	0.06654***	0.43022	0.66	0.247	3.133	0.07672
Smc2-Smal	28	0.04924	0.09508***	0.59384	0.34	0.312	6.020	0.02515*

Dxy is the interpopulation genetic distance. K*_{ST} is Hudson's index of population genetic differentiation. F_{ST} is the fixation index. Nm represents the number of migrants per generation. Ni is the neutrality index and G is the likelihood ratio or G-test of independence. ^aThe significance of the estimated statistic was computed using the permutation test with 10000 iterations. ^bp-values for the G-test. *p-value < 0.05; **p-value ≤ 0.01; ***p-value ≤ 0.001.

lump_*S. maltophilia*+Smc12, lump_*S. maltophilia*+Smc123, lump_*S. maltophilia*+Smc1234, which successively lump the *S. maltophilia* sequence cluster with the proposed Smc1-Smc4 genospecies (Table 2 and Figure 1B). Analysis of the logfiles for the path sampling runs for each model and replicate had effective sample size (ESS) values > 150 for all parameters, most of them with ESSs >> 500. As shown in Table 2, the split1 hypothesis was the favored one as it attained the highest marginal likelihood. The BF analysis provides overwhelming evidence (Table 2) that the Smc, as actually defined in pubmlst.org, lumps multiple cryptic species, strongly supporting the species delimitation hypothesis presented in Figure 2, which conservatively splits the complex into the five species: *S. maltophilia* and the four new lineages Smc1, Smc2, Smc3, and Smc4. Smc1 and Smc2 contain only Mexican representatives of environmental *Stenotrophomonas* sampled in this study. The split1 vs. lump_cluster#8+cluster#10 (Figure 1A) model was also evaluated, providing overwhelming evidence in favor of separating the two genogroups #8 and #10 as distinct species ($\ln\text{-BF} > 5$, Table 2). Supplementary Figures S8, S9 show the consensus and DensiTree (see Materials and Methods) species tree representations, respectively, of the merged (3 replicate runs), post-burnin (50%) samples, for the best hypothesis.

Population Genetic Structure Analysis of Mexican Environmental *S. maltophilia* Complex Isolates

In order to challenge the results of the MSC-based species delimitations presented in the previous section, we performed a Bayesian population clustering analysis on all Mexican isolates grouped within the Smc clade (Figure 1B) using STRUCTURE (see Materials and Methods). We included also the Smc4 lineage, identified among pubmlst.org sequences, as an outgroup control. Figure 2 shows the optimally aligned STRUCTURE barplots for the 20 replicate runs made for the indicated K values, depicting the ancestry proportions of each individual. Evanno's delta- K method estimated an optimal number of 3 clusters, while Pritchard's method suggested an optimal $K = 6$. This analysis uncovered a strong population subdivision of the Mexican Smc isolates, which is consistent with the MSC-based species delimitation (Figure 1B). Given the independent evidence from the MSC analysis, we favor a conservative $K = 4$, as it consistently resolves the same 4 clusters classified as distinct species by the phylogenetic approach (*S. maltophilia*, Smc1, Smc2, and Smc4). Detailed inspection of the barplots reveals that already at $K = 4$ an important substructure exists within the *S. maltophilia* and



Smc1 lineages. At $K = 6$ the Mexican *S. maltophilia* population gets subdivided into three clusters, while Smc1 is split into two subgroups. Clear evidences of admixture exist in both clades, suggesting that gene flow and recombination might be at play in these clusters.

McDonald–Kreitman (MK) Neutrality Test, Genetic Differentiation and Gene Flow Estimates between Pairs of Environmental Lineages of the *S. maltophilia* Complex

To determine the statistical support of the major clusters revealed by STRUCTURE we computed the K^*_{ST} index of population genetic differentiation (Hudson et al., 1992) between them. The results presented in Table 3 indicate that the Smc1, Smc2 and *S. maltophilia* lineages are strongly differentiated ($p < 0.001$) based on the K^*_{ST} index, with multiple fixed differences between populations (range 9 – 45) and mean population divergences (D_{xy}) $> 4.5\%$. The high F_{ST} fixation indices (range 0.43 – 0.59) further denote very strong population differentiation. This is consistent with the low numbers of effective migrants per generation estimated (Nm range 0.34 – 0.66), indicating limited genetic flux between these lineages. We applied the MK test (McDonald and Kreitman, 1991) and computed the “neutrality index” (NI) (Rand and Kann, 1996) to test if the observed polymorphisms between pairs of lineages have evolved by the accumulation of neutral mutations by random drift, the fixation of adaptive mutations by selection, or a mixture of the two. As shown in Table 3, the G and NI indices for pairwise species comparisons indicate that fixed differences between species are due to non-synonymous differences more often than expected, suggesting that positive selection may be driving divergence of Smc1 and *S. maltophilia* from Smc2. This signal is not significant ($p = 0.077$) for the Smc1 and *S. maltophilia* comparison.

Comparative Analysis of DNA Polymorphisms and Recombination Rates across the *S. maltophilia* Complex (Smc) and *S. terrae* Lineages

Table 4 presents basic descriptive statistics of DNA polymorphisms, neutrality and population growth tests computed for the Mexican populations/genospecies with ≥ 10 isolates (Smc1, Smc2, *S. maltophilia* and *S. terrae*). Based on their average nucleotide diversity per site (π) values, the

lineages sort in the following decreasing order of diversity: *S. maltophilia* $>$ Smc1 $>$ *S. terrae* $>$ Smc2. The high π values, high numbers of haplotypes (h) and the high haplotype diversity values (Hd) consistently reveal that species in the genus comprise notoriously diverse gene pools. Tajima’s D values are all negative, but non-significant, suggesting that the loci are either under purifying selection or that populations are undergoing expansions. We used the R_2 population growth test statistic (Ramos-Onsins and Rozas, 2002) to test the null hypothesis of constant population size. Since all p -values were > 0.1 , there is no evidence of population expansion.

Table 5 shows the estimates for R/θ , the ratio between the mean number of recombination to mutation events. The ratios are > 1 (except for *S. terrae*) and for Smc2 and *S. maltophilia* the recombination events are estimated to be almost twice and nearly three times the number of mutation events, respectively. This indicates that homologous recombination events introduce significantly more polymorphisms into the *Stenotrophomonas* genomes than point mutations. The inverse mean DNA import length estimates ($1/\delta$) suggest that on average rather long sequence stretches are affected by recombination (range 375–1472 nt), with a considerable mean sequence divergence (range 0.009–0.065).

High Diversity of Novel STs among the Mexican Smc Isolates

The allele numbers and STs were determined for each of the 77 isolates in the Smc (Smc1 = 11, Smc2 = 15 and *S. maltophilia* = 51) recovered from Mexican rivers, by comparing them with the corresponding 177 STs and associated alleles downloaded from pubmlst.org (as of November 18th, 2016) using an in house Perl script. A high diversity of new alleles was discovered, as summarized in Supplementary Table S3.

TABLE 5 | Recombination estimates for environmental isolates of the Smc1, Smc2, *S. maltophilia* (Smal) and *S. terrae* (Sterr) lineages recovered from Mexican rivers based on the concatenated dataset (3591 sites).

Lineages	R/theta	1/delta	nu
Smc1	1.10774 (0.07076)	0.0006789 (3.213e-08)	0.0152529 (7.570e-07)
Smc2	1.89989 (0.12028)	0.0009080 (3.121e-08)	0.00864951 (3.081e-7)
Smal	2.95326 (0.10044)	0.0010379 (1.302e-08)	0.0129774 (1.648e-7)
Sterr	0.87233 (0.05113)	0.0021663 (3.443e-07)	0.0650391 (1.2279e-5)

The figures indicate the posterior mean and their variances are shown in parentheses.

TABLE 4 | Descriptive statistics of DNA polymorphisms, neutrality and population growth tests for environmental isolates of the Smc1, Smc2, *S. maltophilia* (Smal) and *S. terrae* (Sterr) lineages recovered from Mexican rivers based on the concatenated dataset (3591 sites).

Species	No. Seqs	S	Eta	π	h/Hd	Theta /site	Tajima’s D	R_2	p-value
Smc1	11	258	280	0.02502	9/0.945	0.02662	−0.29156 (NS)	0.1390	0.45
Smc2	15	173	185	0.01393	14/0.990	0.01584	−0.45427 (NS)	0.1199	0.19
Smal	51	500	560	0.02652	33/0.929	0.03470	−0.85761 (NS)	0.0903	0.17
Sterr	10	318	328	0.02388	7/0.067	0.04455	−1.30647 (NS)	0.1482	0.49

The p -values for the R_2 statistic were estimated using 10000 coalescent simulations assuming an intermediate level of recombination.

Only the ST139, displayed by the Mexican *S. maltophilia* isolate ESTM1D_MKCAZ16_6, was previously reported in pubmlst.org, highlighting the novelty of the genotypes recovered in this study. A single entry is currently found in pubmlst.org for ST139, which corresponds to the Spanish isolate S3149-CT11 (id 220), recovered in 2007 from a surgical wound of a patient treated in an hospital from Barcelona. The Mexican Smc strains add 56 new STs (numbers 178 – 233) to those reported in the pubmlst.org database, with ST219 being the most prevalent one (see Supplementary Tables S3, S4 and Figure S10), shared by 9 isolates recovered from the sediments of the highly contaminated TEX site (Table 1), both on MK and NAA media.

Multivariate Association Mapping of Species, Antimicrobial Resistance Phenotypes and Habitat Preferences by Multiple Correspondence Analysis (MCA)

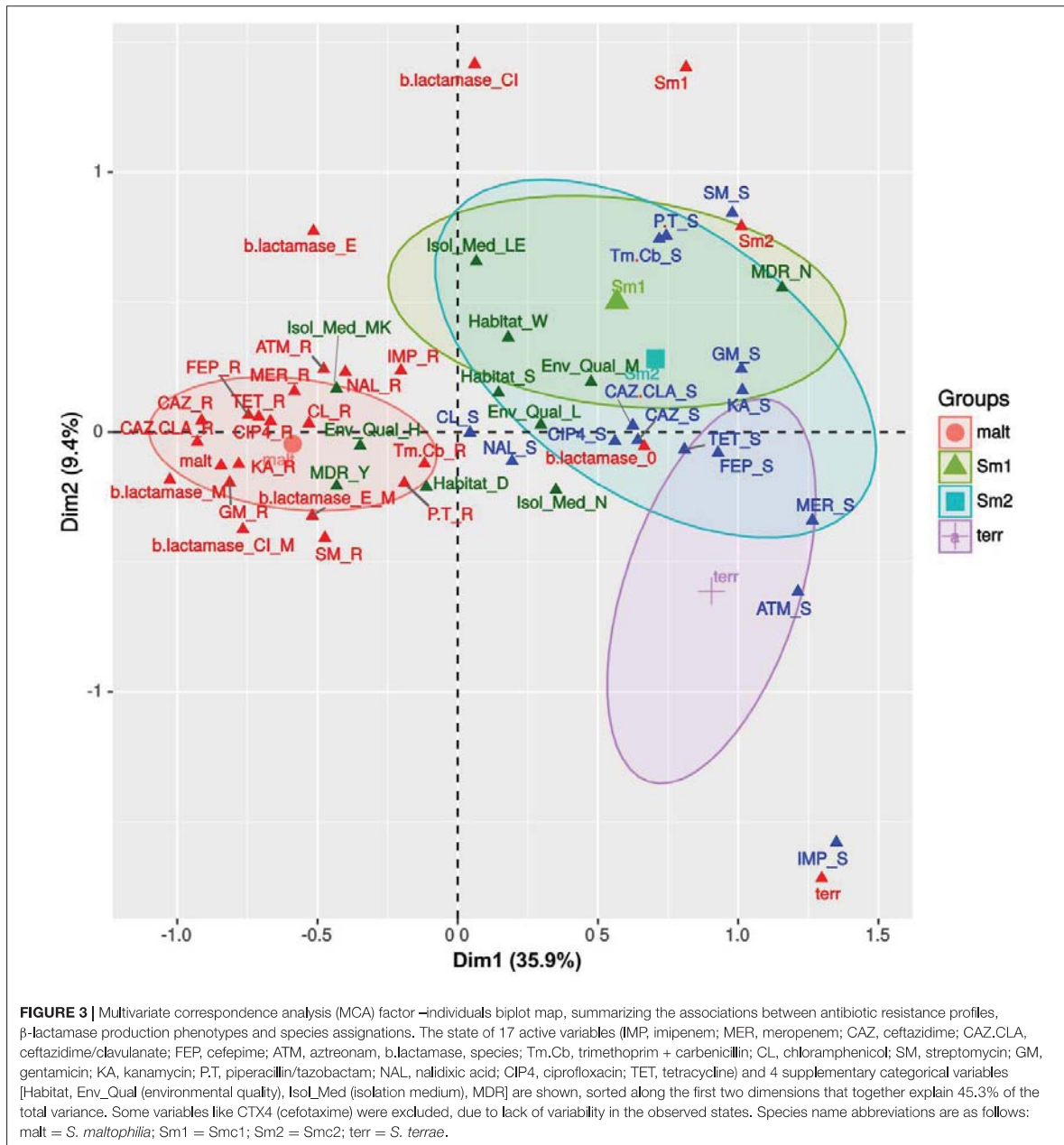
We used MCA to visualize the associations between the antibiotic resistance profiles, β -lactamase production phenotypes (Supplementary Figure S11), habitat preferences and species assignments (Figures 1A,B) made for the Mexican *S. maltophilia*, Smc1, Smc2 and *S. terrae* isolates (all with > 10 isolates/species). Figure 3 depicts the MCA factor-individual biplot resulting from the analysis of 17 active variables and 4 supplementary categorical variables, listed in the figure caption. The clouds of individuals for each species were hidden (visible in Supplementary Figure S12) to avoid over-plotting, but the 95% confidence intervals (CIs) for species are shown as color-coded ellipses. The first two dimensions explain 45.3% of the variance, the first dimension accounting for >3.8 times the variability explained by the second and following ones, as shown in the screeplot presented in Supplementary Figure S13A. The variable plot depicted in Supplementary Figure S13B reveals that the active variable species is the most correlated one with the first two dimensions, indicating that their resistance profiles and β -lactamase expression phenotypes are distinct. The variables GM, KA, MER, FEP, TET, ATM (abbreviations defined in the legend to Figure 3), β -lactamase expression and the MDR condition are strongly correlated with the first component, while IMP and SM are the variables most strongly associated with the second dimension (Supplementary Figure S13B). Figure 3 shows that the *S. maltophilia* (malt) strains form a distinct and independent cloud that is characterized by a very strong association with a resistance status to the following antibiotics: CAZ, CAZ.CLA, GM, FEP, GM, KA, and SM. It is also strongly associated with the MDR condition and metallo- β -lactamase production. The latter are the most-strongly contributing variables for the delimitation of this group, as depicted in the variable-categories MCA map presented in Supplementary Figure S14. *S. maltophilia* shows a preference for the sediments of contaminated sites. The resistance phenotypes and habitat preferences of the Smc1 and Smc2 lineages largely overlap, those of *S. terrae* being more differentiated, but partially overlapping with the 95% CI ellipse for Smc2. The Smc1 and Smc2 lineages are strongly associated with non-MDR, aminoglycoside, P.T. and Tm.Cb sensitivity, showing a preference for the water

column of clean or moderately contaminated sites (Figure 3 and Supplementary Figure S13). The *S. terrae* isolates are distinctly and strongly associated with carbapenem and ATM sensitivity (Figure 3 and Supplementary Figure S14). The statistical significance of these antibiotic resistance and habitat preference patterns will be formally tested in the following sections.

Only *S. maltophilia* Is Truly Multidrug-Resistant (MDR) and Isolates from Polluted Sites Express Resistance to More Antibiotic Families

We performed one-way ANOVA analyses to evaluate differences (i) in the mean number of resistances to individual antibiotics (NumR), (ii) in the mean number of distinct drug families (NumFam) across species, and (iii) to determine whether *S. maltophilia* isolates recovered from high and low pollution sites have the same NumR and NumFam. Figures 4A,B,E,F display violin and boxplots for the raw count data, which revealed skewed, non-normal distributions, with a few outliers. Key assumptions (homoscedasticity and normality) made by standard one-way ANOVA were formally tested (Supplementary Tables S5, S6), which confirmed multiple cases of highly significant departures from normality. Consequently, we performed robust one-way ANOVA (Wilcox, 2016) using trimmed means ($tr = 0.2$) and bootstrap ($nboot = 2000$) to simulate the distribution of the trimmed sample means and compute the appropriate critical values for the confidence intervals (95% CIs). Figures 4C,D depict mean plots with 95% CIs for the NumR and NumFam, respectively, across the four species with >10 isolates. These clearly show that *S. maltophilia* strains express significantly higher mean_(tr = 0.2) NumR (12.63) and NumFam (4.66) than the other three species, only *S. maltophilia* being truly MDR. Highly significant results for both the NumR [$F_t = 176.3447$, $p = 0.0$ Variance explained (σ^2) = 0.821; effect size ($e.s.$) = 0.906] and NumFam ($F_t = 32.2755$, $p = 0$; $\sigma^2 = 0.511$; $e.s. = 0.715$) were obtained, thus rejecting the null hypothesis of equal trimmed means for both variables across species, and revealing huge effect sizes (>0.8). A Wilcox robust *post hoc* test of the trimmed mean NumR and NumFam comparisons across pairs of species confirms that all those involving *S. maltophilia* are very highly significant ($p = 0$; Supplementary Figures S15A,B and Tables S7, S8), as indicated by asterisks on the mean_(tr = 0.2) plots shown in Figures 4C,D.

Sample sizes for *S. maltophilia* isolates recovered from sites with high and low pollution were large enough (Figure 4E) to test the hypothesis of equal NumR and NumFam conditional on pollution level. We used the robust *yuenbt* ($tr = 0.2$, $nboot = 998$) method for independent mean comparisons (Wilcox, 2016). The tests for NumR [$T_y = 2.1964$, $p = 0.038$; mean_(tr = 0.2) difference = 1.233, $CI_{95\%} = (0.0663, 2.4004)$, $e.s. = 0.43$] and for NumFam [$T_y = 2.6951$, $p = 0.022$; mean_(tr = 0.2) difference = 0.95, $CI_{95\%} = (0.1636, 1.7364)$, $e.s. = 0.5$], indicating that both variables have significantly higher values in the high-pollution sites (Figures 4G,H). However, given that the 95% CIs of the mean NumR comparison overlap (Figure 4G), and that a



high number of tied (repeated) values occur (Figure 4E), we run also Wilcox's robust percentile bootstrap method for comparing medians [$medpb2(nboot = 2000)$], which provides good control over the probability of Type I error when tied values occur. For NumR the test could not reject the null of equal medians [$M^* = 1, p = 0.094, CI_{95\%} = (0, 2.5)$], but was significant for NumFam [$M^* = 1, p = 0.0495, CI_{95\%} = (0, 2)$].

***Stenotrophomonas* Species Differ in their β -Lactamase Expression Patterns and Only *S. maltophilia* Strains Express Metallo- β -Lactamases**

Association plots (Figure 5) revealed a very highly significant association ($p \approx 0$) between species and type of β -lactamases

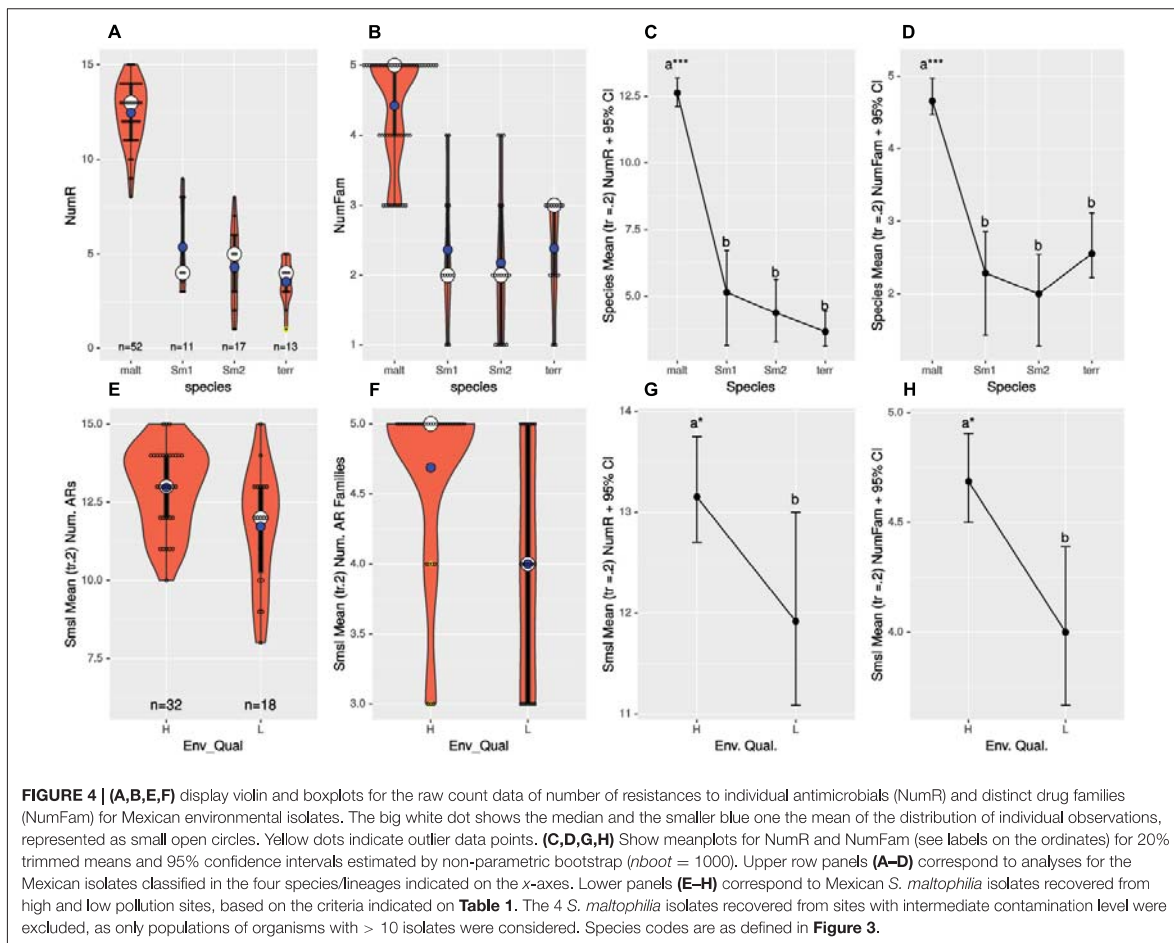


FIGURE 4 | (A,B,E,F) display violin and boxplots for the raw count data of number of resistances to individual antimicrobials (NumR) and distinct drug families (NumFam) for Mexican environmental isolates. The big white dot shows the median and the smaller blue one the mean of the distribution of individual observations, represented as small open circles. Yellow dots indicate outlier data points. **(C,D,G,H)** Show meanplots for NumR and NumFam (see labels on the ordinates) for 20% trimmed means and 95% confidence intervals estimated by non-parametric bootstrap (*nboot* = 1000). Upper row panels **(A–D)** correspond to analyses for the Mexican isolates classified in the four species/lineages indicated on the x-axes. Lower panels **(E–H)** correspond to Mexican *S. maltophilia* isolates recovered from high and low pollution sites, based on the criteria indicated on **Table 1**. The 4 *S. maltophilia* isolates recovered from sites with intermediate contamination level were excluded, as only populations of organisms with > 10 isolates were considered. Species codes are as defined in **Figure 3**.

expressed (Supplementary Figure S11). Metallo-β-lactamase expression was significantly and exclusively associated with *S. maltophilia* isolates. Most isolates from the Smc1 and Smc2 lineages did not express any kind of β-lactamase, although expression of extended spectrum of β-lactamases could be detected in a few isolates of these species. No β-lactamase expression was detected in *S. terrae* isolates.

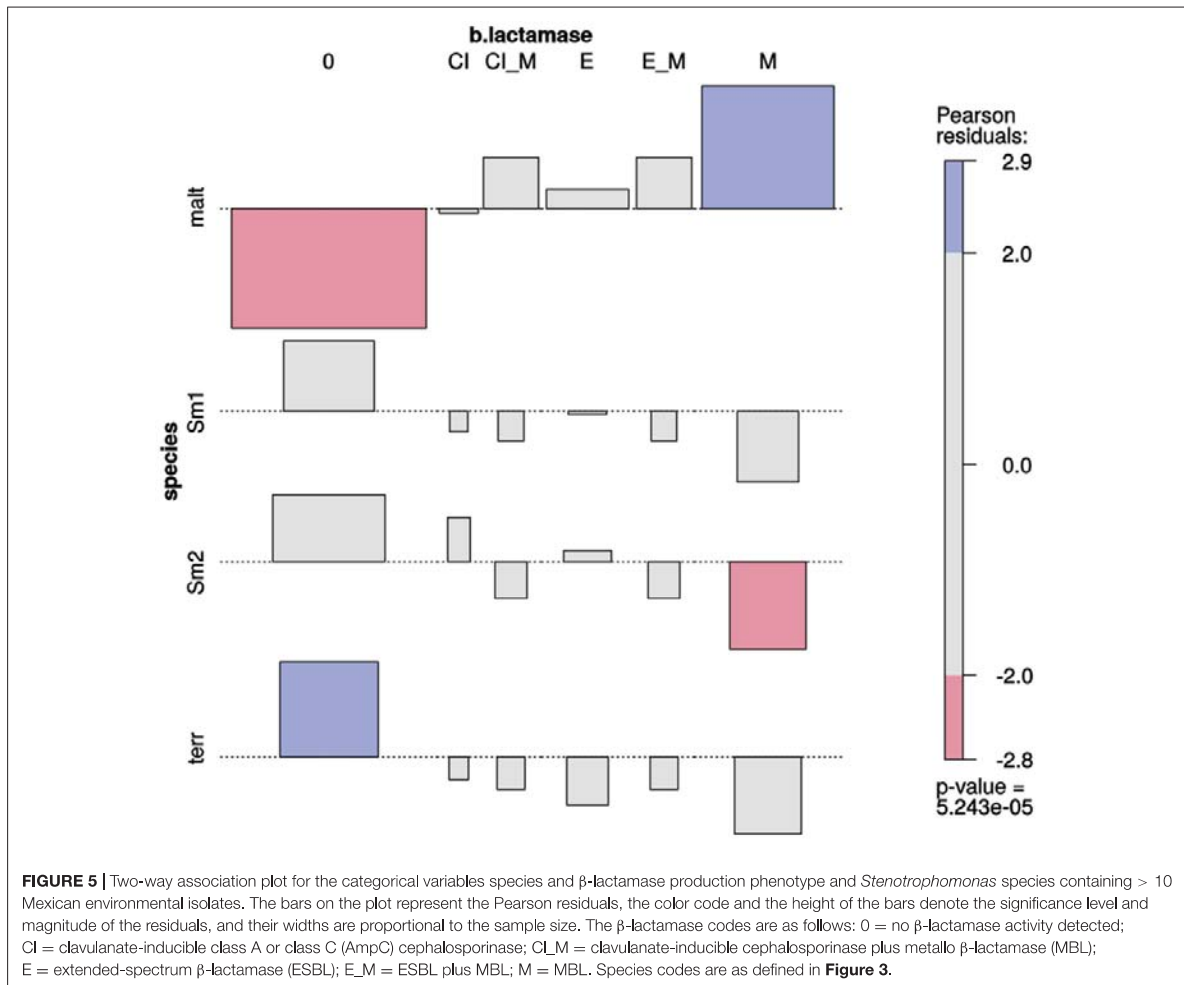
The Prevalence of Environmental *Stenotrophomonas* Species Recovered from Mexican Rivers Is Significantly Associated with Habitat and Pollution Level

We performed a multi-way association analysis to test the null hypothesis that *Stenotrophomonas* species prevalence is independent of isolation habitat (sediment vs. water column), the pollution level of the sampling site (**Table 1**) and isolation medium (**Figure 6**). The test strongly rejects the null hypothesis ($p < 0.00001$). *S. maltophilia* was mainly recovered on MK

plates, being significantly associated with polluted sediments. The Smc1 lineage displayed a moderately significant association with clean water columns, although some isolates could also be recovered from contaminated sediments using NAA, which is consistent with the MCA results presented in **Figure 3**. In contrast, Smc2 isolates were very significantly overrepresented in the water columns of clean rivers and underrepresented in sediments, suggesting a high level of ecological specialization. *S. terrae* isolates were mainly recovered on oligotrophic NAA plates from the sediments of clean sites (**Table 1**).

DISCUSSION

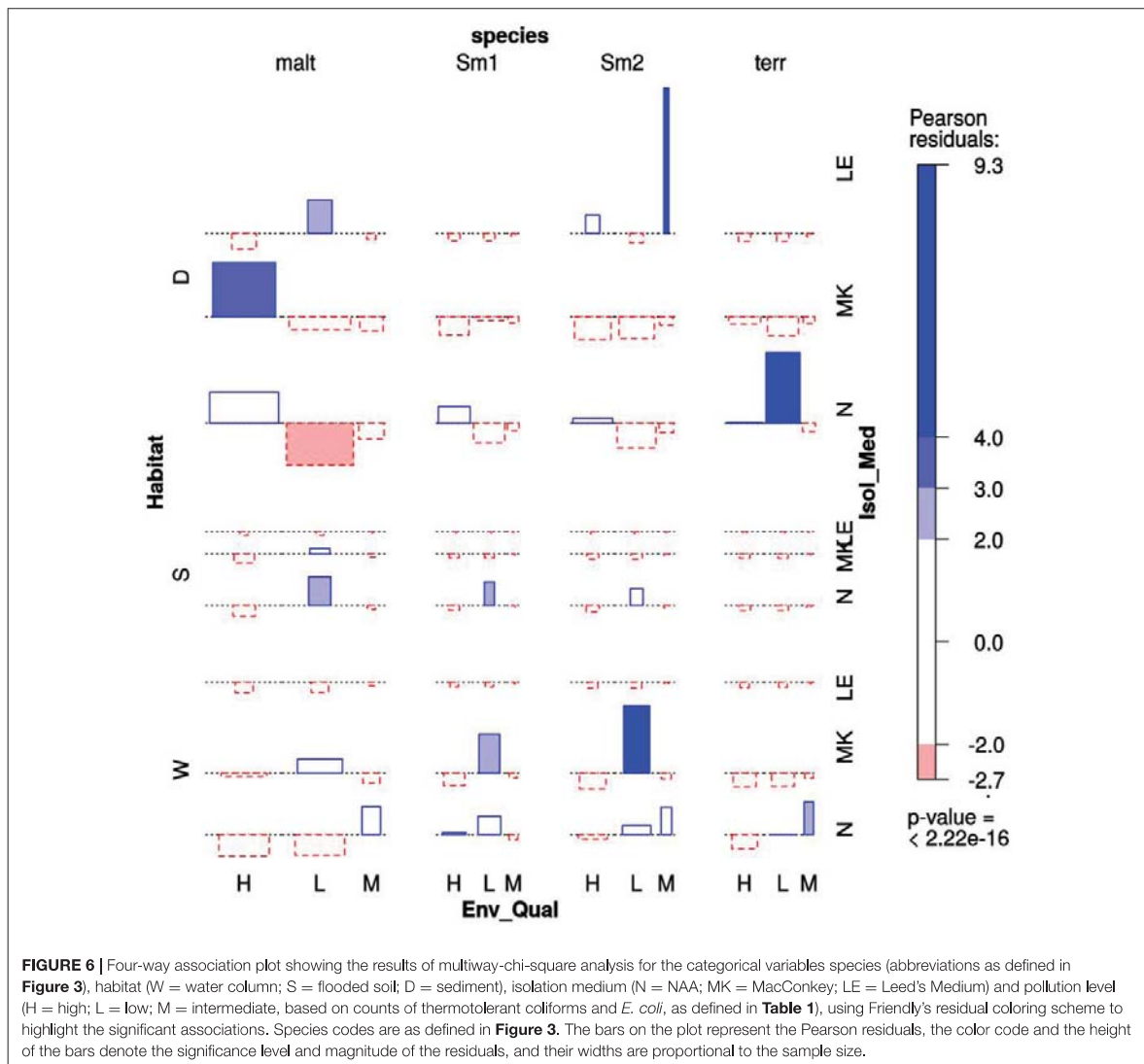
In this study we demonstrate the power of complementary phylogenetic and population genetics approaches to delimit genetically and ecologically coherent species among a diverse collection of environmental isolates of the genus *Stenotrophomonas*. Importantly, this is done based exclusively on molecular evolutionary criteria (Vinuesa et al., 2005b), without



using any arbitrary sequence or phenetic similarity cut-off values, as embraced by the standard polyphasic approach that dominates current bacterial taxonomic practice (Kämpfer and Glaeser, 2012). The robustness of the species delimitations proposed here are supported by the statistically significant associations they exhibit with distinct habitat preferences, antibiotic resistance profiles, MDR status and β -lactamase expression phenotypes.

To our knowledge, this is the first study that used the MSC model (Rannala and Yang, 2003; Edwards et al., 2007; Degnan and Rosenberg, 2009) coupled with Bayes factor (BF) analyses (Kass and Raftery, 1995) for microbial species delimitation. The MSC model has the virtue of relaxing the implicit assumption made by the concatenation approach that the phylogeny of each gene is shared and equal to that of the species tree. Although this assumption is problematic, the concatenation approach is the current standard in microbial multilocus sequence analysis (Gevers et al., 2005; Vinuesa, 2010; Glaeser and Kämpfer, 2015), including phylogenomics (Rokas et al., 2003; Wu and

Eisen, 2008). It has been shown that phylogenetic estimates from concatenated datasets under coalescence are inconsistent (Kubatko and Degnan, 2007; Song et al., 2012), that is, converge to wrong solutions with higher probability as the number of concatenated loci increases. However, the impact of this inconsistency still needs to be thoroughly evaluated with clonally multiplying microbial organisms experiencing different rates of recombination (Hedge and Wilson, 2014). In our analyses, the topology of the ML phylogeny inferred from the concatenated dataset (**Figure 1**) is largely congruent with the Bayesian species tree inferred under the MSC (Supplementary Figure S8). It is worth noting that the numbers on the branches in this type of species tree denote the estimated population sizes. That of *S. maltophilia* is about 1 order of magnitude larger than the population size estimates for the Smc1 and Smc2 genespecies (Supplementary Figure S8), which reflects the genetic heterogeneity of strains grouped in the *S. maltophilia* lineage, which includes the majority of the Mexican isolates,



along with reference strains from the pubmlst.org and genome databases, isolated across the globe. Lumping this heterogeneous set of recombining sub-lineages into a single species results in coalescent events higher up in the species tree than those observed for the Smc1 and Smc2 lineages. This is consistent with the marked internal structure revealed by the Bayesian structure analysis within *S. maltophilia* (**Figure 2**), which suggests that additional cryptic species may be found within the *S. maltophilia* lineage. Patil and colleagues recently proposed that the type strains of *S. africana*, *P. beteli* and *P. hibiscicola*, which are phylogenetically placed within the *S. maltophilia* clade (**Figure 1A**), and have been reclassified as *S. maltophilia*, actually represent distinct species, based on their estimates of genomic average nucleotide identity values < 94% (Patil et al., 2016).

In our view, these clusters represent incipient species that are still capable of recombining between them, as suggested by the admixture found in the STRUCTURE barplots (**Figure 2**) and by our estimates for recombination within *S. maltophilia* (**Table 5**). Further investigations involving comparative and population genomics are required to identify clear signatures of speciation within the *S. maltophilia* sub-lineages, including “speciation genes and islands” (Shapiro et al., 2016). Despite the conservative approach taken in this study, the BF analysis provides statistical support in favor of splitting the *S. maltophilia* complex as currently defined in pubmlst.org into the following 5 broad evolutionary lineages: *S. maltophilia* and the genospecies Smc1 to Smc4. Overwhelming support ($\ln\text{-BF} > 5$) was also obtained indicating that genogroup #10 (Vasileuskaya-Schulz

et al., 2011), the sister clade of *S. rhizophila* (genogroup #8), constitutes an independent, non-described species (Table 2). This is of practical importance from a biotechnological perspective because it has been argued that plant-associated *S. rhizophila* strains (Vasileuskaya-Schulz's genogroup #8) can be safely and easily separated from *S. maltophilia* pathogens in clade IIb (Berg and Martinez, 2015) based on 16S rRNA gene sequences and *ggs* and *smeD* PCR-based typing (Ribbeck-Busch et al., 2005). However, it would be important to define differences of the former with strains in the sister genogroup #10, which holds both rape rhizosphere and human blood and thigh bone infection isolates. In summary, our MSC-BF analysis provided strong evidence for the existence of five new species in the analyzed dataset.

Considering that the MSC model implemented in *BEAST 2 was not specifically developed for bacteria, and given that this model has been put under criticism due to detectable model misspecification when tested on diverse empirical animal and plant datasets using posterior predictive simulations (Reid et al., 2014), it was important to evaluate the robustness of the Bayesian species delimitations with independent methods. We challenged the proposed species borders within the Smc by performing well-established population genetic analyses on our collection of environmental isolates from the sister lineages *S. maltophilia*, Smc1 and Smc2. We focused on detecting population genetic structure, estimating gene flow between the phylogenetically defined species, and identifying signatures of selection. Such data and evidence are predicted by current ecological models of bacterial speciation to reflect speciation events (Vinuesa et al., 2005b; Koepfel et al., 2008; Vos, 2011; Cadillo-Quiroz et al., 2012; Shapiro and Polz, 2014).

Current models of bacterial speciation suggest that groups of closely related strains that display some degree of resource partitioning, and consequently occupy different niches, will be affected by independent selective sweeps caused by the gain of a beneficial gene either by horizontal transfer or by adaptive mutation. These may sweep to fixation if recombination levels are low in relation to selection coefficients, or form so called "speciation islands or continents" in the genomes of highly recombining populations (Cadillo-Quiroz et al., 2012; Shapiro et al., 2012). Such (sympatric) populations are predicted to be discernable as sequence clusters that diverge from each other because of the fixation of different adaptive mutations. This leads to the formation of independent genetically and ecologically coherent units as gene flow between them gradually drops as they diverge by means of natural selection (Vos, 2011; Shapiro and Polz, 2014). We could show that the Mexican *S. maltophilia*, Smc1 and Smc2 lineages satisfy these predictions. The K^*_{ST} test statistic (Hudson et al., 1992) detected highly significant genetic differentiation between all pairs of these sympatric lineages based on DNA polymorphisms (Table 3). This is consistent with the results from the STRUCTURE analysis. Conversely, the number of migrants between these lineages was negligible, evidencing low levels of gene flow between them. Additionally, the "neutrality index" (NI), and the results of the MK tests suggest that positive selection, rather than drift, is the force promoting divergence between the lineages, which is in line with predictions from

the adaptive divergence model (Vos, 2011). However, the latter interpretation needs to be considered cautiously, as the high relative rate of between-species non-synonymous substitutions observed could also be generated by within-species purifying selection to eliminate slightly deleterious mutations (Hughes, 2005; Hughes et al., 2008). The latter interpretation is consistent with the observed negative, but not significant Tajima's D values (Table 4). These are not likely to reflect a population expansion, given the non-significant p -values of the powerful R_2 statistic for population growth, which is well suited for small sample sizes such as those of the Smc1 and Smc2 lineages (Ramos-Onsins and Rozas, 2002). We could show that recombination is an important force, providing genetic cohesion to these lineages, with Rho/θ estimates ranging from 1.11 in Smc1 to nearly 3 in *S. maltophilia*. Since recombination events are only detectable when a tract of multiple polymorphisms are introduced in a population, it is clear that most of the observed polymorphisms within the analyzed populations originate from recombination rather than point mutations. The high recombination levels detected within the *S. maltophilia* lineage suggests that speciation within this group is an ongoing, possibly not yet finished process, along a "spectrum" of speciation, resulting in "fuzzy" borders between the sub-lineages (Hanage et al., 2005; Shapiro et al., 2016). However, these can be already detected as phylogenetic and STRUCTURE clusters, even with the limited resolving power provided by the 7 gene MLST scheme used.

As predicted by the ecological speciation models recently developed for bacteria (Koepfel et al., 2008; Vos, 2011; Shapiro and Polz, 2014), the marked genetic differentiation detected between the sympatric *S. maltophilia*, Smc1 and Smc2 environmental populations is significantly associated with different habitat preferences, antibiotic susceptibility profiles and β -lactamase expression phenotypes. These attributes strongly suggest that these lineages have differentiated ecological niches. The significant differences in habitat preferences could provide some micro-geographic separation between the populations coexisting in the same river, which might partly explain the reduced gene flow measured between them, despite of being sister lineages, contributing to their genetic differentiation. Similar patterns have been reported for other aquatic microbes such as *Desulfohalobium* (Oakley et al., 2010), *Exiguobacterium* (Rebollar et al., 2012) and *Vibrio* (Shapiro et al., 2012; Friedman et al., 2013). Consequently, our results support the growing body of evidence pointing to niche partitioning as a major factor promoting evolutionary divergence between closely related sympatric prokaryotic populations, even when they exhibit high levels of recombination (Shapiro and Polz, 2014).

As noted before, *S. maltophilia* is well-known as an emergent opportunistic MDR nosocomial pathogen, causing increasing morbidity and mortality (Looney et al., 2009; Brooke, 2012). Comparative genomics and functional analyses have clearly established that the MDR or extensively drug-resistant (XDR) phenotype displayed by clinical isolates of this species is largely intrinsic, resulting from the expression of a combination of several types of efflux pumps (RND, MATE, MFS and ABC types) and diverse chromosomally-encoded antibiotic resistance

genes [*aph* (*3'*)-*I*lc, *aac* (*6'*)-*I*z and *Smqnr*], including the metallo- β -lactamase *blaL1* and the inducible Ambler class A β -lactamase *blaL2* (Crossman et al., 2008; Brooke, 2014; García-León et al., 2014; Sanchez, 2015; Youenou et al., 2015). However, contradictory results have been reported regarding the MDR status of environmental isolates of the Smc. For example, a recent ecological study of a large collection isolates classified as *S. maltophilia* recovered from diverse agricultural soils in France and Tunisia concluded that they display a high diversity of antibiotic resistance profiles, expressing resistance against 1 to 12 antibiotics, with clinical and manure isolates expressing the highest numbers (Deredjian et al., 2016). These isolates were vaguely classified as *S. maltophilia* based on growth on the selective VIA isolation medium (Kerr et al., 1996) and PCR detection of the *smcD* gene (Pinot et al., 2011). We argue that the large phenotypic variance observed in that and similar studies result from the lack of proper species delimitation. This cannot be achieved with such coarse typing methods, most likely resulting in the lumping of multiple species into *S. maltophilia*. In contrast, in the present study we found a very strong statistical association between the MDR condition and metallo- β -lactamase (MBL) production with the *S. maltophilia* lineage, whereas the sibling Smc1 and Smc2 genospecies were found to express on average resistance to <3 antibiotic families (Figures 4B,D and Supplementary Figure S13B), most strains not expressing any kind of β -lactamase, and none expressing MBLs (Figure 5). Consequently, intrinsic MDR can only be assumed for the *S. maltophilia* strains of clinical and environmental origin.

CONCLUSION

The results presented here provide the first in depth and integrative molecular systematic, evolutionary genetic and ecological analysis of the genus *Stenotrophomonas*. The study demonstrates that both phylogenetic and population genetic approaches are necessary for robust delimitation of natural species borders in bacteria. Failure to properly delimit such lineages hinders downstream ecological and functional analysis of species. Comparative and population genomic studies are required to resolve pending issues regarding the speciation status of the sub-lineages within *S. maltophilia*.

REFERENCES

- Aagot, N., Nybroe, O., Nielsen, P., and Johnsen, K. (2001). An altered *Pseudomonas* diversity is recovered from soil by using nutrient-poor *Pseudomonas*-selective soil extract media. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5233–5239. doi: 10.1128/AEM.67.11.5233-5239.2001
- Adamek, M., Overhage, J., Bathe, S., Winter, J., Fischer, R., and Schwartz, T. (2011). Genotyping of environmental and clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates and their pathogenic potential. *PLoS ONE* 6:e27615. doi: 10.1371/journal.pone.0027615
- APHA (ed.) (2005). *Standard Methods for the Analysis of Water and Wastewater—Section 9222D. Thermotolerant (fecal) Coliform Membrane Filter Procedure*. Washington, DC: American Public Health Association.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors read and approved the manuscript. LEOS and PV conceived and designed the project. LEOS generated the collection of isolates, performed wet-lab experiments and analyzed resistance phenotypes. PV performed bioinformatic, statistical and evolutionary genetic analyses. PV wrote the manuscript.

FUNDING

This work is part of LEOS's Ph.D. project in the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, and was supported by a Ph.D. scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-México) and student travel scholarships from PAEP-UNAM. We gratefully acknowledge financial support obtained from CONACYT-México (grant 179133) and DGAPA-PAPIIT/UNAM (grant IN211814) to PV.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully thank Dr. Eria Rebollar and Dr. Claudia Silva for their critical reading of the manuscript. Javier Rivera Campos is acknowledged for technical support with wet-lab experiments. Antonio Trujillo from CCG-UNAM is thanked for support with field work. Don Juan Alvear Gutiérrez and Ing. Norberto Bahena are gratefully acknowledged for supporting our sampling at the natural parks Los Sauces and Las Estacas, respectively. José Alfredo Hernández and the UATI at CCG-UNAM are acknowledged for support with Linux server administration. Dr. Jesús Silva Sánchez from the INSP in Cuernavaca, Mexico, is gratefully thanked for his support throughout the work, particularly regarding the interpretation of disk-diffusion assays and for providing laboratory reagents.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.01548/full#supplementary-material>

- Assih, E. A., Ouattara, A. S., Thierry, S., Cayol, J. L., Labat, M., and Macarie, H. (2002). *Stenotrophomonas acidaminiphila* sp. nov., a strictly aerobic bacterium isolated from an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 559–568. doi: 10.1099/00207713-52-2-559
- Aydin, Z., Marcussen, T., Ertekin, A. S., and Oxelman, B. (2014). Marginal likelihood estimate comparisons to obtain optimal species delimitations in *Silene* sect. *Cryptoneuræ* (Caryophyllaceae). *PLoS ONE* 9:e106990. doi: 10.1371/journal.pone.0106990
- Baele, G., Lemey, P., Bedford, T., Rambaut, A., Suchard, M. A., and Alekseyenko, A. V. (2012). Improving the accuracy of demographic and molecular clock model comparison while accommodating phylogenetic uncertainty. *Mol. Biol. Evol.* 29, 2157–2167. doi: 10.1093/molbev/mss084

- Baele, G., Li, W. L., Drummond, A. J., Suchard, M. A., and Lemey, P. (2013). Accurate model selection of relaxed molecular clocks in Bayesian phylogenetics. *Mol. Biol. Evol.* 30, 239–243. doi: 10.1093/molbev/mss243
- Berg, G., and Martínez, J. L. (2015). Friends or foes: can we make a distinction between beneficial and harmful strains of the *Stenotrophomonas maltophilia* complex? *Front. Microbiol.* 6:241. doi: 10.3389/fmicb.2015.00241
- Berg, G., Roskot, N., and Smalla, K. (1999). Genotypic and phenotypic relationships between clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3594–3600.
- Bouckaert, R., Heled, J., Kuhnert, D., Vaughan, T., Wu, C. H., Xie, D., et al. (2014). BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Comput. Biol.* 10:e1003537. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003537
- Bouckaert, R. R. (2010). DensiTree: making sense of sets of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 26, 1372–1373. doi: 10.1093/bioinformatics/btq110
- Brooke, J. S. (2012). *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 25, 2–41. doi: 10.1128/CMR.00019-11
- Brooke, J. S. (2014). New strategies against *Stenotrophomonas maltophilia*: a serious worldwide intrinsically drug-resistant opportunistic pathogen. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 12, 1–4. doi: 10.1586/14787210.2014.864553
- Cadillo-Quiroz, H., Didelot, X., Held, N. L., Herrera, A., Darling, A., Reno, M. L., et al. (2012). Patterns of gene flow define species of the thermophilic Archaea. *PLoS Biol.* 10:e1001265. doi: 10.1371/journal.pbio.1001265
- Chang, Y. T., Lin, C. Y., Chen, Y. H., and Hsueh, P. R. (2015). Update on infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia* with particular attention to resistance mechanisms and therapeutic options. *Front. Microbiol.* 6:893. doi: 10.3389/fmicb.2015.00893
- CLSI (2016). *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Coenye, T., Vanlaere, E., Falsen, E., and Vandamme, P. (2004). *Stenotrophomonas africana* Drancourt et al. 1997 is a later synonym of *Stenotrophomonas maltophilia* (Hugh 1981) Palleroni and Bradbury 1993. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 1235–1237. doi: 10.1099/ijs.0.63093-0
- Contreras-Moreira, B., Sachman-Ruiz, B., Figueroa-Palacios, I., and Vinuesa, P. (2009). primers4clades: a web server that uses phylogenetic trees to design lineage-specific PCR primers for metagenomic and diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 37, W95–W100. doi: 10.1093/nar/gkp377
- Contreras-Moreira, B., and Vinuesa, P. (2013). GET_HOMOLOGUES, a versatile software package for scalable and robust microbial pangenome analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 7696–7701. doi: 10.1128/AEM.02411-13
- Cordero, O. X., and Polz, M. F. (2014). Explaining microbial genomic diversity in light of evolutionary ecology. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 263–273. doi: 10.1038/nrmicro3218
- Crossman, L. C., Gould, V. C., Dow, J. M., Vernikos, G. S., Okazaki, A., Sebailia, M., et al. (2008). The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. *Genome Biol.* 9:R74. doi: 10.1186/gb-2008-9-4-r74
- 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
- Davenport, K. W., Daligault, H. E., Minogue, T. D., Broomall, S. M., Bruce, D. C., Chain, P. S., et al. (2014). Complete genome sequence of *Stenotrophomonas maltophilia* type strain 810-2 (ATCC 13637). *Genome Announc.* 2:e00974–14. doi: 10.1128/genomeA.00974-14
- de la Bastide, M., and McCombie, W. R. (2007). Assembling genomic DNA sequences with PHRAP. *Curr. Protoc. Bioinformatics* 17, 11.4.1–11.4.15. doi: 10.1002/0471250953.bi1104s17
- Degnan, J. H., and Rosenberg, N. A. (2006). Discordance of species trees with their most likely gene trees. *PLoS Genet.* 2:e68. doi: 10.1371/journal.pgen.0020068
- Degnan, J. H., and Rosenberg, N. A. (2009). Gene tree discordance, phylogenetic inference and the multispecies coalescent. *Trends Ecol. Evol.* 24, 332–340. doi: 10.1016/j.tree.2009.01.009
- Deredjian, A., Alliot, N., Blanchard, L., Brothier, E., Anane, M., Cambier, P., et al. (2016). Occurrence of *Stenotrophomonas maltophilia* in agricultural soils and antibiotic resistance properties. *Res. Microbiol.* 167, 313–324. doi: 10.1016/j.resmic.2016.01.001
- Didelot, X., and Wilson, D. J. (2015). ClonalFrameML: efficient inference of recombination in whole bacterial genomes. *PLoS Comput. Biol.* 11:e1004041. doi: 10.1371/journal.pcbi.1004041
- Drummond, A. J., Ho, S. Y., Phillips, M. J., and Rambaut, A. (2006). Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biol.* 4:e88. doi: 10.1371/journal.pbio.0040088
- Edwards, S. V., Liu, L., and Pearl, D. K. (2007). High-resolution species trees without concatenation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 5936–5941. doi: 10.1073/pnas.0607004104
- Evanno, G., Regnaut, S., and Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14, 2611–2620. doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x
- Falush, D., Stephens, M., and Pritchard, J. K. (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data. Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164, 1567–1587.
- Falush, D., Stephens, M., and Pritchard, J. K. (2007). Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Mol. Ecol. Notes* 7, 574–578. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01758.x
- Friedman, J., Alm, E. J., and Shapiro, B. J. (2013). Sympatric speciation: when is it possible in bacteria? *PLoS ONE* 8:e53539. doi: 10.1371/journal.pone.0053539
- Fujita, M. K., Leache, A. D., Burbrink, F. T., Mcguire, J. A., and Moritz, C. (2012). Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. *Trends Ecol. Evol.* 27, 480–488. doi: 10.1016/j.tree.2012.04.012
- García-León, G., Salgado, F., Oliveros, J. C., Sánchez, M. B., and Martínez, J. L. (2014). Interplay between intrinsic and acquired resistance to quinolones in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Environ. Microbiol.* 16, 1282–1296. doi: 10.1111/1462-2920.12408
- Gevers, D., Cohan, F. M., Lawrence, J. G., Spratt, B. G., Coenye, T., Feil, E. J., et al. (2005). Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 733–739. doi: 10.1038/nrmicro1236
- Glaeser, S. P., and Kampfer, P. (2015). Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Syst. Appl. Microbiol.* 38, 237–245. doi: 10.1016/j.syapm.2015.03.007
- Grummer, J. A., Bryson, R. W. Jr., and Reeder, T. W. (2014). Species delimitation using Bayes factors: simulations and application to the *Sceloporus scalaris* species group (Squamata: Phrynosomatidae). *Syst. Biol.* 63, 119–133. doi: 10.1093/sysbio/syt069
- 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
- Hanage, W. P., Fraser, C., and Spratt, B. G. (2005). Fuzzy species among recombinogenic bacteria. *BMC Biol.* 3:6. doi: 10.1186/1741-7007-3-6
- Handa, Y., Tazato, N., Nagatsuka, Y., Koide, T., Kigawa, R. C., Sano, C., et al. (2016). *Stenotrophomonas tumulicola* sp. nov., a major contaminant of the stone chamber interior in the Takamatsuzuka Tumulus. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 1119–1124. doi: 10.1099/ijsem.0.000843
- Hauben, L., Vauterin, L., Moore, E. R., Hoste, B., and Swings, J. (1999). Genomic diversity of the genus *Stenotrophomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49(Pt 4), 1749–1760. doi: 10.1099/00207713-49-4-1749
- Hedge, J., and Wilson, D. J. (2014). Bacterial phylogenetic reconstruction from whole genomes is robust to recombination but demographic inference is not. *MBio* 5:e02158. doi: 10.1128/mBio.02158-14
- Heled, J., and Drummond, A. J. (2010). Bayesian inference of species trees from multilocus data. *Mol. Biol. Evol.* 27, 570–580. doi: 10.1093/molbev/msp274
- Heylen, K., Vanparys, B., Peirsegaale, F., Lebbe, L., and De Vos, P. (2007). *Stenotrophomonas terrae* sp. nov. and *Stenotrophomonas humi* sp. nov., two nitrate-reducing bacteria isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 2056–2061. doi: 10.1099/ijms.0.65044-0
- Hudson, R. R., Boos, D. D., and Kaplan, N. L. (1992). A statistical test for detecting geographic subdivision. *Mol. Biol. Evol.* 9, 138–151.
- Hughes, A. L. (2005). Evidence for abundant slightly deleterious polymorphisms in bacterial populations. *Genetics* 169, 533–538. doi: 10.1534/genetics.104.036939
- Hughes, A. L., Friedman, R., Rivailler, P., and French, J. O. (2008). Synonymous and nonsynonymous polymorphisms versus divergences in bacterial genomes. *Mol. Biol. Evol.* 25, 2199–2209. doi: 10.1093/molbev/msn166
- Jawad, A., Hawkey, P. M., Heritage, J., and Snelling, A. M. (1994). Description of Leeds *Acinetobacter* Medium, a new selective and differential medium

- for isolation of clinically important *Acinetobacter* spp., and comparison with Herellea agar and Holton's agar. *J. Clin. Microbiol.* 32, 2353–2358.
- Kaiser, O., Puhler, A., and Selbitschka, W. (2001). Phylogenetic analysis of microbial diversity in the rhizosphere of oilseed rape (*Brassica napus* cv. Westar) employing cultivation-dependent and cultivation-independent approaches. *Microb. Ecol.* 42, 136–149.
- Kaiser, S., Biehler, K., and Jonas, D. (2009). A *Stenotrophomonas maltophilia* multilocus sequence typing scheme for inferring population structure. *J. Bacteriol.* 191, 2934–2943. doi: 10.1128/JB.00892-08
- Kämpfer, P., and Glaeser, S. P. (2012). Prokaryotic taxonomy in the sequencing era—the polyphasic approach revisited. *Environ. Microbiol.* 14, 291–317. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02615.x
- Kass, R. E., and Raftery, A. E. (1995). Bayes factors. *J. Am. Stat. Assoc.* 90, 773–795. doi: 10.1080/01621459.1995.10476572
- Kerr, K. G., Denton, M., Todd, N., Corps, C. M., Kumari, P., and Hawkey, P. M. (1996). A new selective differential medium for isolation of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 15, 607–610. doi: 10.1007/BF01709373
- Koeppl, A., Perry, E. B., Sikorski, J., Krizanc, D., Warner, A., Ward, D. M., et al. (2008). Identifying the fundamental units of bacterial diversity: a paradigm shift to incorporate ecology into bacterial systematics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 2504–2509. doi: 10.1073/pnas.0712205105
- Kopelman, N. M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenber, N. A., and Mayrose, I. (2015). Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Mol. Ecol. Resour.* 15, 1179–1191. doi: 10.1111/1755-0998.12387
- Kubatko, L. S., and Degnan, J. H. (2007). Inconsistency of phylogenetic estimates from concatenated data under coalescence. *Syst. Biol.* 56, 17–24. doi: 10.1080/10635150601146041
- Lartillot, N., and Philippe, H. (2006). Computing Bayes factors using thermodynamic integration. *Syst. Biol.* 55, 195–207. doi: 10.1080/10635150500433722
- Lira, F., Hernandez, A., Belda, E., Sanchez, M. B., Moya, A., Silva, F. J., et al. (2012). Whole-genome sequence of *Stenotrophomonas maltophilia* D457, a clinical isolate and a model strain. *J. Bacteriol.* 194, 3563–3564. doi: 10.1128/JB.00602-12
- Looney, W. J., Narita, M., and Muhlemann, K. (2009). *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen. *Lancet Infect. Dis.* 9, 312–323. doi: 10.1016/S1473-3099(09)70083-0
- McDonald, J. H., and Kreitman, M. (1991). Adaptive protein evolution at the Adh locus in *Drosophila*. *Nature* 351, 652–654. doi: 10.1038/351652a0
- Oakley, B. B., Carbonero, F., Van Der Gast, C. J., Hawkins, R. J., and Purdy, K. J. (2010). Evolutionary divergence and biogeography of sympatric niche-differentiated bacterial populations. *ISME J.* 4, 488–497. doi: 10.1038/ismej.2009.146
- Palleroni, N. J., and Bradbury, J. F. (1993). *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43, 606–609. doi: 10.1099/00207713-43-3-606
- Patil, P. P., Midha, S., Kumar, S., and Patil, P. B. (2016). Genome sequence of type strains of genus *Stenotrophomonas*. *Front. Microbiol.* 7:309. doi: 10.3389/fmicb.2016.00309
- Pinot, C., Deredjian, A., Nazaret, S., Brothier, E., Cournoyer, B., Segonds, C., et al. (2011). Identification of *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from environmental and clinical samples: a rapid and efficient procedure. *J. Appl. Microbiol.* 111, 1185–1193. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05120.x
- Pritchard, J. K., Stephens, M., and Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945–959.
- R Development Core Team (2016). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna: The R Foundation for Statistical Computing.
- Ramos, P. L., Van Trappen, S., Thompson, F. L., Rocha, R. C., Barbosa, H. R., De Vos, P., et al. (2010). Screening for endophytic nitrogen-fixing bacteria in Brazilian sugar cane varieties used in organic farming and description of *Stenotrophomonas pavarii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 926–931. doi: 10.1099/ijso.0.019372-0
- Ramos-Onsins, S. E., and Rozas, J. (2002). Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Mol. Biol. Evol.* 19, 2092–2100. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a004034
- Rand, D. M., and Kann, L. M. (1996). Excess amino acid polymorphism in mitochondrial DNA: contrasts among genes from *Drosophila*, mice, and humans. *Mol. Biol. Evol.* 13, 735–748. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a025634
- Rannala, B., and Yang, Z. (2003). Bayes estimation of species divergence times and ancestral population sizes using DNA sequences from multiple loci. *Genetics* 164, 1645–1656.
- Rebollar, E. A., Avitia, M., Eguarte, L. E., Gonzalez-Gonzalez, A., Mora, L., Bonilla-Rosso, G., et al. (2012). Water-sediment niche differentiation in ancient marine lineages of *Exiguobacterium* endemic to the Cuatro Ciénegas Basin. *Environ. Microbiol.* 14, 2323–2333. doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02784.x
- Reid, N. M., Hird, S. M., Brown, J. M., Pelletier, T. A., Mcvay, J. D., Satler, J. D., et al. (2014). Poor fit to the multispecies coalescent is widely detectable in empirical data. *Syst. Biol.* 63, 322–333. doi: 10.1093/sysbio/syt057
- Ribbeck-Busch, K., Roder, A., Hasse, D., De Boer, W., Martínez, J. L., Hagemann, M., et al. (2005). A molecular biological protocol to distinguish potentially human pathogenic *Stenotrophomonas maltophilia* from plant-associated *Stenotrophomonas rhizophila*. *Environ. Microbiol.* 7, 1853–1858. doi: 10.1111/j.1462-2920.2005.00928.x
- Rokas, A., Williams, B. L., King, N., and Carroll, S. B. (2003). Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. *Nature* 425, 798–804. doi: 10.1038/nature02053
- Rosenberg, N. A. (2013). Discordance of species trees with their most likely gene trees: a unifying principle. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2709–2713. doi: 10.1093/molbev/mst160
- Rozas, J., Sánchez-Delbarrio, J. C., Messeguer, X., and Rozas, R. (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19, 2496–2497. doi: 10.1093/bioinformatics/btg359
- Ryan, R. P., Monchy, S., Cardinale, M., Taghavi, S., Crossman, L., Avison, M. B., et al. (2009). The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 514–525. doi: 10.1038/nrmicro2163
- Sanchez, M. B. (2015). Antibiotic resistance in the opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Front. Microbiol.* 6:658. doi: 10.3389/fmicb.2015.00658
- Shapiro, B. J., Friedman, J., Cordero, O. X., Preheim, S. P., Timberlake, S. C., Szabo, G., et al. (2012). Population genomics of early events in the ecological differentiation of bacteria. *Science* 336, 48–51. doi: 10.1126/science.1218198
- Shapiro, B. J., Leducq, J. B., and Mallet, J. (2016). What is speciation? *PLoS Genet.* 12:e1005860. doi: 10.1371/journal.pgen.1005860
- Shapiro, B. J., and Polz, M. F. (2014). Ordering microbial diversity into ecologically and genetically cohesive units. *Trends Microbiol.* 22, 235–247. doi: 10.1016/j.tim.2014.02.006
- Song, S., Liu, L., Edwards, S. V., and Wu, S. (2012). Resolving conflict in eutherian mammal phylogeny using phylogenomics and the multispecies coalescent model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 14942–14947. doi: 10.1073/pnas.1211733109
- Svensson-Stadler, L. A., Mihaylova, S. A., and Moore, E. R. (2011). *Stenotrophomonas* interspecies differentiation and identification by gyrB sequence analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 327, 15–24. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02452.x
- Ultee, A., Souvatzki, N., Maniadi, K., and König, H. (2004). Identification of the culturable and nonculturable bacterial population in ground water of a municipal water supply in Germany. *J. Appl. Microbiol.* 96, 560–568. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02174.x
- USEPA (2002). *Method 1603: Escherichia coli (E.coli) in Water by Membrane Filtration Using Modified membrane-Thermotolerant Escherichia coli Agar (Modified mTEC) (September 2002)*. Washington, DC: USEPA.
- Van Den Mooter, M., and Swings, J. (1990). Numerical analysis of 295 phenotypic features of 266 *Xanthomonas* strain and related strains and an improved taxonomy of the genus. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40, 348–369. doi: 10.1099/00207713-40-4-348
- Vasileuskaya-Schulz, Z., Kaiser, S., Maier, T., Kostrzewa, M., and Jonas, D. (2011). Delineation of *Stenotrophomonas* spp. by multi-locus sequence analysis and MALDI-TOF mass spectrometry. *Syst. Appl. Microbiol.* 34, 35–39. doi: 10.1016/j.sysapm.2010.11.011
- Vinuesa, P. (2010). “Multilocus sequence analysis and bacterial species phylogeny estimation,” in *Molecular Phylogeny of Microorganisms*, eds A. Oren and R. T. Papke (Poole: Caister Academic Press), 41–64.

- Vinuesa, P., and Ochoa-Sánchez, L. E. (2015). Complete genome sequencing of *Stenotrophomonas acidaminiphila* ZAC14D2_NAIM14_2, a multidrug-resistant strain isolated from sediments of a polluted river in Mexico, uncovers new antibiotic resistance genes and a novel class-II lasso peptide biosynthesis gene cluster. *Genome Announc.* 3:e01433–15. doi: 10.1128/genomeA.01433-15
- Vinuesa, P., Rojas-Jimenez, K., Contreras-Moreira, B., Mahna, S. K., Prasad, B. N., Moe, H., et al. (2008). Multilocus sequence analysis for assessment of the biogeography and evolutionary genetics of four *Bradyrhizobium* species that nodulate soybeans on the Asiatic continent. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6987–6996. doi: 10.1128/AEM.00875-08
- Vinuesa, P., Silva, C., Lorite, M. J., Izaguirre-Mayoral, M. L., Bedmar, E. J., and Martínez-Romero, E. (2005a). Molecular systematics of rhizobia based on maximum likelihood and Bayesian phylogenies inferred from *rrs*, *atpD*, *recA* and *nifH* sequences, and their use in the classification of *Sesbania* microsymbionts from Venezuelan wetlands. *Syst. Appl. Microbiol.* 28, 702–716.
- Vinuesa, P., Silva, C., Werner, D., and Martínez-Romero, E. (2005b). Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. *Mol. Phylogenet. Evol.* 34, 29–54.
- Vos, M. (2011). A species concept for bacteria based on adaptive divergence. *Trends Microbiol.* 19, 1–7. doi: 10.1016/j.tim.2010.10.003
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletie, D. A., and Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173, 697–703. doi: 10.1128/jb.173.2.697-703.1991
- Wilcox, R. (2016). *Introduction to Robust Estimation and Hypothesis Testing*, 4th Edn. New York, NY: Academic Press.
- Wu, M., and Eisen, J. A. (2008). A simple, fast, and accurate method of phylogenomic inference. *Genome Biol.* 9:R151. doi: 10.1186/gb-2008-9-10-r151
- Yi, H., Srinivasan, S., and Kim, M. K. (2010). *Stenotrophomonas panacihumi* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field. *J. Microbiol.* 48, 30–35. doi: 10.1007/s12275-010-0006-0
- Youenou, B., Favre-Bonte, S., Bodilis, J., Brothier, E., Dubost, A., Muller, D., et al. (2015). Comparative genomics of environmental and clinical *Stenotrophomonas maltophilia* strains with different antibiotic resistance profiles. *Genome Biol. Evol.* 7, 2484–2505. doi: 10.1093/gbe/evv161
- Zhu, B., Liu, H., Tian, W. X., Fan, X. Y., Li, B., Zhou, X. P., et al. (2012). Genome sequence of *Stenotrophomonas maltophilia* RR-10, isolated as an endophyte from rice root. *J. Bacteriol.* 194, 1280–1281. doi: 10.1128/JB.06702-11

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 © 2017 Ochoa-Sánchez and Vinuesa. 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.

Anexo 2. Material suplementario del artículo 1. Evolutionary genetic analysis uncovers multiple species with distinct habitat preferences and antibiotic resistance phenotypes in the *Stenotrophomonas maltophilia* complex

Evolutionary genetic analysis uncovers multiple species with distinct habitat preferences and antibiotic resistance phenotypes in the *Stenotrophomonas maltophilia* complex

Luz Edith Ochoa-Sánchez and Pablo Vinuesa*

Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, Mexico.

***Correspondence:**

Corresponding Author

vinuesa@ccg.unam.mx

Keywords: *Stenotrophomonas maltophilia* complex taxonomy, antibiotic resistance, multidrug resistance, multispecies coalescent, population genetic structure, recombination, metallo-beta-lactamase, niche partitioning.

Running title: *Stenotrophomonas* evolutionary genetics and ecology

Supplementary materials

Frontiers in Microbiology | August 2017 | Volume 8 | Article 1548

<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.01548/>



Figure S1. Maps and pictures showing the location and aspect of the 6 sampling sites in 4 rivers and streams in Morelos, Central Mexico, analyzed in this work. The coordinates of the sites and other characteristics are presented in Table 1 of the main text.

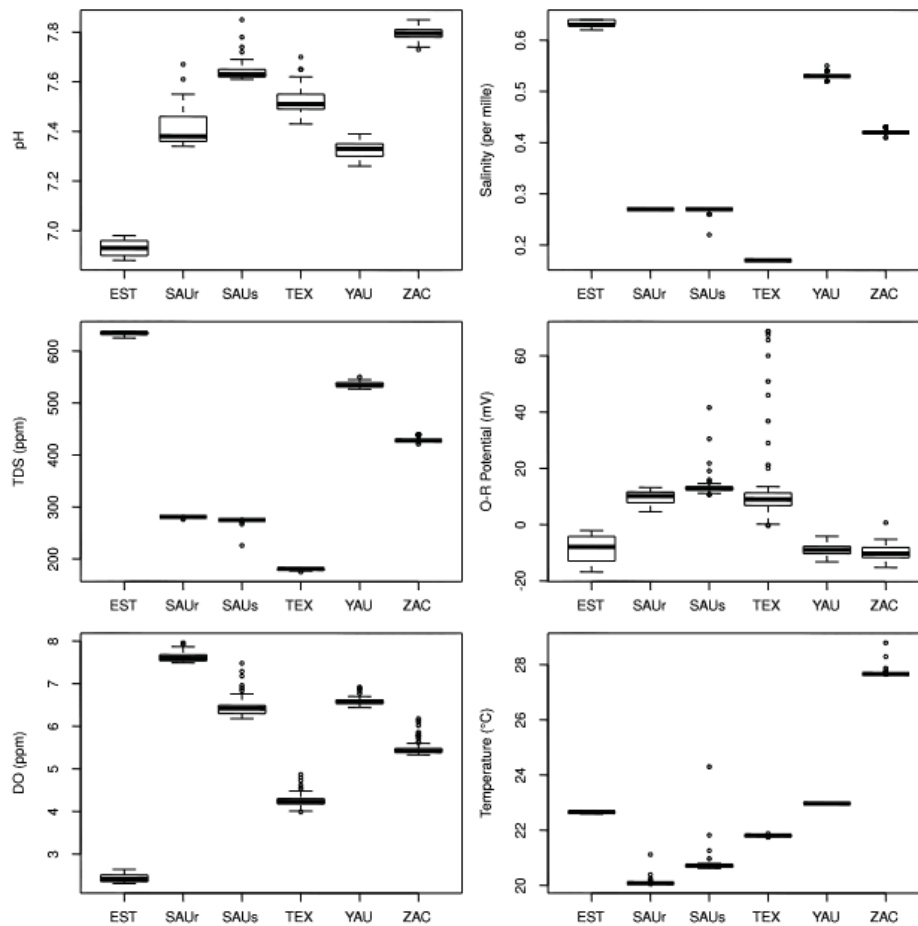


Figure S2. Parallel boxplots summarizing the distribution of values for 6 environmental parameters measured at the 6 sampling sites. The measurements for each site were taken with a HANNA multi-parametric HI9828 instrument operated in continuous measurement mode for 1 min, along a 10 m transect at each sampling site. (TDS = total dissolved solutes; O-R = oxido-reduction; DO = dissolved oxygen).

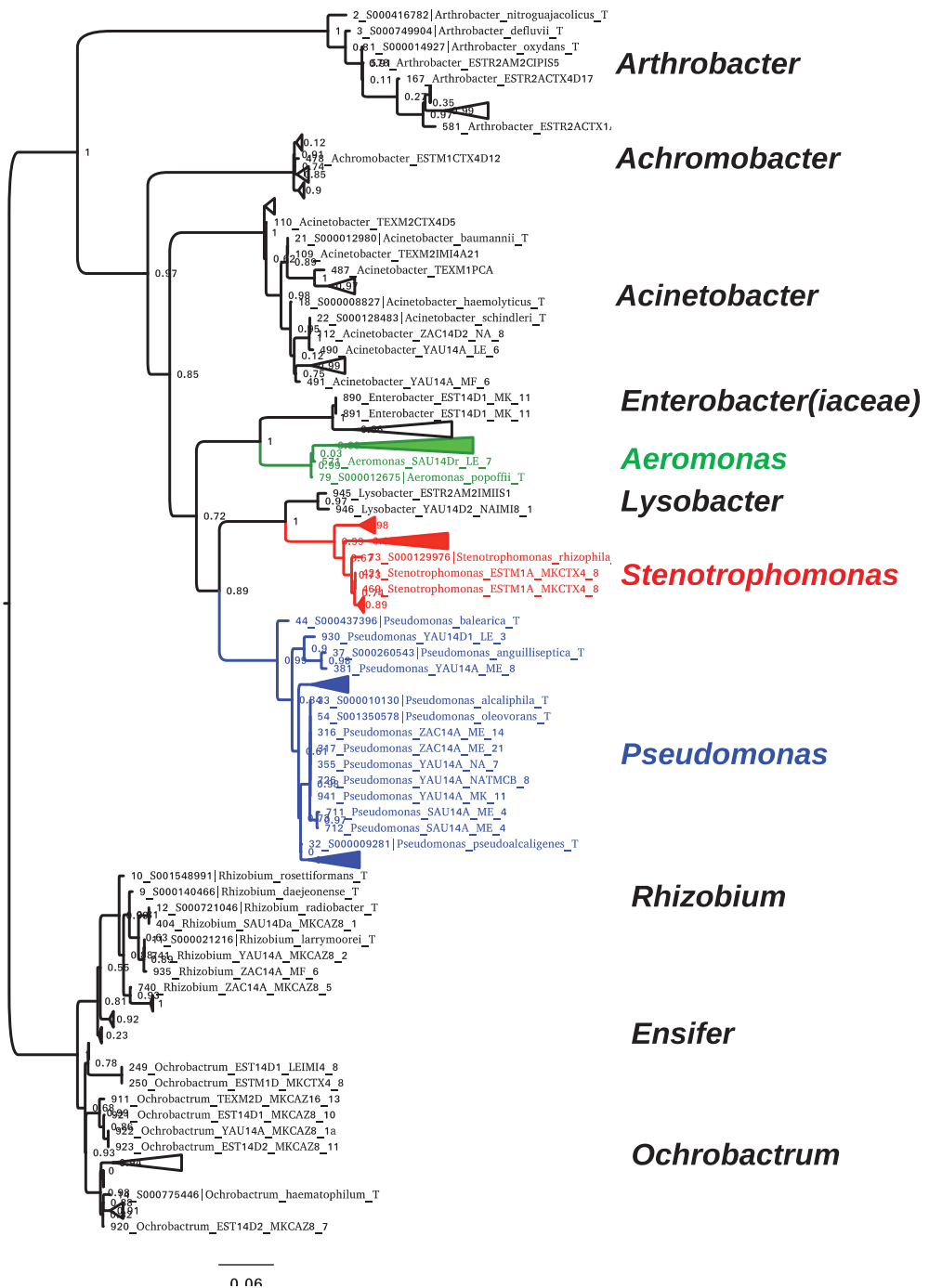


Figure S3. Classification of 697 environmental isolates at the genus level based on maximum likelihood phylogeny of 16S rRNA sequences. Support values on the branches are Shimodaria-Hasegawa-like approximate likelihood ratio test values. Large clades with many sequences are collapsed. Bar represents the expected number of substitutions per site under the GTR+G model.

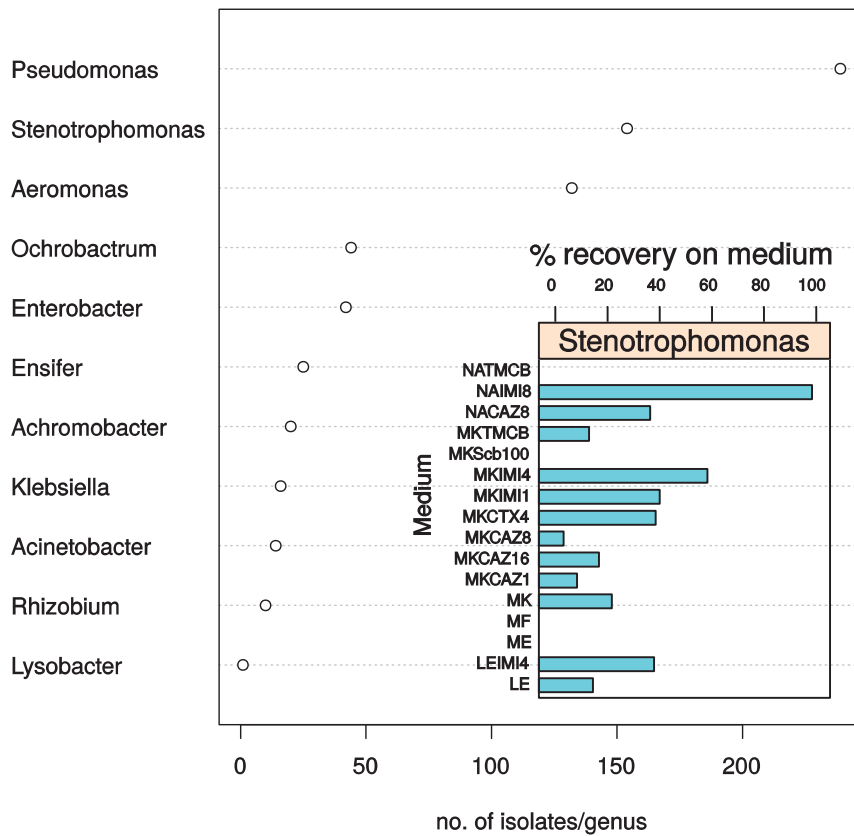


Figure S4. Recovery statistics for different genera (dotplot) and for *Stenotrophomonas* (inset barplot) on the different media amended or not with antibiotics ($\mu\text{g/ml}$). The media used were: NA = NAA; MK = MacConkey; MF MF=mFC; ME = mTEC; LE = Leeds LAM medium, which are described in the main text. A total of 697 strains were sequenced, and 22.1% of them corresponded to *Stenotrophomonas* spp. based on the 16S phylogenetic classification shown in Fig. S3.

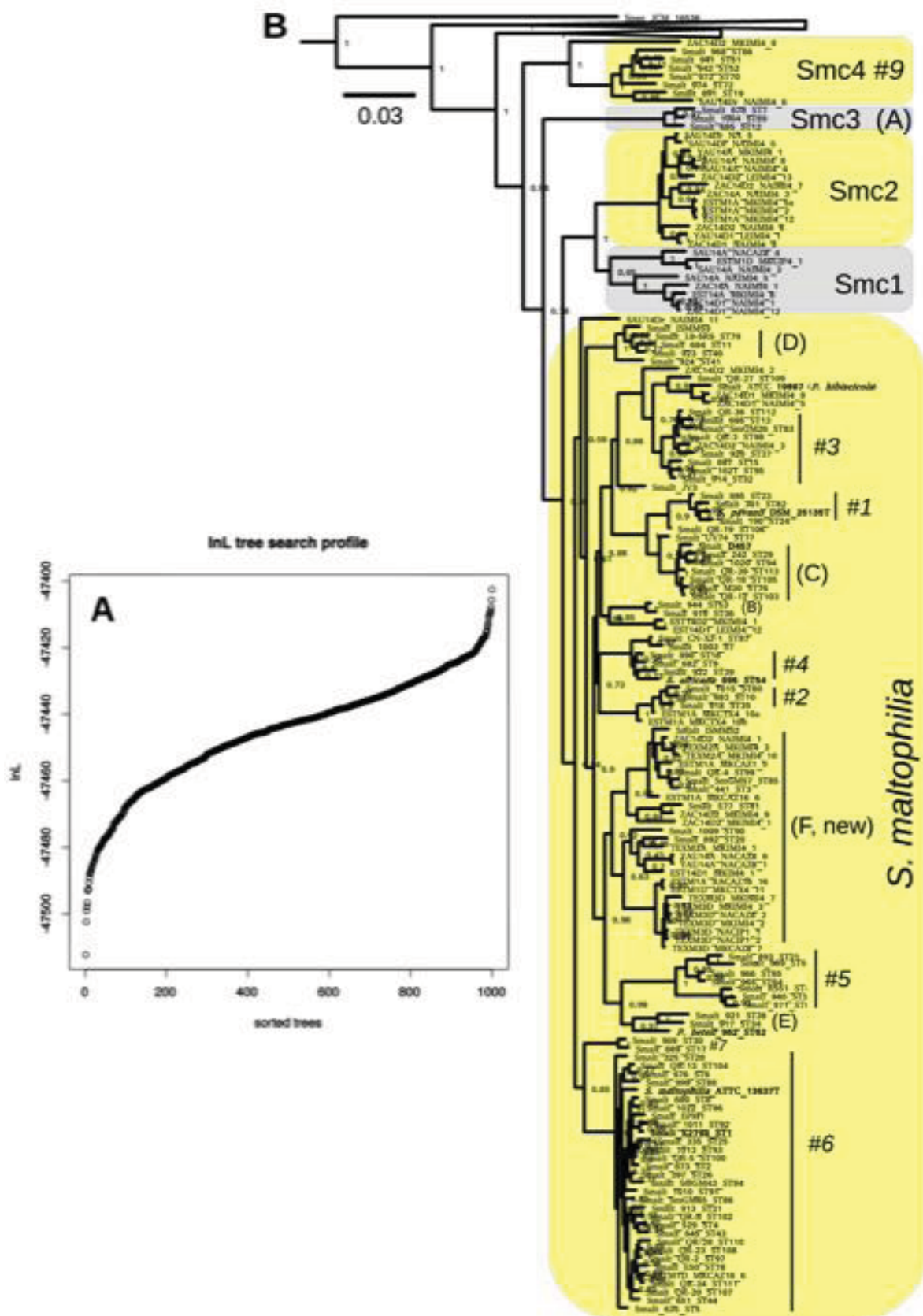


Figure S5. Results of the maximum-likelihood tree search. **A)** Sorted log-likelihood profile for the 10001 tree searches conducted under the maximum-likelihood criterion, starting from 1000 random trees and 1 BioNJ tree. The top-scoring phylogeny of this search is presented in Figures 1A and 1B in the main text. The $\ln L$ range = (-47512,-47403). The search started from the BioNJ tree reached a score of -47478.6287. **B)** The same tree as shown in Fig. 1B of the main text, but without collapsing the terminal clades containing only reference strains.

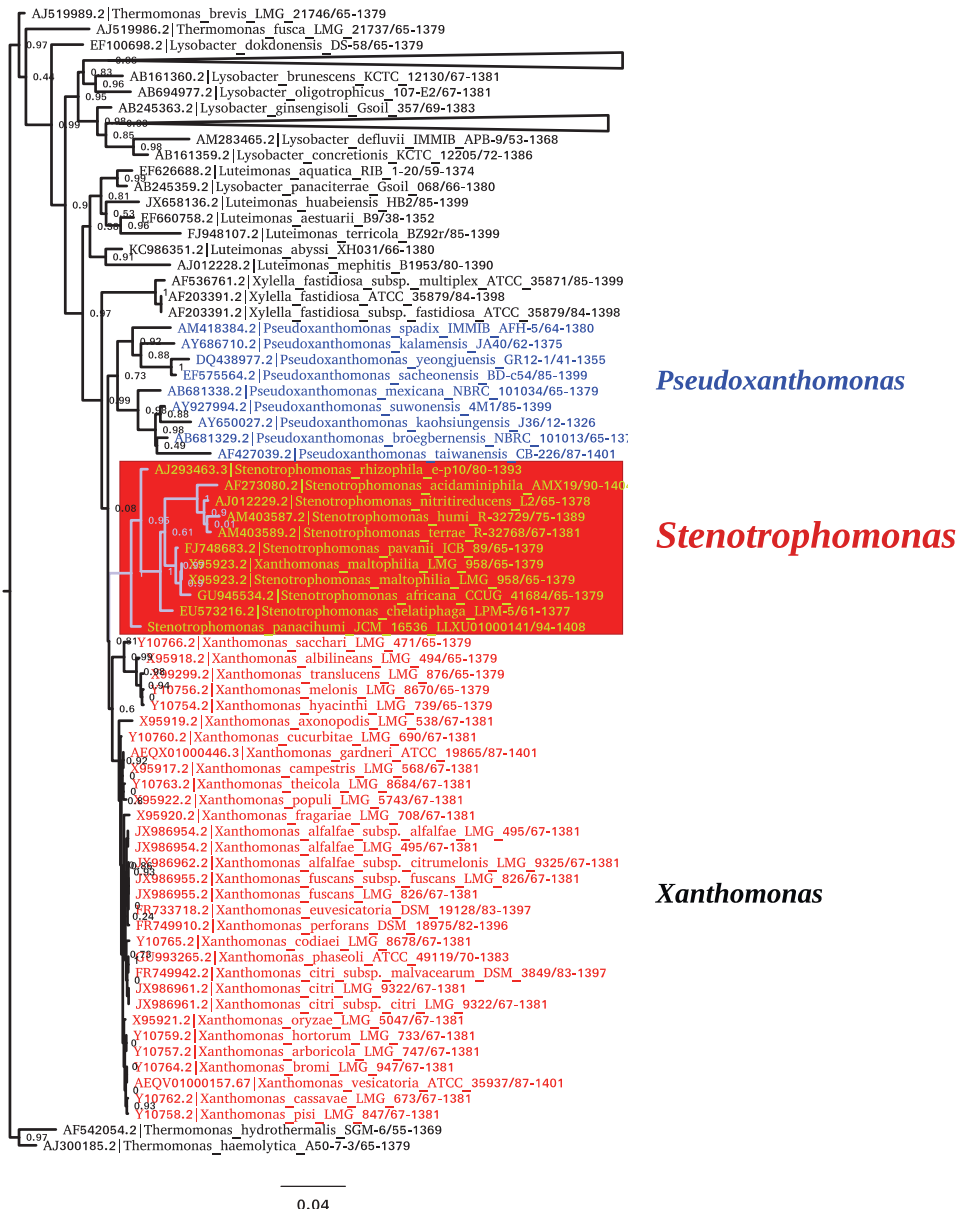


Figure S6. Maximum likelihood phylogeny of nearly full-length 16S rRNA gene sequences corresponding to the type strains of all species in the order Xanthomonadales. Some clades distantly related to the focal ones were collapsed to improve the legibility of the leaf labels.

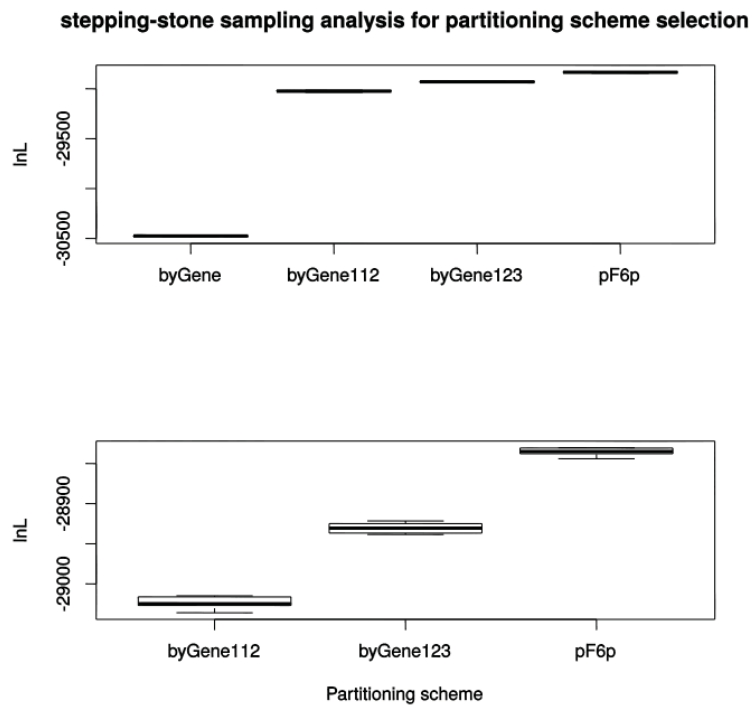


Figure S7. Parallel boxplots summarizing the results of the stepping-stone sampling analyses based on 10 replicate runs for each partitioning scheme, as detailed in methods. The graphs clearly show that the pF6p proposed by PartitionFinder (see previous section) is the best-fitting partitioning scheme of the four ones tested.

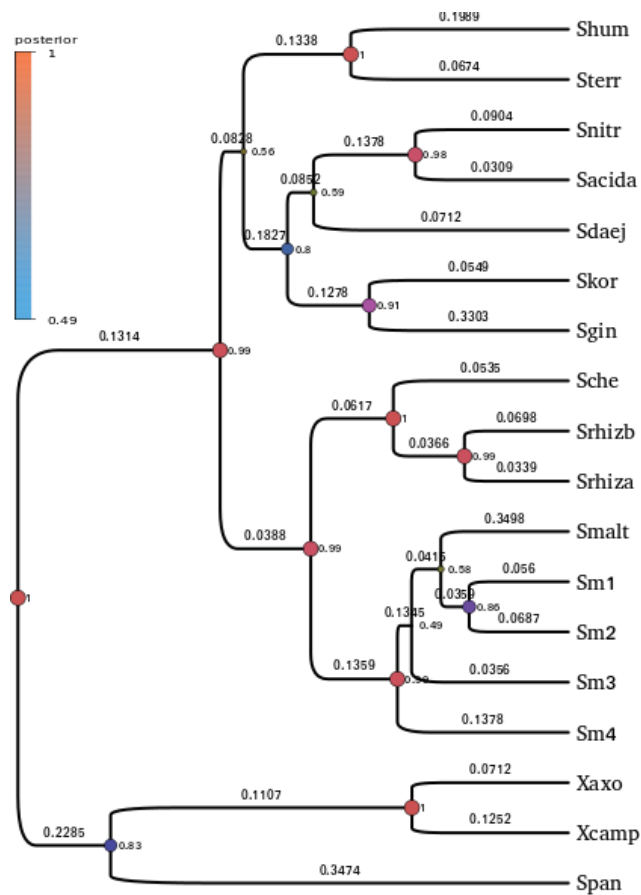


Figure S8. Consensus post-burnin (50%) Bayesian species tree from 3 replicate *BEAST runs. Most bipartitions have a significant (>0.95) posterior probability (color-coded circles at nodes), indicating that the data strongly support the topology. The exceptions are the splits subtending the Smc3 (Sm2) and *S. maltophilia* (Smalt) branches, which is most likely due to the very large population size estimated for the latter (indicated on the branches), suggesting that Smalt may contain further cryptic species. Species name abbreviations are as follows: Shum = *S. humi*; Sterr = *S. terrae*; Snitr = *S. nitrereducens*; Sacida = *S. acidaminiphila*; Sdaej = *S. daejeonesis*; Skor = *S. koreensis*; Sgin = *S. ginsengisoli*; Sche = *S. chelatiphaga*; Srhiz(ab) = *S. rhizophila*; Smalt = *S. maltophilia*; Sm1 = Smc1; Sm2 = Smc2; Sm2 = Smc3; Sm4 = Smc4; Xaxo = *Xanthomonas axonopodis*; Xcamp = *X. campestris*; Span = *S. panacihumi*.

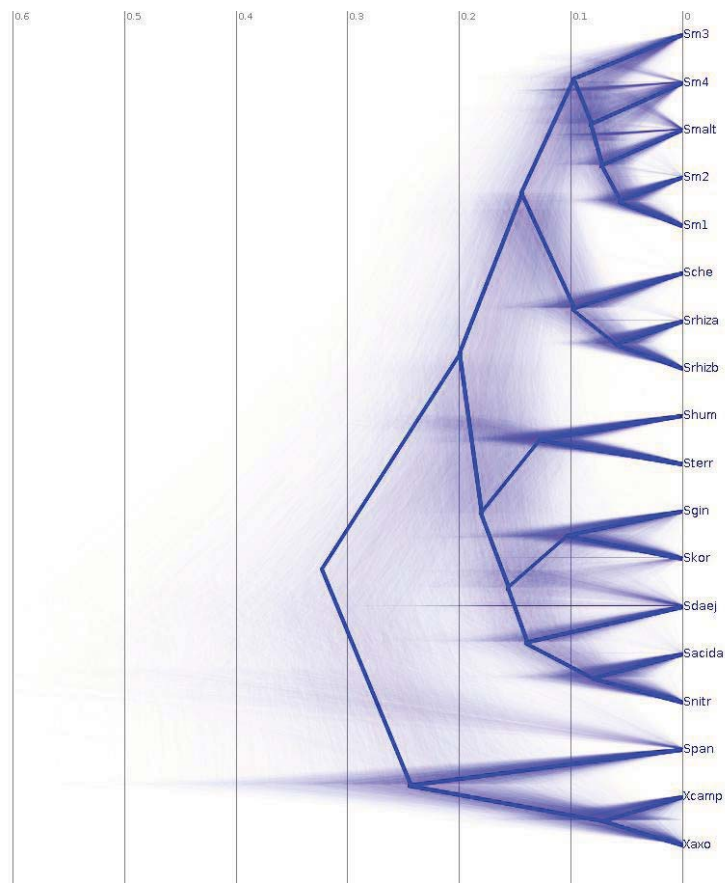


Figure S9. DensiTree (see methods) representation of the merged (3 replicate runs) post-burnin (50%) samples of *BEAST runs for the same best hypothesis shown in Fig. S8, which reveals that the source trees clearly support the separation of each species lineage, with uncertainty increasing towards the root, as expected. This tree represents the best-fitting species-delimitation hypothesis of those tested (see Figs 1A and 1B as well as Table 2 in the main text), which favors splitting the *S. maltophilia* complex into 5 species, as shown in Fig. 1B of the main text), and considering the lineages #8 and #10 as separate species (Fig. 1A).

Absolute frequencies for STs of Mexican SMC isolates

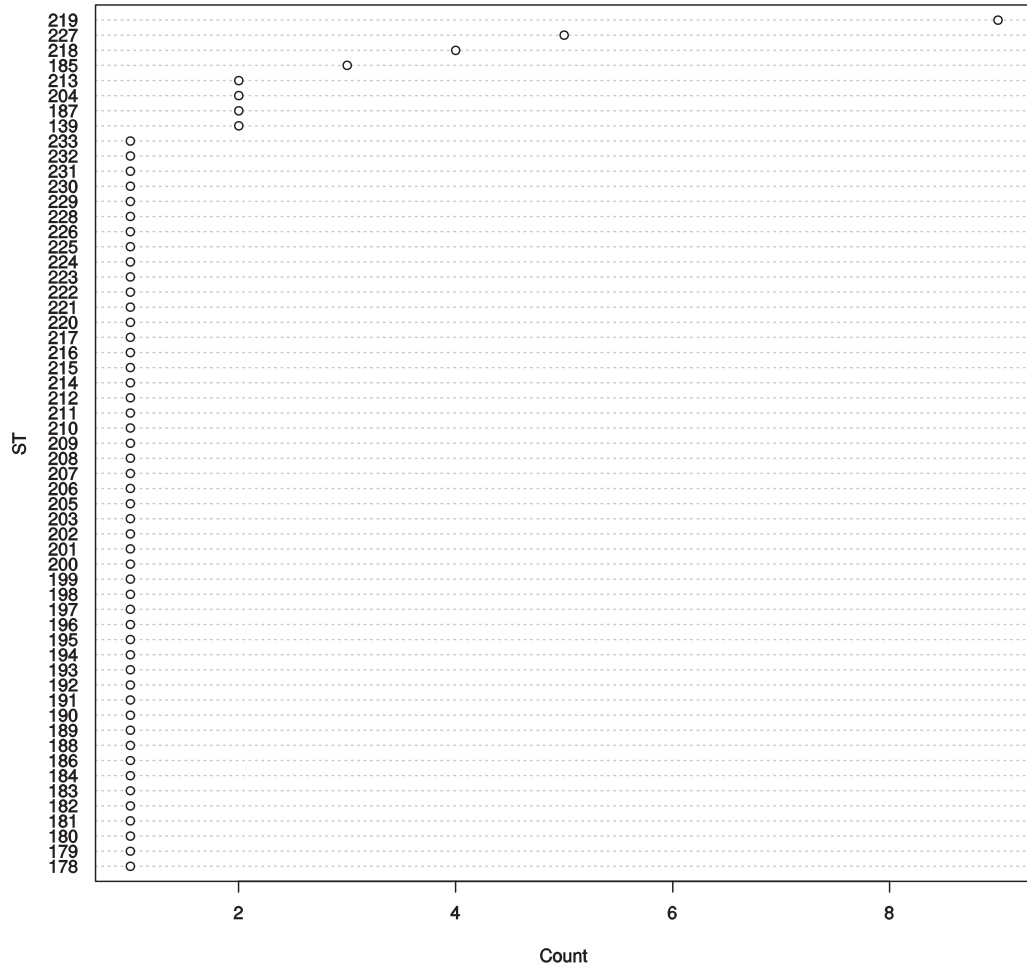


Figure S10. Cleveland dot-chart showing the absolute frequencies of the novel sequence types (STs) detected in the collection of Mexican *S. maltophilia* complex isolates. These range from ST178 to ST233, as listed in Table S4.

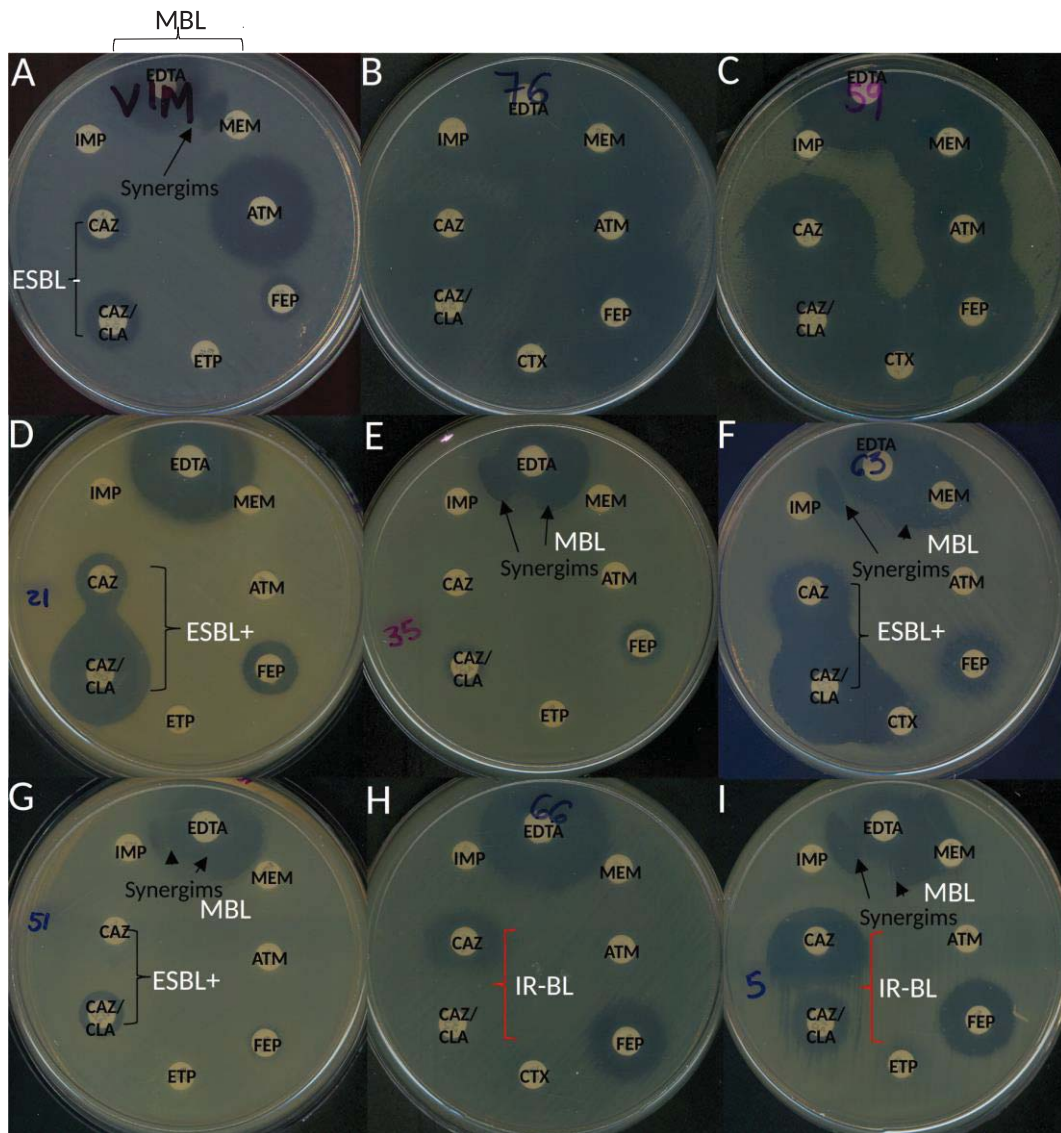


Fig. S11. Diversity of β -lactamase expression phenotypes detected among the Mexican environmental *Stenotrophomonas* isolates (B-I) using the double disk synergy (DDS) assay and the CLSI breakpoints listed in Table S2. **A)** classical MBL (VIM-2) producing phenotype expressed by a clinical *Pseudomonas aeruginosa* strain used as a control, and displaying a clear synergism between the carbapenem antibiotic meropenem (MEM) and the EDTA disc. In this control strain we can also see the lack of Aztreonam (ATM) hydrolysis, as MBLs can't hydrolyze it. The lack of synergism between CAZ and CAZ / CLA reveals that this particular *P. aeruginosa* strain does not produce extended-spectrum β -lactamases (ESBL negative). **B)** A highly sensitive *S. terrae* strain EST14D2_NAIMI4_5 is shown, which is fully sensitive to all antibiotics tested (coding = 0). **C)** The picture depicts the highly sensitive Sm2 strain SAU14Dr_NAIMI4_5, sensitive to all β -lactams (no ESBL or MBL production), except to the carbapenem imipenem. **D)** The Smc2 strain ESTM1D_MKCIP4_1 displays a clear synergism between CAZ and CAZ / CLA, revealing the production of an ESBL (coding = E). **E)** Depicts the synergism

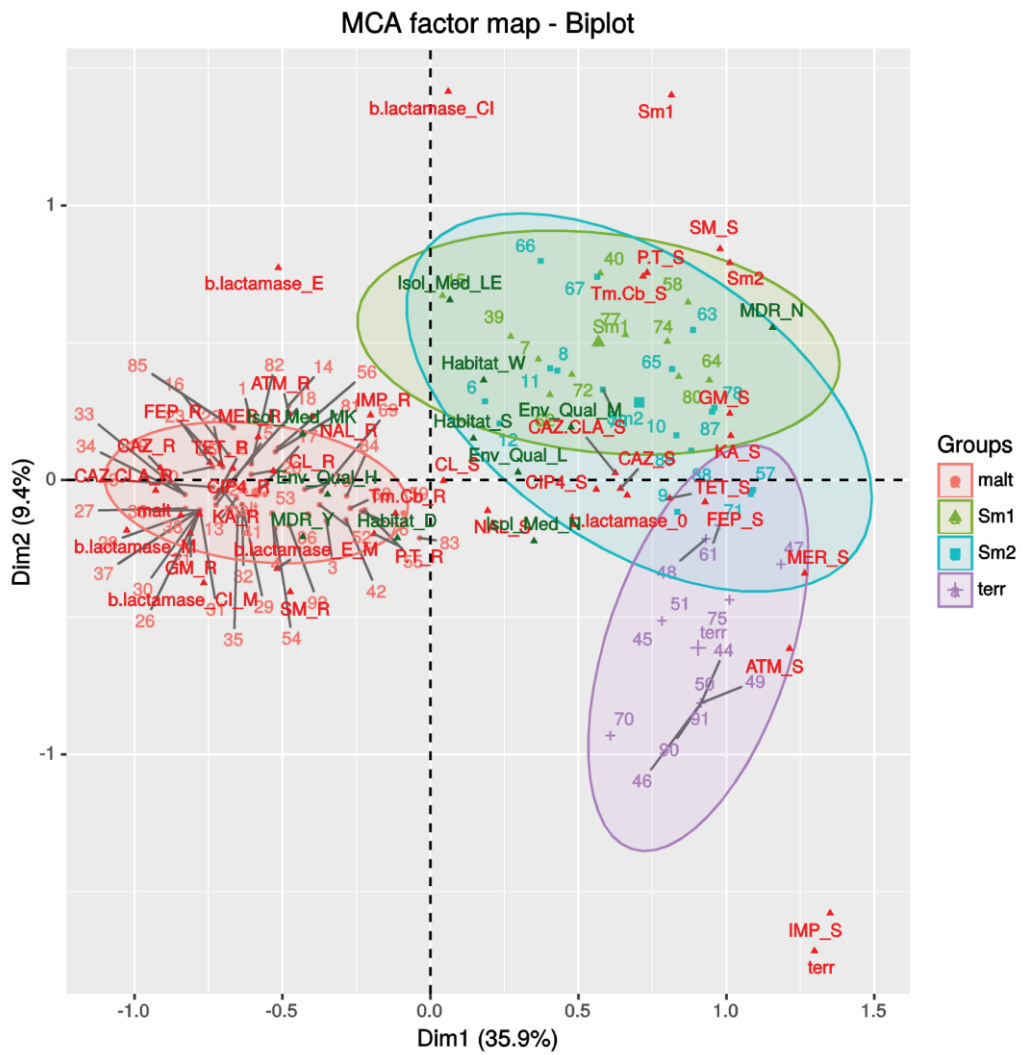


Fig. S12. Individuals-Factor biplot map resulting from the multiple correspondence analysis (MCA) of 17 active variables (red-coloured), four supplementary categorical variables (habitat, isolation medium, environmental quality and MDR status). The ellipses enclose individuals assigned to the four most abundant species (> 10 isolates) recovered from Mexican rivers, at the 95% confidence interval. Species name abbreviations are as follows: malt = *S. maltophilia*; Sm1 = Smc1; Sm2 = Smc2; terr = *S. terrae*.

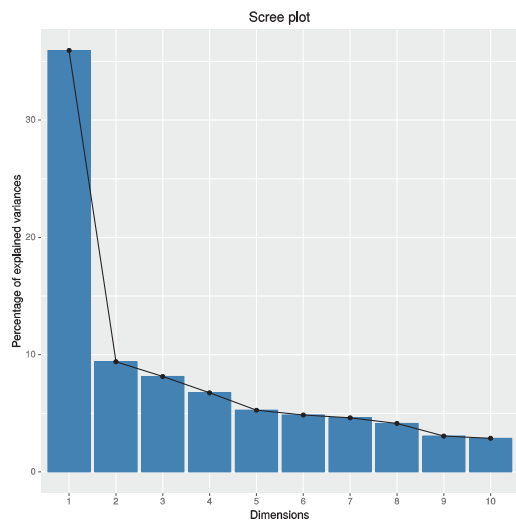
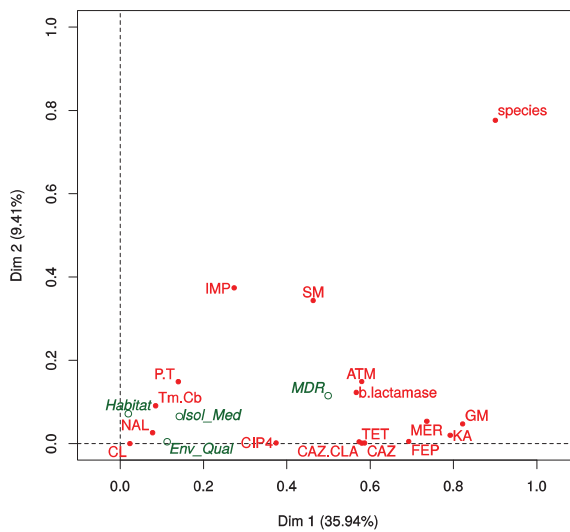
A**B**

Fig. S13. Screeplot (A) for the first 10 dimensions of the MCA presented in Fig. S12 and the variable plot (B) showing their correlations with the first and second dimensions.

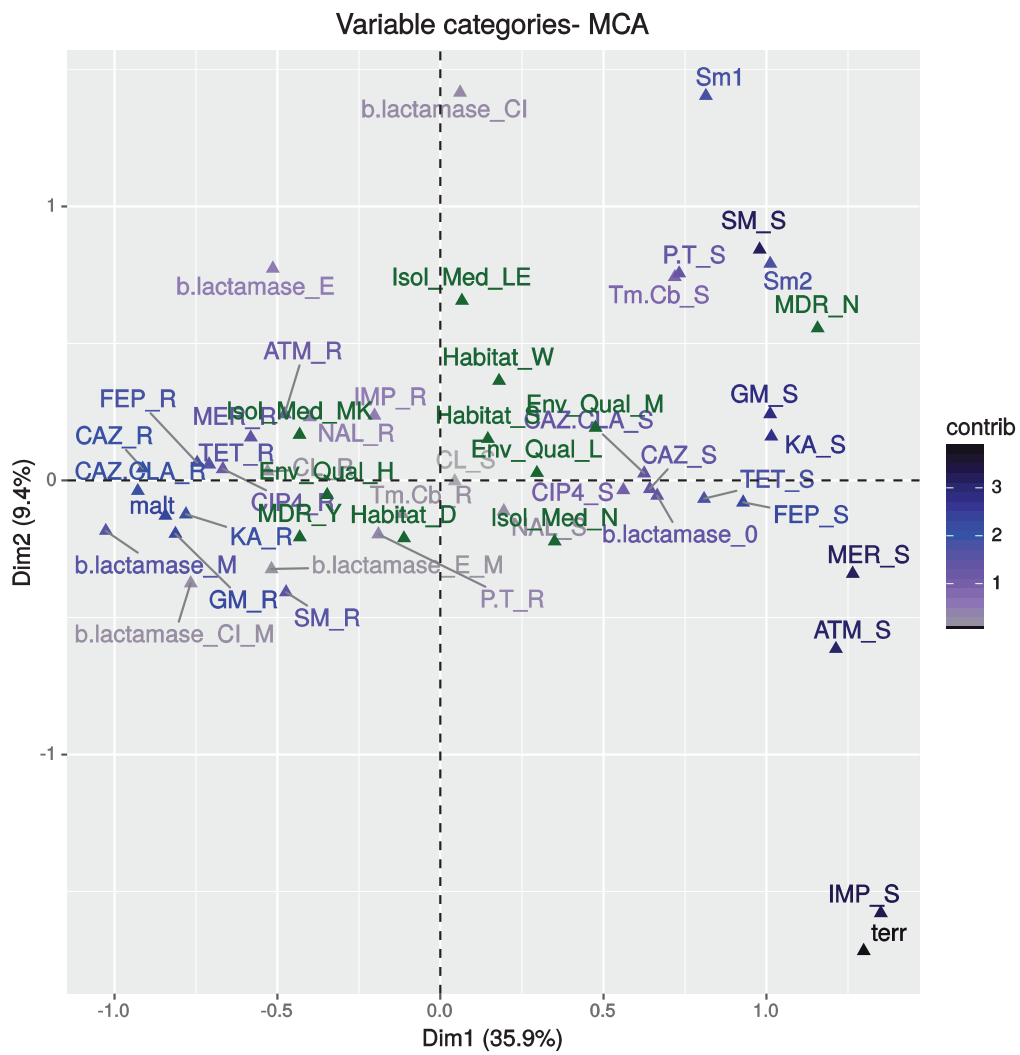


Figure S14. The Variable-categories plot, showing their contributions coded as indicated on the color scale.

Plate antibiotic resistance profiling and CLSI break points

Table S1. CLSI 2016 breakpoints for plate assays.

Antimicrobial Agent ^a	Break points CLSI 2016 (plate assays) Interpretative criteria (concentrations in µg/mL) ^b								
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>			<i>Enterobacteriaceae</i>		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
*This work (µg /ml)									
1.- Beta-lactams									
a) Cepheims: Ceftazidime 16 Cefotaxime 4	≤8	16	≥32	≤8	16	≥32	≤4 ≤1	8 2	≥16 ≥4
b) Carbapenems: Imipenem 4	≤2	4	≥8				≤1	2	≥4
c) Beta-lactamase/ inhibitor combinations: Piperacillin-tazobactam 128/4	≤16/4	32/4-64/4	≥128/4				≤16/4	32/4-64/4	≥128/4
2.- Aminoglycosides: Gentamicin 16 Kanamycin 64 Streptomycin 50	≤4	8	≥16				≤4 <16	8 32	≥16 >64
							*There are no MIC interpretative standards		
3.- Phenicol: Chloramphenicol 30				≤8	16	≥32	≤8	16	≥32
4.- Quinolones: Nalidixic acid 32 Fluoroquinolones: Ciprofloxacin 4							≤16 ≤1	– 2	≥32 ≥4
5.- Tetracyclines: Tetracycline 16							≤4	8	≥16
6.- Folate Pathway nhibitors: Trimethoprim 30 + carbenicillin 100							<8	Trimethoprim –	≥16

^aAntimicrobials assayed and their classification in families, as used in this work.

^bbreakpoints for plate assays currently not available for *Stenotrophomonas* in CLSI 2016 were taken from *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacteriaceae*.

Double disk synergism (DDS) assay for β -lactamase expression phenotyping and CLSI interpretative criteria for inhibition zones

Briefly, seven antibiotic discs [meropenem (10 μ g), imipenem (10 μ g), ertapenem (10 μ g), aztreonam (30 μ g), ceftazidime (30 μ g), ceftazidime-clavulanic acid (30/4 μ g) and cefepime (30 μ g)] (AB Bodish, Solna, Sweden) and one disc with 0.5 M EDTA pH 8.0 (5 μ g) were placed on a lawn of each strain grown on Mueller-Hinton plates. These were incubated at 30°C for 24-48 hrs, measuring the diameter of growth-inhibition halos around disks (Table S2), and recording synergisms between them.

Table S2. CLSI 2016 breakpoints for disk-diffusion assays.

Antimicrobial Agent *This work (μ g)	Break points CLSI 2016 (disc-diffusion assays) Inhibition zone diameter Interpretative criteria (nearest whole mm) ^a					
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Enterobacteriaceae</i>		
	S	I	R	S	I	R
1.- Beta-lactams						
a) Cephems:						
ceftazidime 30	≥ 18	15-17	≤ 14	≥ 21	18-20	≤ 17
cefotaxime 30				≥ 26	23-25	≤ 22
cefepime 30	≥ 18	15-17	≤ 14	≥ 25	–	≤ 18
b) Carbapenems:						
imipenem 10	≥ 19	16-18	≤ 15	≥ 23	20–22	≤ 19
meropenem 10	≥ 19	16-18	≤ 15	≥ 23	20–22	≤ 18
ertapenem 10				≥ 22	19–21	≤ 18
c) Beta-lactamase inhibitor combinations:						
ceftazidime/cavulanate 30/10						
2.- Monobactams	≥ 22	16-21	≤ 15	≥ 21	18-20	≤ 17
aztreonam 30						

^aBreakpoints for disk-diffusion assays are currently not available for *Stenotrophomonas* in CLSI 2016. Therefore we used the breakpoints for *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacteriaceae*.

Supplementary protocol 1: PCR amplification of 16S rDNA sequences and their phylogenetic analysis

Only the forward strand was sequenced for each amplicon with the fD1 primer, using capillary Sanger-sequencing commercially performed at Macrogen (South Korea). Raw reads were trimmed based on

Phred scores using phred (Ewing et al., 1998) and classified at the genus level using an in-house pipeline programmed in Perl that queries each sequence via blastn (Camacho et al., 2009) against a local instance of high quality, nearly full-length *rrs* sequences of bacterial type strains downloaded from the RDP-II server (Cole et al., 2007), retrieving the five closest hits. A local instance of pre-aligned sequences for this same *rrs* dataset downloaded from the RDP-II server was used to generate multiple sequence alignments of the newly generated sequences and selected blastn hits using the sequence to profile alignment function implemented in clustalw2 (Larkin et al., 2007). The resulting alignment was subjected to maximum-likelihood phylogenetic analysis with phylml 3 (Guindon et al., 2010), under best-fitting substitution models selected by jModelTest2 (Darriba et al., 2012).

Table S3. Summary of allele and ST assignments for Mexican isolates in the *Stenotrophomonas maltophilia* complex (Smc1=11, Smc2=15, *S. maltophilia* = 52), based on the ST profiles available at http://pubmlst.org/perl/bigssdb/bigssdb.pl?db=pubmlst_smaltophilia_seqdef&page=downloadProfiles&scheme_id=1, and downloaded on Nov. 18th, 2016.

gene	Number of New alleles	New allele numbers
<i>atpD</i>	24	87 to 110
<i>gapA</i>	27	95 to 121
<i>guaA</i>	38	124 to 161
<i>mutM</i>	43	81to 123
<i>nuoD</i>	29	89 to 117
<i>ppsA</i>	42	107 to148
<i>recA</i>	29	87 to115

Table S4. Allele and ST assignments for each of the 77 Mexican isolate from the Smc, based on the <http://pubmlst.org/smaltophilia/> MLST database, which was last queried on Nov. 18th, 2016, corresponding to the database update from 2016-10-27, when it contained 663 sequences, 177 STs and 266 isolates.

strain	<i>atpD</i>	<i>gapA</i>	<i>guaA</i>	<i>mutM</i>	<i>nuoD</i>	<i>ppsA</i>	<i>recA</i>	ST
EST14A_MKIMI4_8	21	95	124	81	89	107	87	178
ESTM1D_MKCIP4_1	87	96	125	82	90	108	88	179
SAU14A_NACAZ8_4	87	97	126	83	90	109	60	180
SAU14A_NAIMI4_3	87	97	126	84	90	110	89	181
SAU14A_NAIMI4_5	88	98	127	85	91	111	90	182
SAU14Dr_NAIMI4_8	89	99	128	86	92	112	91	183
ZAC14A_NAIMI4_1	90	100	129	87	93	113	92	184
ZAC14D1_MKIMI4_2	91	95	130	88	94	114	93	185
ZAC14D1_NAIMI4_1	91	95	130	88	94	114	93	185
ZAC14D1_NAIMI4_12	91	95	130	89	94	114	93	186
ZAC14D1_NAIMI4_6	91	95	130	88	94	114	93	185
ESTM1A_MKIMI1_10	92	101	131	90	95	115	94	187
ESTM1A_MKIMI4_12	92	101	131	90	96	115	94	188
ESTM1A_MKIMI4_2	92	101	131	90	95	115	94	187
ESTM1A_MKIMI4_5a	92	101	132	90	95	115	94	189
SAU14A_NAIMI4_4	93	102	133	91	97	116	95	190
SAU14A_NAIMI4_8	93	102	133	92	97	116	95	191
SAU14Dr_NAIMI4_5	94	103	134	93	98	117	96	192
SAU14Dr_NA_5	94	103	134	93	99	117	96	193
YAU14A_MKIMI4_1	93	102	135	94	97	118	95	194
YAU14D1_LEIMI4_1	95	104	136	95	100	119	97	195
ZAC14A_NAIMI4_3	94	105	137	96	101	120	98	196
ZAC14D1_NAIMI4_9	96	104	138	97	100	119	97	197
ZAC14D2_LEIMI4_13	93	106	139	91	97	121	95	198
ZAC14D2_NAIMI4_6	97	103	140	98	102	122	99	199
ZAC14D2_NAIMI4_7	98	103	141	99	103	123	100	200
EST14D1_LEIMI4_12	74	79	142	100	87	124	101	201
EST14D1_MKIMI4_1	99	107	143	101	104	125	102	202
EST14D2_LEIMI4_14	81	108	144	102	105	126	103	203
EST14D2_MKIMI4_1	74	109	145	103	87	127	101	204
EST14D2_MKIMI4_2	74	109	145	103	87	127	101	204
ESTM1A_MKCAZ16_6	100	8	146	104	4	15	104	205
ESTM1A_MKCAZ1_5	101	110	147	105	18	128	105	206
ESTM1A_MKCTX4_10a	6	111	148	18	106	129	20	207
ESTM1A_MKCTX4_10b	6	111	148	18	106	130	106	208
ESTM1A_RACAZ16_16	102	112	149	106	107	131	107	209

ESTM1D_MKCAZ16_6	3	4	110	46	6	38	58	139
ESTM1D_MKCTX4_11	102	112	149	106	107	132	107	210
SAU14A_NAIMI4_1	66	68	128	107	108	133	60	211
SAU14Da_NACAZ8_10	103	113	150	108	109	134	108	212
SAU14Da_NAIMI4_8	104	114	151	109	110	135	109	213
SAU14Dr_NACAZ8_5	43	13	52	27	111	136	17	214
SAU14Dr_NAIMI4_11	104	114	151	109	110	135	109	213
TEXM2A_MKIMI4_10	105	115	152	110	4	137	110	215
TEXM2A_MKIMI4_3	105	115	152	111	4	138	110	216
TEXM3A_MKIMI4_1	106	116	153	112	112	139	111	217
TEXM3A_NACIP1_4	102	112	154	106	107	140	107	218
TEXM3D_MKCAZ8_3	102	112	154	106	107	141	107	219
TEXM3D_MKCAZ8_7	102	112	154	106	107	140	107	218
TEXM3D_MKIMI4_2	102	112	154	113	107	141	107	220
TEXM3D_MKIMI4_3	102	112	154	114	107	141	107	221
TEXM3D_MKIMI4_4	102	112	154	106	107	141	107	219
TEXM3D_MKIMI4_5	102	112	154	106	107	141	107	219
TEXM3D_MKIMI4_6	102	112	154	106	107	141	107	219
TEXM3D_MKIMI4_7	102	112	154	106	113	141	107	222
TEXM3D_MKIMI4_8	102	112	154	106	107	141	107	219
TEXM3D_NACAZ8_1	102	112	154	106	107	141	107	219
TEXM3D_NACAZ8_2	102	112	154	115	107	141	107	223
TEXM3D_NACIP1_1	102	112	154	106	107	141	107	219
TEXM3D_NACIP1_2	102	112	154	116	107	141	107	224
TEXM3D_NACIP1_3	102	112	154	106	107	140	107	218
TEXM3D_NACIP1_4	102	112	154	106	107	140	107	218
TEXM3D_NACIP1_6	102	112	154	106	107	141	107	219
TEXM3D_NA_2	102	112	154	106	107	141	107	219
YAU14A_NACAZ8_1	106	117	155	117	114	142	112	225
YAU14A_NACAZ8_6	106	117	155	118	114	142	112	226
YAU14D1_LEIMI4_7	3	4	110	46	6	38	58	139
ZAC14D1_MKIMI4_10	81	118	156	119	72	143	113	227
ZAC14D1_MKIMI4_6	81	118	156	119	72	143	113	227
ZAC14D1_MKIMI4_8	81	118	157	119	72	143	79	228
ZAC14D1_NAIMI4_10	81	118	156	119	72	143	113	227
ZAC14D1_NAIMI4_5	81	118	156	119	72	143	113	227
ZAC14D1_NA_5	81	118	156	119	72	143	113	227
ZAC14D2_MKIMI4_1	107	119	158	120	115	144	114	229
ZAC14D2_MKIMI4_2	108	90	159	121	6	145	80	230
ZAC14D2_MKIMI4_9	109	120	158	122	116	146	115	231
ZAC14D2_NAIMI4_1	110	8	160	33	4	147	110	232
ZAC14D2_NAIMI4_3	13	121	161	123	117	148	22	233

Table S5. D'Agostino's test of skewness for the species-specific NumR and NumFam data.

data	skew	z	p-value
dfr.smalt\$NumR	-0.57897,	-1.80020,	0.07184
dfr.smalt\$NumFam	-0.88607,	-2.60780,	0.009112**
dfr.sm1\$NumR	0.43513,	0.79391,	0.4272
dfr.sm1\$NumFam	0.38420,	0.70233,	0.4825
dfr.sm2\$NumR	-0.071881,	-0.152440,	0.8788
dfr.sm2\$NumFam	0.57799,	1.19320,	0.2328
dfr.terr\$NumR	-0.54765,	-1.04280,	0.2971
dfr.terr\$NumFam	-0.74793,	-1.40340,	0.1605

Table S6. Shapiro test of normality for the total and species-specific NumR and NumFam data.

data	W	p-value
dfr.total.clean\$NumR	0.89383	0.000001557***
dfr.total.clean\$NumFam	0.86688	0.0000001215***
dfr.smalt\$NumR	0.93796	0.009261**
dfr.smalt\$NumFam	0.70152	0.00000000555***
dfr.smc1\$NumR	0.8155	0.01505*
dfr.smc1\$NumFam	0.87859	0.09985
dfr.smc2\$NumR	0.94551	0.3895
dfr.smc2\$NumFam	0.8386	0.007222**
dfr.terr\$NumR	0.90913	0.1784
dfr.terr\$NumFam	0.75584	0.002134**

The following tables summarize the results of Wilcoxon's robust 1-way ANOVA with trimmed means ($tr = .2$) and bootstrap-estimated ($nboot = 2000$) sampling distribution for the trimmed means of the number of antibiotic resistances (NumR) and number of resistance families (NumFam).

Table S7. Wilcoxon's *post-hoc* analysis for the analysis of NumR by t1 waybt ($tr = .2$; boot=2000). Test statistic: 149.9521, p -value: 0. Variance explained 0.652. Effect size 0.808

comparisons	psihat	ci.lower	ci.upper	p-value
malt-Sm2	7.48214	5.76339	9.00000	0.0000
malt-Sm1	8.26136	7.17330	9.39773	0.0000
malt-terr	8.95833	8.27431	9.72222	0.0000
Sm2-Sm1	0.77922	-1.01299	2.72727	0.5210
Sm2-terr	1.47619	-0.07937	3.30159	0.1150
Sm1-terr	0.69697	-0.43434	1.88889	0.3055

Table S8. Wilcoxon's *post-hoc* analysis for the analysis of NumFam by t1 waybt ($tr = .2$; boot=2000) for NumFam. Test statistic: 51.1979; p -value: 0. Variance explained 0.723. Effect size 0.85

comparisons	psihat	ci.lower	ci.upper	p-value
malt-Sm2	2.37054	1.70536	2.89286	0.0000
malt-Sm1	2.65625	1.96307	3.10795	0.0000
malt-terr	2.10069	1.67708	2.63889	0.0000
Sm2-Sm1	0.28571	-0.49351	1.02597	0.6460
Sm2-terr	-0.26984	-0.87302	0.55556	0.6165
Sm1-terr	-0.55556	-1.07071	0.24242	0.2625

Supplementary References

- Bush K., Flamm R.K., Ohringer S., Singer S.B., Summerill R., Bonner D.P. (1991). Effect of clavulanic acid on activity of beta-lactam antibiotics in *Serratia marcescens* isolates producing both a TEM beta-lactamase and a chromosomal cephalosporinase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**:2203-8.
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., and Madden, T.L. (2009) BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* **10**: 421.
- CLSI (2016) *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Performance Standards for Antimicrobial susceptibility testing*. Wayne, Pennsylvania Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Cole, J.R., Chai, B., Farris, R.J., Wang, Q., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M. et al. (2007) The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Res.* **35**: 169-172.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., and Posada, D. (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* **9**: 772.
- Ewing, B., and Green, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* **8**: 186-194.
- 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.
- Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S.Y., and Guindon, S. (2012) Partitionfinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Mol. Biol. Evol.* **29**: 1695-1701.
- 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.
- Lister PD, Gardner VM, Sanders CC (1999). Clavulanate induces expression of the *Pseudomonas aeruginosa* AmpC cephalosporinase at physiologically relevant concentrations and antagonizes the antibacterial activity of ticarcillin. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999 Apr;**43**(4):882-889.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S. et al. (2012) MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* **61**: 539-542.
- Shapiro, B., Rambaut, A., and Drummond, A.J. (2006) Choosing appropriate substitution models for the phylogenetic analysis of protein-coding sequences. *Mol. Biol. Evol.* **23**: 7-9.
- Xie, W., Lewis, P.O., Fan, Y., Kuo, L., and Chen, M.H. (2011) Improving marginal likelihood estimation for Bayesian phylogenetic model selection. *Syst Biol* **60**: 150-160.

Anexo 3. Genome announcements: Complete Genome Sequencing of *Stenotrophomonas acidaminiphila* ZAC14D2_NAIMI4_2, a Multidrug-Resistant Strain Isolated from Sediments of a Polluted River in Mexico, Uncovers New Antibiotic Resistance Genes and a Novel Cass-II Lasso Peptide Biosynthesis Gene Cluster



Complete Genome Sequencing of *Stenotrophomonas acidaminiphila* ZAC14D2_NAIMI4_2, a Multidrug-Resistant Strain Isolated from Sediments of a Polluted River in Mexico, Uncovers New Antibiotic Resistance Genes and a Novel Class-II Lasso Peptide Biosynthesis Gene Cluster

Pablo Vinuesa, Luz Edith Ochoa-Sánchez

Centro de Ciencias Genómicas, Programa de Ingeniería Genómica, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, Mexico

Here, we report the first complete genome sequence of a *Stenotrophomonas acidaminiphila* strain, generated with PacBio RS II single-molecule real-time technology, consisting of a single circular chromosome of 4.13 Mb. We annotated mobile genetic elements and natural product biosynthesis clusters, including a novel class-II lasso peptide with a 7-residue macrolactam ring.

Received 14 October 2015 Accepted 17 October 2015 Published 10 December 2015

Citation Vinuesa P, Ochoa-Sánchez LE. 2015. Complete genome sequencing of *Stenotrophomonas acidaminiphila* ZAC14D2_NAIMI4_2, a multidrug-resistant strain isolated from sediments of a polluted river in Mexico, uncovers new antibiotic resistance genes and a novel class-II lasso peptide biosynthesis gene cluster. *Genome Announc* 3(6): e01433-15. doi:10.1128/genomeA.01433-15.

Copyright © 2015 Vinuesa and Ochoa-Sánchez. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 3.0 Unported license](http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Pablo Vinuesa, vinuesa@ccg.unam.mx.

The genus *Stenotrophomonas* currently comprises 13 validly described species (<http://www.bacterio.net/stenotrophomonas.html>), but genome sequences are available only for *S. maltophilia* and *S. rhizophila*. Here, we report the first and complete genome sequence of an *S. acidaminiphila* isolate. Strain ZAC14D2_NAIMI4_2 (BioProject PRJNA296415; BioSample SAMN04099006) was recovered from superficial sediments of a polluted river in Morelos, Mexico (1). Strain ZAC14D2_NAIMI4_2 was confidently classified based on a multilocus sequence analysis (1), using the 7 loci of the *S. maltophilia* scheme (2).

Genomic DNA was purified with the DNeasy blood and tissue kit (Qiagen) and sheared into ~10- to 20-kb fragments for PacBio library preparation and P6-C4 sequencing on one single-molecule real-time (SMRT) cell at the Yale Center for Genome Analysis (USA). The continuous long reads were assembled using the HGAP/Quiver-protocol in SMRT portal version 2.3.0.140936.p4 (3), resulting in an assembly with 1 contig. It was circularized by trimming the terminal repeats with Minimus2 (4), and subjected to three consecutive rounds of read remapping with the RS_Resequencing.1 module, resulting in a final assembly with a mean coverage of ~150× and 100% concordance with the reference. The size of the assembled genome is 4,138,297 bp, with a G+C content of 68.48%.

Gene calling and annotation was performed with a modified version of Prokka (5) that filters BLASTp (6) results taking query coverage (≥80%) into account, interrogates NCBI's RefSeq prokaryotic nonredundant proteins database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/about/nonredundantproteins>), and properly classifies ncRNAs, adding the ncRNA_class attribute. A total of 3,793 genes, 3,617 coding sequences, and 16 pseudogenes were identified. Additionally, genes for 68 tRNAs, 9 rRNAs, and 1 tmRNA were annotated, plus 20 ncRNAs, 7 riboswitches (Cobalamin, Gly-

cine, SAM, and TPP), and 532 signal peptides. The annotation was enriched with prophage predictions suggested by the PHAST server (7), genomic islands detected by IslandViewer3 (8), and secondary metabolite biosynthesis gene cluster predictions made by antiSMASH version 3.0.4 (9). The annotation was manually curated. The presence of antibiotic resistance genes and antibiotic efflux pumps was further investigated using BLASTp (6) searches against locally maintained versions of the CARD (10) and ResFinder (11) databases, and hmmscan (12) searches against ResFam (13). Together, these analyses revealed the presence of at least 6 RND and 3 ABC antibiotic efflux pump systems, a novel putative chloramphenicol acetyltransferase (AOT14_04360) linked to the genomic island GI_Stac2, two Ambler class-A beta-lactamases, a class-B metallo-beta-lactamase, and OqxA and QnrB20 homologues, potentially conferring resistance against fluoroquinolones. No class-1 or class-2 integrons, or ISCR elements were found.

Four gene clusters were detected, potentially encoding for the production of a homoserine lactone, a class-III bacteriocin, an aryl polyene related to Xanthomonadin (14), and a novel class-II lasso peptide. Analysis of the precursor peptide of the latter (MNSN DNTGVHADEVIVLGVASVETQ~GILQGNPEPMGGEPVPGIS EE), encoded by StcA (AOT14_30750), revealed a perfect match to the consensus leader peptide motif (15), shown in boldface. The underlined residues in the core peptide (after the “~” symbol) are predicted to form a small, 7-residue macrolactam ring, as in xanthomonins (16).

Nucleotide sequence accession number. The complete genome sequence of *Stenotrophomonas acidaminiphila* strain ZAC14D2_NAIMI4_2 is available from GenBank under accession number CP012900.

ACKNOWLEDGMENTS

L.E.O.-S. is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship no. 26217 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, Mexico). This study was supported by grants CONACyT 179133 and DGAPA-PAPIIT/UNAM IN211814 to P.V.

We gratefully thank Javier Rivera Campos (CCG-UNAM) for technical support and Guilin Wang from the Yale Center for Genome Analysis, Yale University, for skillfully performing the PacBio sequencing. Alfredo Hernández Álvarez (CCG-UNAM) is acknowledged for expert support with server system administration.

REFERENCES

- Ochoa-Sánchez LE, Tinoco-Carrillo P, Rivera-Campos J, Vinuesa P. 2015. High diversity of multi-drug resistant environmental *Stenotrophomonas* strains from Mexican rivers and sediments revealed by MLSA. Abstr. 115th Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol., poster 2616.
- Kaiser S, Biehler K, Jonas D. 2009. A *Stenotrophomonas maltophilia* multilocus sequence typing scheme for inferring population structure. J Bacteriol 191:2934–2943. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00892-08>.
- Chin C, Alexander DH, Marks P, Klammer AA, Drake J, Heiner C, Clum A, Copeland A, Huddleston J, Eichler EE, Turner SW, Korlach J. 2013. Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data. Nat Methods 10:563–569. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2474>.
- Treangen TJ, Sommer DD, Angly FE, Koren S, Pop M. 2011. Next generation sequence assembly with AMOS. Curr Protoc Bioinformatics Chapter 11:Unit 11.8. <http://dx.doi.org/10.1002/0471250953.bi1108s33>.
- Seemann T. 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics 30:2068–2069. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>.
- Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, Madden TL. 2009. BLAST+: architecture and applications. BMC Bioinformatics 10:421. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>.
- Zhou Y, Liang Y, Lynch KH, Dennis JJ, Wishart DS. 2011. PHAST: a fast phage search tool. Nucleic Acids Res 39:W347–W352. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkr485>.
- Dhillon BK, Laird MR, Shay JA, Winsor GL, Lo R, Nizam F, Pereira SK, Waglechner N, McArthur AG, Langille MGI, Brinkman FSL. 2015. IslandViewer 3: More flexible, interactive genomic island discovery, visualization and analysis. Nucleic Acids Res 43:W104–W108. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkv401>.
- Weber T, Blin K, Duddela S, Krug D, Kim HU, Bruccoleri R, Lee SY, Fischbach MA, Müller R, Wohlleben W, Breitling R, Takano E, Medema MH. 2015. antiSMASH 3.0—a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. Nucleic Acids Res 43:W237–W243. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkv437>.
- McArthur AG, Waglechner N, Nizam F, Yan A, Azad MA, Baylay AJ, Bhullar K, Canova MJ, De Pascale G, Ejim L, Kalan L, King AM, Koteva K, Morar M, Mulvey MR, O'Brien JS, Pawlowski AC, Piddock LJV, Spanogiannopoulos P, Sutherland AD, Tang I, Taylor PL, Thaker M, Wang W, Yan M, Yu T, Wright GD. 2013. The comprehensive antibiotic resistance database. Antimicrob Agents Chemother 57:3348–3357. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00419-13>.
- Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, Aarestrup FM, Larsen MV. 2012. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. J Antimicrob Chemother 67:2640–2644. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks261>.
- Eddy SR. 2011. Accelerated profile HMM Searches. PLoS Comput Biol 7:e1002195. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002195>.
- Gibson MK, Forsberg KJ, Dantas G. 2015. Improved annotation of antibiotic resistance determinants reveals microbial resistomes cluster by ecology. ISME J 9:207–216. <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2014.106>.
- Goel AK, Rajagopal L, Nagesh N, Sonti RV. 2002. Genetic locus encoding functions involved in biosynthesis and outer membrane localization of xanthomonadin in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. J Bacteriol 184:3539–3548. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.184.13.3539-3548.2002>.
- Hegemann JD, Zimmermann M, Xie X, Marahiel MA. 2015. Lasso peptides: an intriguing class of bacterial natural products. Acc Chem Res 48:1909–1919. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00156>.
- Hegemann JD, Zimmermann M, Zhu S, Steuber H, Harms K, Xie X, Marahiel MA. 2014. Xanthomonins I–III: a new class of lasso peptides with a seven-residue macrolactam ring. Angew Chem Int Ed 53:2230–2234. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201309267>.



GET_PHYLOMARKERS, a Software Package to Select Optimal Orthologous Clusters for Phylogenomics and Inferring Pan-Genome Phylogenies, Used for a Critical Geno-Taxonomic Revision of the Genus *Stenotrophomonas*

OPEN ACCESS

Edited by:

Jesus L. Romalde,
Universidad de Santiago de
Compostela, Spain

Reviewed by:

Francisco Jose Roig,
Universitat de València, Spain
Anne-Kristin Kaster,
Karlsruher Institut für Technologie,
Germany

*Correspondence:

Pablo Vinuesa
vinuesa@ccg.unam.mx
orcid.org/0000-0001-6119-2956

[†]Bruno Contreras-Moreira
orcid.org/0000-0002-5462-907X

Specialty section:

This article was submitted to
Evolutionary and Genomic
Microbiology,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 16 January 2018

Accepted: 05 April 2018

Published: 01 May 2018

Citation:

Vinuesa P, Ochoa-Sánchez LE and
Contreras-Moreira B (2018)
GET_PHYLOMARKERS, a Software
Package to Select Optimal
Orthologous Clusters for
Phylogenomics and Inferring
Pan-Genome Phylogenies, Used for a
Critical Geno-Taxonomic Revision of
the Genus *Stenotrophomonas*.
Front. Microbiol. 9:771.
doi: 10.3389/fmicb.2018.00771

Pablo Vinuesa^{1*}, Luz E. Ochoa-Sánchez¹ and Bruno Contreras-Moreira^{2,3†}

¹ Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mexico, ² Estación Experimental de Aula Dei – Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Zaragoza, Spain, ³ Fundación Agencia Aragonesa para la Investigación y el Desarrollo (ARAID), Zaragoza, Spain

The massive accumulation of genome-sequences in public databases promoted the proliferation of genome-level phylogenetic analyses in many areas of biological research. However, due to diverse evolutionary and genetic processes, many loci have undesirable properties for phylogenetic reconstruction. These, if undetected, can result in erroneous or biased estimates, particularly when estimating species trees from concatenated datasets. To deal with these problems, we developed GET_PHYLOMARKERS, a pipeline designed to identify high-quality markers to estimate robust genome phylogenies from the orthologous clusters, or the pan-genome matrix (PGM), computed by GET_HOMOLOGUES. In the first context, a set of sequential filters are applied to exclude recombinant alignments and those producing anomalous or poorly resolved trees. Multiple sequence alignments and maximum likelihood (ML) phylogenies are computed in parallel on multi-core computers. A ML species tree is estimated from the concatenated set of top-ranking alignments at the DNA or protein levels, using either FastTree or IQ-TREE (IQT). The latter is used by default due to its superior performance revealed in an extensive benchmark analysis. In addition, parsimony and ML phylogenies can be estimated from the PGM. We demonstrate the practical utility of the software by analyzing 170 *Stenotrophomonas* genome sequences available in RefSeq and 10 new complete genomes of Mexican environmental *S. maltophilia* complex (Smc) isolates reported herein. A combination of core-genome and PGM analyses was used to revise the molecular systematics of the genus. An unsupervised learning approach that uses a goodness of clustering statistic identified 20 groups within the Smc at a core-genome average nucleotide identity (cgANI_b) of 95.9% that are perfectly consistent with strongly supported clades on the core- and pan-genome trees. In addition, we identified 16 misclassified RefSeq genome sequences, 14 of them labeled as *S. maltophilia*, demonstrating

the broad utility of the software for phylogenomics and geno-taxonomic studies. The code, a detailed manual and tutorials are freely available for Linux/UNIX servers under the GNU GPLv3 license at https://github.com/vinuesa/get_phylomarkers. A docker image bundling GET_PHYLOMARKERS with GET_HOMOLOGUES is available at https://hub.docker.com/r/csicunam/get_homologues/, which can be easily run on any platform.

Keywords: phylogenetics, genome-phylogeny, maximum-likelihood, species-tree, species delimitation, *Stenotrophomonas maltophilia* complex, Mexico

INTRODUCTION

Accurate phylogenies represent key models of descent in modern biological research. They are applied to the study of a broad spectrum of evolutionary topics, ranging from the analysis of populations up to the ecology of communities (Dornburg et al., 2017). The way microbiologists describe and delimit species is undergoing a major revision in the light of genomics (Vandamme and Peeters, 2014; Rosselló-Móra and Amann, 2015), as reflected in the emerging field of microbial genomic taxonomy (Konstantinidis and Tiedje, 2007; Thompson et al., 2009, 2013). Current geno-taxonomic practice is largely based on the estimation of (core-)genome phylogenies (Daubin et al., 2002; Lerat et al., 2003; Tettelin et al., 2005; Ciccarelli et al., 2006; Wu and Eisen, 2008) and the computation of diverse overall genome relatedness indices (OGRIs) (Chun and Rainey, 2014), such as the popular genomic average nucleotide identity (gANI) values (Konstantinidis and Tiedje, 2005; Goris et al., 2007; Richter and Rosselló-Móra, 2009). These indices are rapidly and effectively replacing the traditional DNA-DNA hybridization values used for species delimitation in the pre-genomic era (Stackebrandt and Goebel, 1994; Vandamme et al., 1996; Stackebrandt et al., 2002).

The ever-increasing volume of genome sequences accumulating in public sequence repositories provides a huge volume of data for phylogenetic analysis. This significantly improves our capacity to understand the evolution of species and any associated traits (Dornburg et al., 2017). However, due to diverse evolutionary forces and processes, many loci in genomes have undesirable properties for phylogenetic reconstruction. If undetected, these can lead to erroneous or biased estimates (Shen et al., 2017; Parks et al., 2018), although, ironically, with strong branch support (Kumar et al., 2012). Their impact is particularly strong in concatenated datasets (Kubatko and Degnan, 2007; Degnan and Rosenberg, 2009), which are standard in microbial phylogenomics (Wu and Eisen, 2008). Hence, robust phylogenomic inference requires the selection of well-suited markers for the task (Vinuesa, 2010).

For this study we developed GET_PHYLOMARKERS, an open-source and easy-to-use software package designed with the aim of inferring robust genome-level phylogenies and providing tools for microbial genome taxonomy. We describe the implementation details of the pipeline and how it integrates with GET_HOMOLOGUES (Contreras-Moreira and Vinuesa, 2013; Vinuesa and Contreras-Moreira, 2015). The latter is a popular and versatile genome-analysis software package designed to identify robust clusters of homologous sequences. It has

been widely used in microbial pan-genomics and comparative genomics (Lira et al., 2017; Nourdin-Galindo et al., 2017; Savory et al., 2017; Sandner-Miranda et al., 2018), including recent bacterial geno-taxonomic (Gauthier et al., 2017; Gomila et al., 2017), and plant pan-genomic studies (Contreras-Moreira et al., 2017; Gordon et al., 2017). Regularly updated auxiliary scripts bundled in the GET_HOMOLOGUES package compute diverse OGRIs, at the protein, CDS and transcript levels, provide graphical and statistical tools for a range of pan-genome analyses, including inference of pan-genome phylogenies under the parsimony criterion. GET_PHYLOMARKERS was designed to work both at the core-genome and pan-genome levels, using either the homologous gene clusters or the pan-genome matrix (PGM) computed by GET_HOMOLOGUES. In the first context, it identifies single-copy orthologous gene families with optimal attributes (listed further down) and concatenates them to estimate a genomic species tree. In the second scenario, it uses the PGM to estimate phylogenies under the maximum likelihood (ML) or parsimony optimality criteria. In addition, we implemented unsupervised learning methods that automatically identify species-like genome clusters based on the statistical analysis of the PGM and core-genome average nucleotide identity matrices (cgANiB).

To demonstrate these capabilities and benchmark performance, we applied the pipeline to critically evaluate the molecular systematics and taxonomy of the genus *Stenotrophomonas*. Species delimitation is problematic and far from resolved in this genus (Ochoa-Sánchez and Vinuesa, 2017), despite recent efforts using genomic approaches with a limited number of genome sequences (Patil et al., 2016; Yu et al., 2016; Lira et al., 2017).

The genus *Stenotrophomonas* (Gammaproteobacteria, *Xanthomonadales*, *Xanthomonadaceae*) (Palleroni and Bradbury, 1993; Palleroni, 2005) groups ubiquitous, aerobic, non-fermenting bacteria that thrive in diverse aquatic and edaphic habitats, including human-impacted ecosystems (Ryan et al., 2009). As of March 2018, 14 validly described species were listed in Jean Euzéby's list of prokaryotic names with standing in nomenclature (<http://www.bacterio.net/stenotrophomonas.html>). By far, its best-known species is *S. maltophilia*. It is considered a globally emerging, multidrug-resistant (MDR) and opportunistic pathogen (Brooke, 2012; Chang et al., 2015). *S. maltophilia*-like organisms display high genetic, ecological and phenotypic diversity (Valdezate et al., 2004; Vasileuskaya-Schulz et al., 2011), forming the so-called *S. maltophilia* complex (Smc) (Svensson-Stadler et al., 2012; Berg

and Martinez, 2015). Heterogeneous resistance and virulence phenotypes have been reported for environmental isolates of diverse ecological origin classified as *S. maltophilia* (Adamek et al., 2011; Deredjian et al., 2016). We have recently shown that this phenotypic heterogeneity largely results from problems in species delimitations within the Smc (Ochoa-Sánchez and Vinuesa, 2017). We analyzed the genetic diversity of a collection of 108 *Stenotrophomonas* isolates recovered from several water bodies in Morelos, Central Mexico, based on sequence data generated for the 7 loci used in the Multilocus Sequence Typing (MLST) scheme available for *S. maltophilia* at <https://pubmlst.org>. We assembled a large set of reference sequences retrieved from the MLST database (Kaiser et al., 2009; Vasileuskaya-Schulz et al., 2011) and from selected genome sequences (Crossman et al., 2008; Lira et al., 2012; Davenport et al., 2014; Vinuesa and Ochoa-Sánchez, 2015; Patil et al., 2016), encompassing 11 out of the 12 validly described species at the time. State-of-the-art phylogenetic and population genetics methods, including the multispecies coalescent model coupled with Bayes factor analysis and Bayesian clustering of the multilocus genotypes consistently resolved five conservatively-defined genospecies within the Smc clade, which were named *S. maltophilia* and Smc1-Smc4. The approach also delimited Smc5 as a sister clade of *S. rhizophila*. Importantly, we showed that (i) only members of the Smc clade that we designed as *S. maltophilia* were truly MDR and (ii) that *S. maltophilia* was the only species that consistently expressed metallo-beta-lactamases (Ochoa-Sánchez and Vinuesa, 2017). Strains of the genospecies Smc1 and Smc2 were only recovered from the Mexican rivers and displayed significantly lower resistance levels than sympatric *S. maltophilia* isolates, revealing well-defined species-specific phenotypes.

Given this context, the present study was designed with two major goals. The first one was to develop GET_PHYLOMARKERS, a pipeline for the automatic and robust estimation of genome phylogenies using state-of-the-art methods. The emphasis of the pipeline is on selecting top-ranking markers for the task, based on the following quantitative/statistical criteria: (i) they should not present signs of recombination, (ii) the resulting gene trees should not be anomalous or deviating from the distribution of tree topologies and branch lengths expected under the multispecies coalescent model, and (iii) they should have a strong phylogenetic signal. The top-scoring markers are concatenated to estimate the species phylogeny under the ML optimality criterion using either FastTree (Price et al., 2010) or IQ-TREE (IQT) (Nguyen et al., 2015). The second aim was to apply GET_PHYLOMARKERS to challenge and refine the species delimitations reported in our previous MLSA study (Ochoa-Sánchez and Vinuesa, 2017) using a genomic approach, focusing on resolving the geno-taxonomic structure of the Smc and *S. maltophilia sensu lato* clades. For this purpose we sequenced five strains from the new genospecies Smc1 and Smc2 and analyzed them together with all reference genome sequences available for the genus *Stenotrophomonas* as of August 2017 using the methods implemented in GET_PHYLOMARKERS. The results were used to critically revise the molecular systematics of the genus in light of genomics, identify misclassified genome sequences, suggest

correct classifications for them and discover multiple novel genospecies within *S. maltophilia*.

MATERIALS AND METHODS

Genome Sequencing, Assembly, and Annotation

Ten *Stenotrophomonas* strains from our collection were selected (Table 1) for genome sequencing using a MiSeq instrument (2 × 300 bp) at the Genomics Core Sequencing Service provided by Arizona State University (DNASU). They were all isolated from rivers in the state of Morelos, Central Mexico, and classified as genospecies 1 (Smc1) or 2 (Smc2), as detailed in a previous publication (Ochoa-Sánchez and Vinuesa, 2017). Adaptors at the 5'-ends and low quality residues at the 3' ends of reads were trimmed-off using ngsShoRT v2.1 (Chen et al., 2014) and passed to Spades v3.10.1 (Bankevich et al., 2012) for assembly (with options `-careful -k 33,55,77,99,127,151`). The resulting assembly scaffolds were filtered to remove those with low coverage (<7X) and short length (< 500 nt). All complete genome sequences available in RefSeq for *Stenotrophomonas* spp. were used as references for automated ordering of assembly scaffolds using MeDuSa v1.6 (Bosi et al., 2015). A final assembly polishing step was performed by remapping the quality-filtered sequence reads on the ordered scaffolds using BWA (Li and Durbin, 2009) and passing the resulting sorted binary alignments to SAMtools (Li et al., 2009) for indexing. The indexed alignments were used by Pilon 1.21 (Walker et al., 2014) for gap closure and filling, correction of indels and single nucleotide polymorphisms (SNPs), as previously described (Vinuesa and Ochoa-Sánchez, 2015). The polished assemblies were annotated with NCBI's Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP v4.2) (Angioli et al., 2008). BioProject and BioSample accession numbers are provided in Table S1.

Reference Genomes

On August 1st, 2017, a total of 169 annotated *Stenotrophomonas* genome sequences were available in RefSeq, 134 of which were labeled as *S. maltophilia*. The corresponding GenBank files were retrieved, as well as the corresponding table with assembly metadata. Seven complete *Xanthomonas* spp. genomes were also downloaded to use them as outgroup sequences. In January 2018, the genome sequence of *S. bentonitica* strain VV6 was added to RefSeq and included in the revised version of this work to increase the taxon sampling.

Computing Consensus Core- and Pan-Genomes With GET_HOMOLOGUES

We used GET_HOMOLOGUES (v05022018) (Contreras-Moreira and Vinuesa, 2013) to compute clusters of homologous gene families from the input genome sequences, as previously detailed (Vinuesa and Contreras-Moreira, 2015). Briefly, the source GenBank-formatted files were passed to `get_homologues.pl` and instructed to compute homologous gene clusters by running either our heuristic (fast) implementation of the bidirectional best-hit (BDBH) algorithm ("-b") to explore the complete dataset, or the full BDBH, Clusters of Orthologous

TABLE 1 | Overview of key annotation features for the 10 new genome assemblies reported in this study for environmental isolates recovered from Mexican rivers and classified as genospecies 1 (Smc1) and 2 (Smc2) in the study of Ochoa-Sánchez and Vinuesa (2017).

Genome	Size_nt	CDSs (coding)	rRNAs	tRNAs	Pseudo-genes	RefSeq Acc. num.
<i>Stenotrophomonas</i> genospecies 1 (Smc1; Sgn1) ESTM1D MKCIP4 1	4,475,880	3,904	6	59	67	CP026004
<i>Stenotrophomonas</i> genospecies 1 (Smc1; Sgn1) SAU14A NAIM4 5	4,570,883	4,020	6	69	66	CP026003
<i>Stenotrophomonas</i> genospecies 1 (Smc1; Sgn1) ZAC14A NAIM4 1	4,698,328	4,150	7	45	66	CP026002
<i>Stenotrophomonas</i> genospecies 1 (Smc1; Sgn1) ZAC14D1 NAIM4 1	4,702,461	4,131	6	42	66	CP026001
<i>Stenotrophomonas</i> genospecies 1 (Smc1; Sgn1) ZAC14D1 NAIM4 6	4,700,343	4,128	6	45	63	CP026000
<i>Stenotrophomonas</i> genospecies 2 (Smc2; Sgn2) SAU14A NAIM4 8	4,479,100	3,893	5	54	69	CP025999
<i>Stenotrophomonas</i> genospecies 2 (Smc2; Sgn2) YAU14A MKIM4 1	4,487,007	3,918	7	43	67	CP025998
<i>Stenotrophomonas</i> genospecies 2 (Smc2; Sgn2) YAU14D1 LEIM4 1	4,319,112	3,819	6	51	66	CP025997
<i>Stenotrophomonas</i> genospecies 2 (Smc2; Sgn2) ZAC14D2 NAIM4 6	4,431,104	3,882	6	52	66	CP025996
<i>Stenotrophomonas</i> genospecies 2 (Smc2; Sgn2) ZAC14D2 NAIM4 7	4,468,731	3,918	6	66	62	CP025995

Details of their isolation sites and antimicrobial resistance phenotypes can be found therein. All genomes consist of a single gapped chromosome. Table S1 provides additional information of the assemblies. Their phylogenetic placement within the *Stenotrophomonas maltophilia* complex is shown in **Figure 5** (clades Sgn1/Smc1 and Sgn2/Smc2).

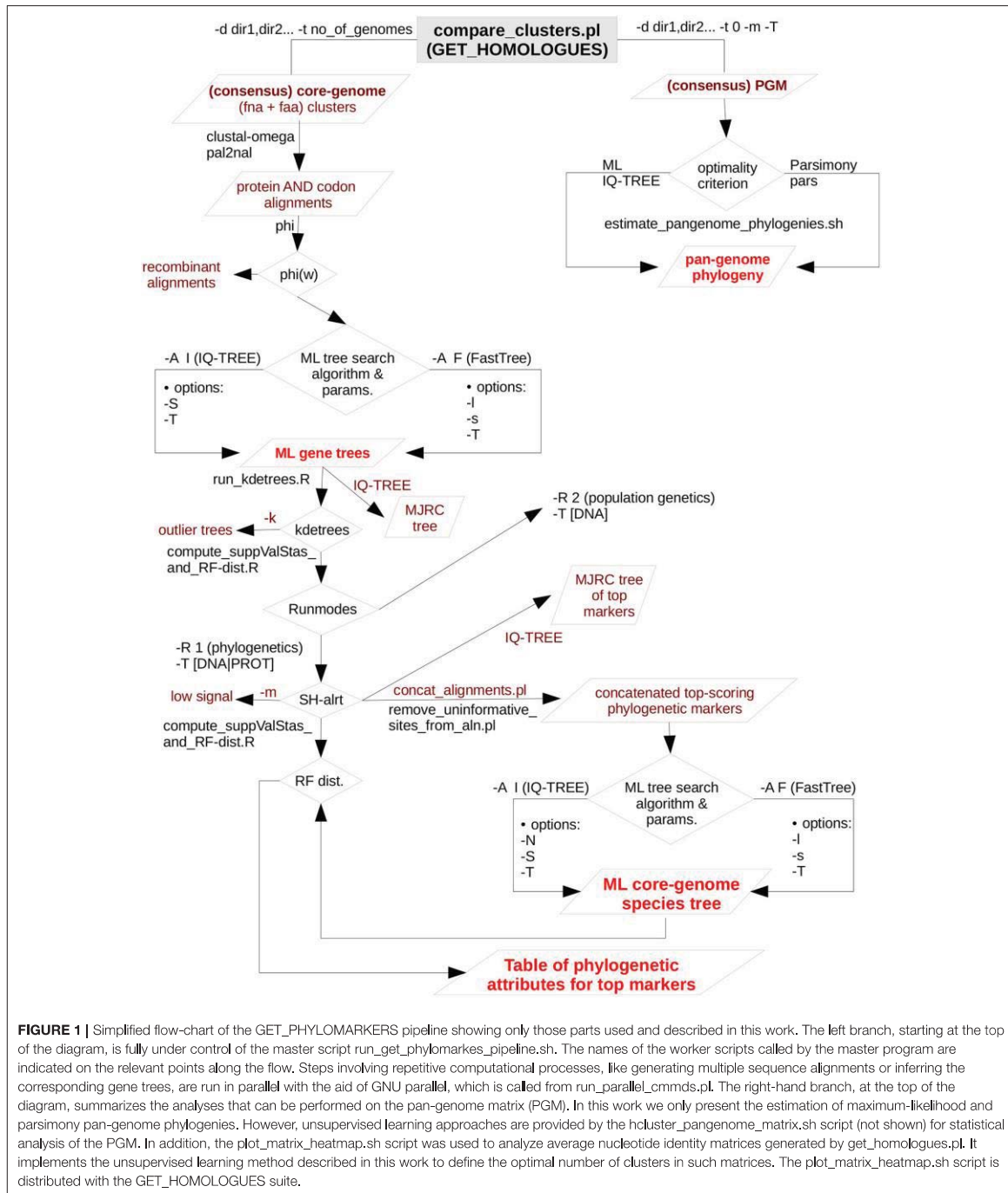
Groups—triangles (COGtriangles), and OrthoMCL (Markov Clustering of orthologs, OMCL) algorithms for the different sets of selected genomes, as detailed in the relevant sections and explained in the GET_HOMOLOGUES's online manual (ead-csic-compbio.github.io/get_homologues/manual/manual.html). PFAM-domain scanning was enabled for the latter runs (-D flag). BLASTP hits were filtered by imposing a minimum of 90% alignment coverage (-C 90). The directories holding the results from the different runs were then passed to the auxiliary script `compare_clusters.pl` to compute either the consensus core genome (-t number_of_genomes) or pan-genome clusters (-t 0). The commands to achieve this can be found in the online tutorial https://vinuesa.github.io/get_phylomarkers/#get_homologues-get_phylomarkers-tutorials provided with the distribution.

Overview of the Computational Steps Performed by the GET_PHYLOMARKERS Pipeline

Figure 1 presents a flow-chart that summarizes the computational steps performed by the pipeline, which are briefly described below. For an in-depth description of each step and associated parameters, as well as for a full version of the pipeline's flow-chart, the reader is referred to the online manual (https://vinuesa.github.io/get_phylomarkers/). The pipeline is primarily intended to run DNA-based phylogenies ("-R 1 -t DNA") on a collection of genomes from different species of the same genus or family. However, it can also select optimal markers for population genetics ("-R 2 -t DNA"), when the source genomes belong to the same species (not shown here). For more divergent genomes, the pipeline should be run using protein sequences ("-R 1 -t PROT"). The analyses are started from the directory holding single-copy core-genome clusters generated either by "`get_homologues.pl -e -t number_of_genomes`" or by "`compare_clusters.pl -t number_of_genomes`." Note that both the protein (faa) and nucleotide (fna) FASTA files for the clusters are required, as detailed in the online tutorial (https://vinuesa.github.io/get_phylomarkers/#get_homologues-get_

phylomarkers-tutorials). The former are first aligned with clustal-omega (Sievers et al., 2012) and then used by pal2nal (Suyama et al., 2006) to generate codon alignments. These are subsequently scanned with the Phi-test (Bruen et al., 2005) to identify and discard those with significant evidence for recombinant sequences. Maximum-likelihood phylogenies are inferred for each of the non-recombinant alignments using by default IQT v.1.6.3 (Nguyen et al., 2015), which will perform model selection with ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al., 2017) and the "-fast" flag enabled for rapid computation, as detailed in the online manual. Alternatively, FastTree v2.1.10 (Price et al., 2010) can be executed using the "-A F" option, which will estimate phylogenies under the GTR+Gamma model. FastTree was compiled with double-precision enabled for maximum accuracy (see the manual for details). The resulting gene trees are screened to detect "outliers" with help of the R package `kdtrees` (v.0.1.5) (Weyenberg et al., 2014, 2017). It implements a non-parametric test based on the distribution of tree topologies and branch lengths expected under the multispecies coalescent, identifying those phylogenies with unusual topologies or branch lengths. The stringency of the test can be controlled with the `-k` parameter (inter-quartile range multiplier for outlier detection, by default set to the standard 1.5). In a third step, the phylogenetic signal of each gene-tree is computed based on mean branch support values (Vinuesa et al., 2008), keeping only those above a user-defined mean Shimodaira-Hasegawa-like (SH-ahlr) bipartition support (Anisimova and Gascuel, 2006) threshold ("-m 0.75" by default). To make all the previous steps as fast as possible, they are run in parallel on multi-core machines using GNU parallel (Tange, 2011). The set of alignments passing all filters are concatenated and subjected to maximum-likelihood (ML) tree searching, using by default IQT with model fitting, to estimate the genomic species-tree.

The complete GET_PHYLOMARKERS pipeline is launched with the master script `run_get_phylomarkers_pipeline.sh`, which calls a subset of auxiliary Bash, Perl and R programs to perform specific tasks. This architecture allows the user to run the



individual steps separately, which adds convenient flexibility for advanced users (examples provided in the Supplementary Materials). The pipeline is highly customizable, and the reader is

referred to the latest version of the online manual for the details of each option. However, the default values should produce satisfactory results for most purposes, as these were carefully

selected based on the benchmark analysis presented in this work. All the source code is freely available under the GNU GENERAL PUBLIC LICENSE V3 from https://github.com/vinuesa/get_phylomarkers. Detailed installation instructions are provided (https://github.com/vinuesa/get_phylomarkers/blob/master/INSTALL.md), along with a hands-on tutorial (https://vinuesa.github.io/get_phylomarkers/). The software has been extensively tested on diverse Linux distributions (CentOS, Ubuntu and RedHat). In addition, a docker image bundling GET_HOMOLOGUES and GET_PHYLOMARKERS is available at https://hub.docker.com/r/csicunam/get_homologues/. We recommend running the docker image to avoid potential trouble with the installation and configuration of diverse dependencies (second party binaries, as well as Perl and R packages), making it easy to install on any architecture, including Windows, and to reproduce analyses with exactly the same software.

Estimating Maximum Likelihood and Parsimony Pan-Genome Trees From the Pan-Genome Matrix (PGM)

The GET_PHYLOMARKERS package contains auxiliary scripts to perform diverse clustering and phylogenetic analyses based on the pangenome_matrix_t0.* files returned by the compare_clusters.pl script (options “-t 0 -m”) from the GET_HOMOLOGUES suite. In this work, consensus PGMs (Vinuesa and Contreras-Moreira, 2015) were computed as explained in the online tutorial (https://vinuesa.github.io/get_phylomarkers/#get_homologues-get_phylomarkers-tutorials). These represent the intersection of the clusters generated by the COGtriangles and OMCL algorithms. Adding the -T flag to the previous command instructs compare_clusters.pl to compute a Wagner (multistate) parsimony tree from the PGM, launching a tree search with 50 taxon jumbles using pars from the PHYLIP (Felsenstein, 2004b) package (v.3.69). A more thorough and customized ML or parsimony analysis of the PGM can be performed with the aid of the auxiliary script estimate_pangenome_phylogenies.sh, bundled with GET_PHYLOMARKERS. By default this script performs a ML tree-search using IQT v1.6.3 (Nguyen et al., 2015). It will first call ModelFinder (Kalyanamoorthy et al., 2017) using the JC2 and GTR2 base models for binary data, the latter accounting for unequal state frequencies. The best fitting base model + ascertain bias correction + among-site rate variation parameters are selected using the Akaike Information Criterion (AIC). IQT (Nguyen et al., 2015) is then called to perform a ML tree search under the selected model with branch support estimation. These are estimated using approximate Bayesian posterior probabilities (aBypp), a popular single branch test (Guindon et al., 2010), as well as the recently developed ultrafast-bootstrap2 (UFBoot2) test (Hoang et al., 2017). In addition, the user may choose to run a parsimony analysis with bootstrapping on the PGM, as detailed in the online manual and illustrated in the tutorial. Note however, that the parsimony search with bootstrapping is much slower than the default ML search.

Unsupervised Learning Methods for the Analysis of Pairwise Average Nucleotide (ANI) and Aminoacid (AAI) Identity Matrices

The GET_HOMOLOGUES distribution contains the plot_matrix_heatmap.sh script which generates ordered heatmaps with attached row and column dendrograms from squared tab-separated numeric matrices. These can be presence/absence PGM matrices or similarity/identity matrices, as those produced with the get_homologues -A option. Optionally, the input cgANiB matrix can be converted to a distance matrix to compute a neighbor joining tree, which makes the visualization of relationships in large ANI matrices easier. Recently added functionality includes reducing excessive redundancy in the tab-delimited ANI matrix file (-c max_identity_cut-off_value) and sub-setting the matrix with regular expressions, to focus the analysis on particular genomes extracted from the full cgANiB matrix. From version 1.0 onwards, the mean silhouette-width (Rousseeuw, 1987) goodness of clustering statistics is included to determine the optimal number of clusters automatically. The script currently depends on the R packages ape (Popescu et al., 2012), dendextend (<https://cran.r-project.org/package=dendextend>), factoextra (<https://cran.r-project.org/package=factoextra>) and gplots (<https://CRAN.R-project.org/package=gplots>).

RESULTS

Ten New Complete Genome Assemblies for the Mexican Environmental *Stenotrophomonas maltophilia* Complex Isolates Previously Classified as Genospecies 1 (Smc1) and 2 (Smc2)

In this study we report the sequencing and assembly of five isolates each from the genospecies 1 (Smc1) and 2 (Smc2) recovered from rivers in Central Mexico, previously reported in our extensive MLSA study of the genus *Stenotrophomonas* (Ochoa-Sánchez and Vinuesa, 2017). All assemblies resulted in a single chromosome with gaps. No plasmids were detected. A summary of the annotated features for each genome are presented in Table 1. Assembly details are provided in Table S1.

Rapid Phylogenetic Exploration of *Stenotrophomonas* Genome Sequences Available at NCBI's RefSeq Repository Running GET_PHYLOMARKERS in Fast Runmode

A total of 170 *Stenotrophomonas* and 7 *Xanthomonas* reference genomes were retrieved from RefSeq (see methods). Figure 2A depicts parallel density plots showing the distribution of the number of fragments for the *Stenotrophomonas* assemblies at the Complete ($n = 16$), Chromosome ($n = 3$), Scaffold ($n = 63$), and Contig ($n = 88$) finishing levels. The distributions have conspicuous long tails, with an overall mean and median number of fragments of ~238 and ~163, respectively. The table insets in Figure 2A provide additional descriptive statistics of the

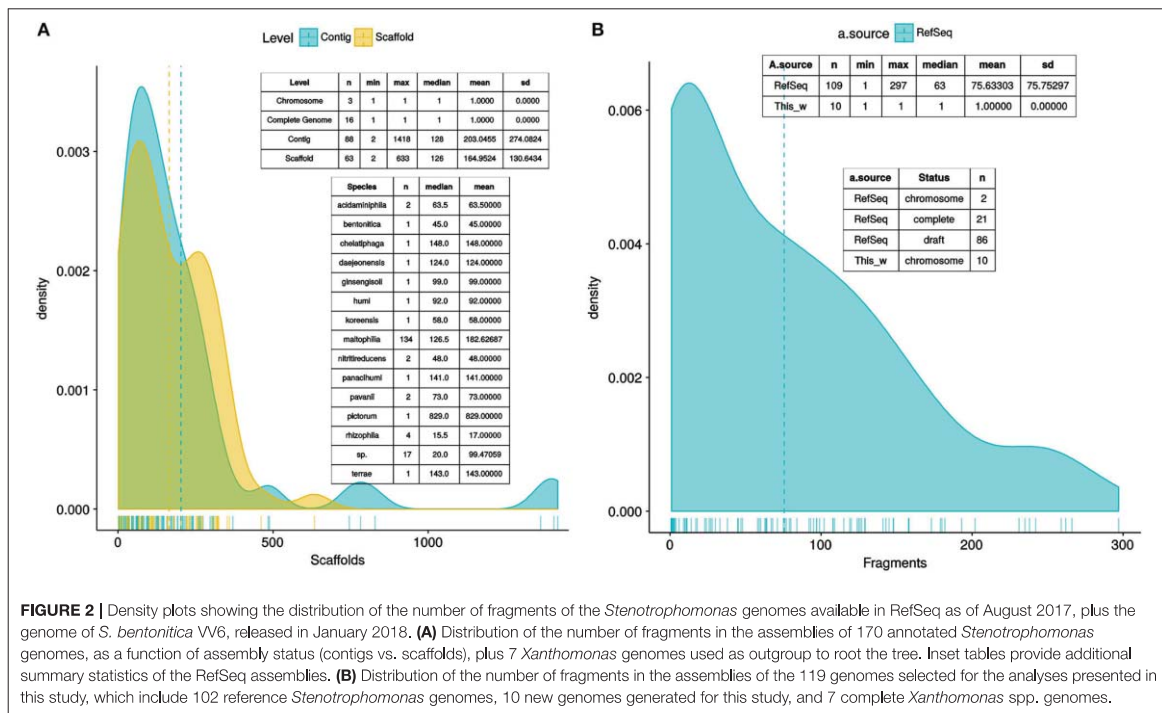


FIGURE 2 | Density plots showing the distribution of the number of fragments of the *Stenotrophomonas* genomes available in RefSeq as of August 2017, plus the genome of *S. bentonitica* VV6, released in January 2018. **(A)** Distribution of the number of fragments in the assemblies of 170 annotated *Stenotrophomonas* genomes, as a function of assembly status (contigs vs. scaffolds), plus 7 *Xanthomonas* genomes used as outgroup to root the tree. Inset tables provide additional summary statistics of the RefSeq assemblies. **(B)** Distribution of the number of fragments in the assemblies of the 119 genomes selected for the analyses presented in this study, which include 102 reference *Stenotrophomonas* genomes, 10 new genomes generated for this study, and 7 complete *Xanthomonas* spp. genomes.

distributions. A first GET_HOMOLOGUES run was launched using this dataset ($n = 177$) with two objectives: (i) to test its performance with a relatively large set of genomes and (ii) to get an overview of their evolutionary relationships to select a non-redundant set of those with the best assemblies. For this analysis, GET_HOMOLOGUES was run in its “fast-BDBH” mode (-b), on 60 cores (-n 60; AMD Opteron™ Processor 6380, 2500.155 MHz), and imposing a stringent 90% coverage cut-off for BLASTP alignments (-C 90), excluding inparalogues (-e). This analysis took 1 h:32 m:13 s to complete and identified 132 core genes. These were fed into the GET_PHYLOMARKERS pipeline, which was executed using a default FastTree search with the following command line: “run_get_phylomarkers_pipeline.sh -R 1 -t DNA -A F” which took 8 m:1 s to complete on the same number of cores. Only 79 alignments passed the Phi recombination test. Thirteen of them failed to pass the downstream kdetree test. The phylogenetic signal test excluded nine additional loci with average SH- α rt values < 0.70. Only 57 alignments passed all filters and were concatenated into a supermatrix of 38,415 aligned residues, which were collapsed to 19,129 non-gapped and variable sites. A standard FastTree maximum-likelihood tree-search was launched, and the resulting phylogeny ($\ln L = -475237.540$) is shown in Figure S1. Based on this tree and the level of assembly completeness for each genome (Figure 2A), we decided to discard those with >300 contigs (Figure 2B). This resulted in the loss of 19 genomes labeled as *S. maltophilia*. However, we retained *S. pictorum* JCM 9942, a highly fragmented genome with 829 contigs (Patil et al., 2016) to maximize taxon sampling. Several *S. maltophilia* subclades

contained identical sequences (Figure S1) and were trimmed, retaining only the assembly with the lowest numbers of scaffolds or contigs.

Selection of a Stringently Defined Set of Orthologous Genes Using GET_HOMOLOGUES

After the quality and redundancy filtering described in the previous section, 109 reference genomes (102 *Stenotrophomonas* + 7 *Xanthomonas*) were retained for more detailed investigation. Table S2 provides an overview of them. To this set we added the 10 new genomes reported in this study (Table 1). Figure 2B depicts a density plot and two inset tables summarizing the distribution of number of contigs/scaffolds in the selected reference genomes and the new genomes for the Mexican environmental Smc isolates previously classified as genospecies 1 (Smc1) and 2 (Smc2) (Ochoa-Sánchez and Vinuesa, 2017). A high stringency consensus core-genome containing 239 gene families was computed as the intersection of the clusters generated by the BDBH, COG-triangles and OMCL algorithms (Figure 3A).

GET_PHYLOMARKERS in Action: Benchmarking the Performance of FastTree and IQ-Tree to Select Top-Scoring Markers for Phylogenomics

The set of 239 consensus core-genome clusters (Figure 3A) was used to launch multiple instances of the GET_PHYLOMARKERS pipeline to evaluate the phylogenetic

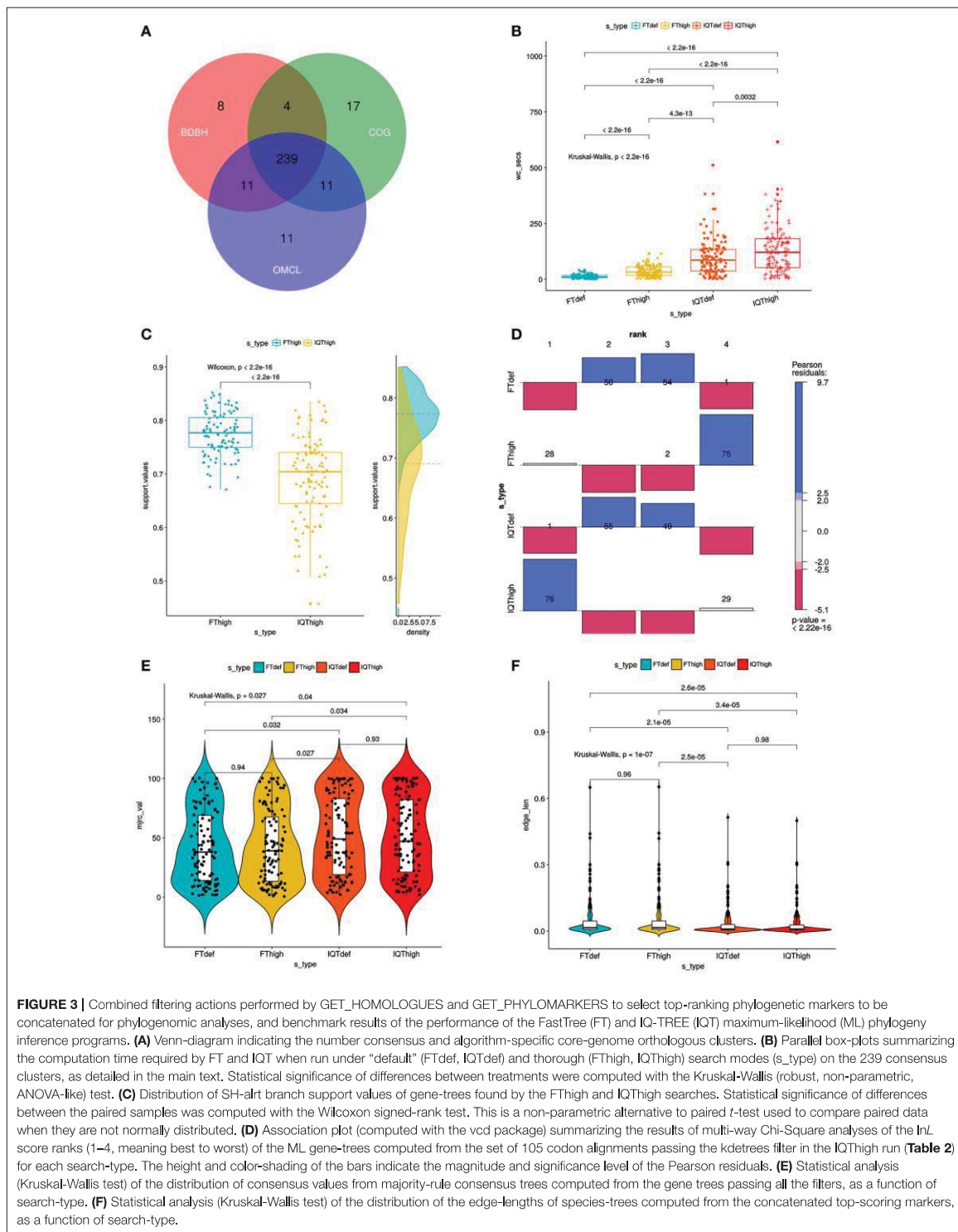


FIGURE 3 | Combined filtering actions performed by GET_HOMOLOGUES and GET_PHYLOMARKERS to select top-ranking phylogenetic markers to be concatenated for phylogenomic analyses, and benchmark results of the performance of the FastTree (FT) and IQ-TREE (IQT) maximum-likelihood (ML) phylogeny inference programs. **(A)** Venn-diagram indicating the number consensus and algorithm-specific core-genome orthologous clusters. **(B)** Parallel box-plots summarizing the computation time required by FT and IQT when run under “default” (FTdef, IQTdef) and thorough (FTHigh, IQTHigh) search modes (s_type) on the 239 consensus clusters, as detailed in the main text. Statistical significance of differences between treatments were computed with the Kruskal-Wallis (robust, non-parametric, ANOVA-like) test. **(C)** Distribution of SH-aIrt branch support values of gene-trees found by the FTHigh and IQTHigh searches. Statistical significance of differences between the paired samples was computed with the Wilcoxon signed-rank test. This is a non-parametric alternative to paired *t*-test used to compare paired data when they are not normally distributed. **(D)** Association plot (computed with the vcd package) summarizing the results of multi-way Chi-Square analyses of the InL score ranks (1–4, meaning best to worst) of the ML gene-trees computed from the set of 105 codon alignments passing the kdtrees filter in the IQTHigh run (Table 2) for each search-type. The height and color-shading of the bars indicate the magnitude and significance level of the Pearson residuals. **(E)** Statistical analysis (Kruskal-Wallis test) of the distribution of consensus values from majority-rule consensus trees computed from the gene trees passing all the filters, as a function of search-type. **(F)** Statistical analysis (Kruskal-Wallis test) of the distribution of the edge-lengths of species-trees computed from the concatenated top-scoring markers, as a function of search-type.

TABLE 2 | Comparative benchmark analysis of the filtering performance of the GET_PHYLOMARKERS pipeline when run using the FastTree (FT) and IQ-TREE (IQT) maximum-likelihood algorithms, under default and high search-intensity levels.

Test	FTdef	FThigh	IQTdef	IQTHigh
Alignments passing the Phi recombination test	127/239 (53.14%)	125/239 (52.30%)	125/239 (52.30%)	127/239 (53.14%)
Outlier phylogenies (kdetrees test; $k = 1.0$) out of the indicated number of non-recombinant alignments	22/127 (17.32%) passing: 105	18 (14.17%) passing: 107	19 (14.96%) passing: 106	22 (17.32%) passing: 105
Alignments passing the phylogenetic signal (mean SH- <i>alrt</i> bipartition support; $m \geq 0.7$) test	98/105 (93.33%)	99/107 (92.52%)	52/106 (49.05%)	55/105 (52.38%)
Concatenated top-scoring markers, lnL score, substitution model and number of independent searches	98 markers var. sites = 36,082 lnL = -917444.522 GTR+G Searches = 1	99 markers var. sites = 35,509 lnL = -899898.614 GTR+G Searches = 1	52 markers var. sites = 25,383 lnL = -666437.563 GTR+F+ASC+R6 Searches = 1	55 markers var. sites = 26,988 lnL = -707933.476 GTR+F+ASC+R6 Searches = 5
Total wall-clock time of runs on 50 cores	0 h:13 m:39 s	0 h:38 m:30 s	1 h:22 m:18 s	2 h:40 m:13 s

The analyses were started with the stringently defined set of 239 consensus core-genome clusters computed by GET_HOMOLOGUES for a dataset of 119 genomes (112 *Stenotrophomonas* spp. and 7 *Xanthomonas* spp.).

performance of FastTree (FT; v2.1.10) and IQ-TREE (IQT; v1.6.3), two popular fast maximum-likelihood (ML) tree searching algorithms. Our benchmark was designed to compare: (i) the execution times of the FT vs. IQT runs under default (FTdef, IQTdef) and thorough (FThigh, IQTHigh) search modes (see methods and online manual for their parameterization details); (ii) the phylogenetic resolution (average support values) of gene trees estimated by FT and IQT under both search modes; (iii) the rank of lnL scores of the gene trees found in those searches for each locus; (iv) the distribution of consensus values of each node in majority rule consensus trees computed from the gene trees found by each search type; (v) the distribution of edge-lengths in the species-trees computed by each search type. The results of these analyses are summarized in Table 2 and in Figure 3. The first steps of the pipeline (Figure 1) comprise the generation of codon alignments and their analysis to identify potential recombination events. Only 127 alignments (53.14%) passed the Phi-test (Table 2). Phylogenetic analyses start downstream of the recombination test (Figure 1). The computation times required by the two algorithms and search intensity levels were significantly different (Kruskal-Wallis, $p < 2.2e-16$), FastTree being always the fastest, and displaying the lowest dispersion of compute times across trees (Figure 3B). This is not surprising, as IQT searches involved selecting the best substitution model among a range of base models (see methods and online manual) and fitting additional parameters (+G+ASC+I+F+R) to account for heterogeneous base frequencies and rate-variation across sites. In contrast, FT searches just estimated the parameter values for the general time-reversible (GTR) model, and among-site rate variation was modeled fitting a gamma distribution with 20 rate categories (+G), as summarized in Table 2. Similar numbers of “outlier” trees (range 18:22) were detected by the kdetrees-test in the four search types (Table 2). However, the distributions of SH-*alrt* support values are strikingly different for both search algorithms (Wilcoxon, $p < 2.2e-16$), revealing that gene-trees found by IQT have a much lower average support than those found by FT (Figure 3C). Consequently, the former searches

were significantly more efficient to identify gene trees with low average branch support values (Table 2 and Figure 3C). This result is in line with the well-established fact that poorly fitting and under-parameterized models produce less reliable tree branch lengths and overestimate branch support (Posada and Buckley, 2004), implying that the FT phylogenies may suffer from clade over-credibility. These results demonstrate that: (i) FT-based searches are significantly faster than those performed with IQT, and (ii) that IQT has a significantly higher discrimination power for phylogenetic signal than FT. Due to the fact that the number of top-scoring alignments selected by the two algorithms for concatenation is notably different (Table 2), the lnL scores of the resulting species-trees are not comparable (Table 2). Therefore, in order to further evaluate the quality of the gene-trees found by the four search strategies, we performed an additional benchmark under highly standardized conditions, based on the 105 optimal alignments that passed the kdetrees-test in the IQTHigh search (Table 2). Gene trees were estimated for each of these alignments using the four search strategies (FTdef, IQTdef, FThigh, and IQTHigh) and their lnL scores ranked for each gene tree. An association analysis (deviation from independence in a multi-way chi-squared test) was performed on the lnL ranks (1–4, coding for highest to lowest lnL scores, respectively) attained by each search type for each gene tree. As shown in Figure 3D, the IQTHigh search was the winner, attaining the first rank (highest lnL score) in 76/105 of the searches (72.38%), way ahead of the number of FThigh (26%), and IQTdef (0.009%) searches that ranked in the first position (highest lnL score for a particular alignment). A similar analysis performed on the full set of input alignments ($n = 239$) indicated that when operating on an unfiltered set, the difference in performance was even more striking, with IQT-based searches occupying > 97% of the first rank positions (data not shown). These results highlight two points: (i) the importance of proper model selection and thorough tree searching in phylogenetic inference and (ii) that IQT generally finds better trees than FT. Finally, we evaluated additional phylogenetic attributes of the species-trees computed by each search type, either as the

majority rule consensus (mjrc) tree of top-scoring gene-trees, or as the tree estimated from the supermatrices of concatenated alignments. **Figure 3E** shows the distribution of mjrc values of the mjrc trees computed by each search type, which can be interpreted as a proxy for the level phylogenetic congruence among the source trees. These values were significantly higher for the IQT than in the FT searches (Kruskal-Wallis, $p = 0.027$), with a higher number of 100% mjrc clusters found in the former than in the latter type of trees (**Figure 3E**). An analysis of the distribution of edge-lengths of the species-trees inferred from the concatenated alignments revealed that those found in IQT searches had significantly (Kruskal-Wallis, $p = 1e-07$) shorter edges (branches) than those estimated by FT (**Figure 3F**). This highlights again the importance of adequate substitution models for proper edge-length estimation. Tree-lengths (sum of edge lengths) of the species-trees found in IQT-based searches are about 0.63 times shorter than those found by FT (Figure S2). As a final exercise, we computed the Robinson-Foulds (RF) distances of each gene tree found in a given search type to the species tree inferred from the corresponding supermatrix. The most striking result of this analysis was that no single gene-tree had the same topology as the species tree inferred from the concatenated top-scoring alignments (Figure S3).

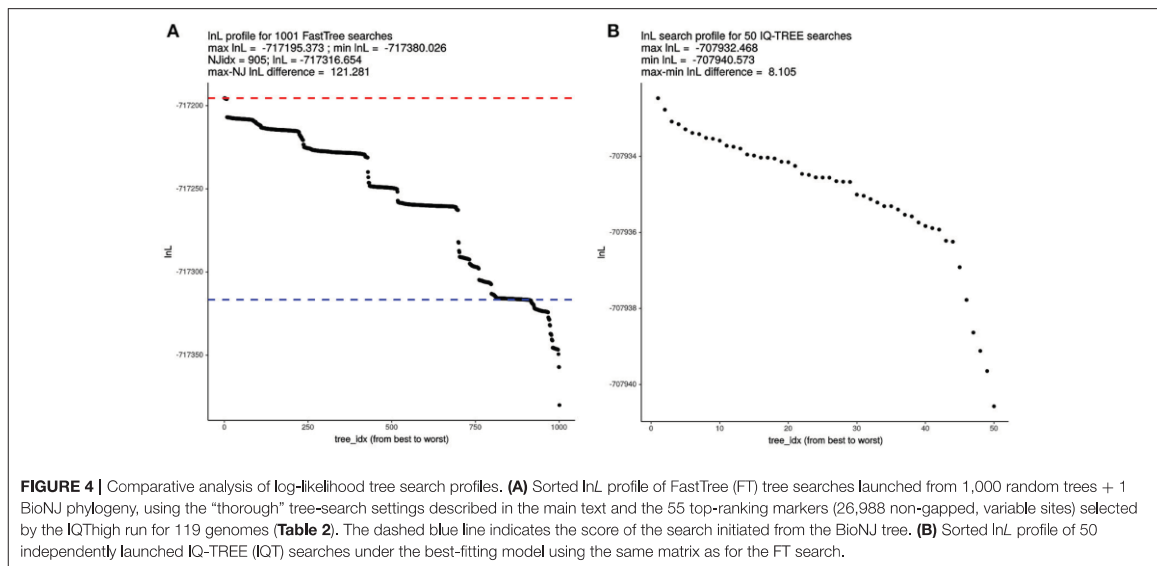
Effect of Tree-Search Intensity on the Quality of the Species Trees Found by IQT-REE and FastTree

Given the astronomical number of different topologies that exist for 119 terminals, we decided to evaluate the effect of tree-search thoroughness on the quality of the trees found by FT and IQT, measured as their log-likelihood (lnL) score. To make the results comparable across search algorithms, we used the supermatrix of 55 top-scoring markers (25,896 variable, non-gapped sites) selected by the IQThigh run (**Table 2**). One

thousand FT searches were launched from the same number of random topologies computed with the aid of a custom Perl script. In addition, a standard FT search was started from the default BioNJ tree. All these searches were run in “thorough” mode (-quiet -nt -gtr -bionj -slow -slownni -gamma -mlacc 3 -spr 16 -sprlength 10) on 50 cores. The resulting lnL profile for this search is presented in **Figure 4A**, which reached a maximal score of -717195.373 . This is 121.281 lnL units better than the score of the best tree found in the search started from the BioNJ seed tree (lnL -717316.654 , lower discontinuous blue line). In addition, 50 independent tree searches were run with IQT under the best fitting model previously found (**Table 2**), using the shell loop command (# 5) provided in the Supplementary Material. The corresponding lnL profile of this search is shown in **Figure 4B**, which found a maximum-scoring tree with a score of -707932.468 . This is only 8.105 lnL units better than the worst tree found in that same search (**Figure 4B**). Importantly, the best tree found in the IQT-search is 9262.905 lnL units better than that of the best tree found in the FT search, despite the much higher number of seed trees used for the latter. This result clearly demonstrates the superiority of the IQT algorithm for ML tree searching. Based on this evidence, and that presented in the previous section (**Table 2; Figure 3**), IQT was chosen as the default tree-search algorithm used by GET_PHYLOMARKERS. The Robinson-Foulds distance between both trees was 46.

A Robust Genomic Species Phylogeny for the Genus *Stenotrophomonas*: Taxonomic Implications and Identification of Multiple Misclassified Genomes

Figure 5 displays the best ML phylogeny found in the IQT search (**Figure 4B**) described in the previous section. This is a highly resolved phylogeny. All bipartitions have an approximate



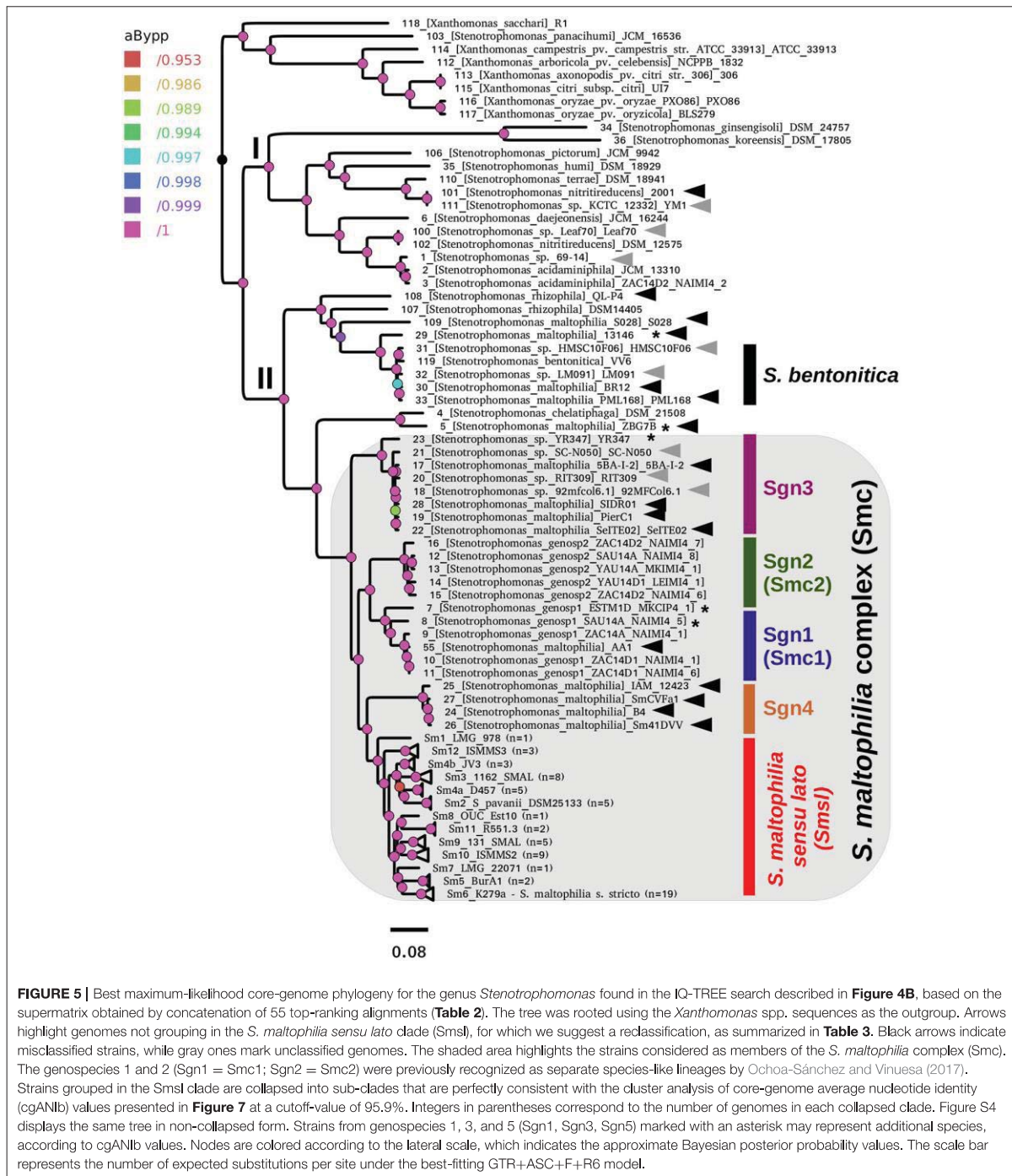


FIGURE 5 | Best maximum-likelihood core-genome phylogeny for the genus *Stenotrophomonas* found in the IQ-TREE search described in Figure 4B, based on the supermatrix obtained by concatenation of 55 top-ranking alignments (Table 2). The tree was rooted using the *Xanthomonas* spp. sequences as the outgroup. Arrows highlight genomes not grouping in the *S. maltophilia sensu lato* clade (SmSl), for which we suggest a reclassification, as summarized in Table 3. Black arrows indicate misclassified strains, while gray ones mark unclassified genomes. The shaded area highlights the strains considered as members of the *S. maltophilia* complex (Smc). The genospecies 1 and 2 (Sgn1 = Smc1; Sgn2 = Smc2) were previously recognized as separate species-like lineages by Ochoa-Sánchez and Vinuesa (2017). Strains grouped in the SmSl clade are collapsed into sub-clades that are perfectly consistent with the cluster analysis of core-genome average nucleotide identity (cgANIb) values presented in Figure 7 at a cutoff-value of 95.9%. Integers in parentheses correspond to the number of genomes in each collapsed clade. Figure S4 displays the same tree in non-collapsed form. Strains from genospecies 1, 3, and 5 (Sgn1, Sgn3, Sgn5) marked with an asterisk may represent additional species, according to cgANIb values. Nodes are colored according to the lateral scale, which indicates the approximate Bayesian posterior probability values. The scale bar represents the number of expected substitutions per site under the best-fitting GTR+ASC+F+R6 model.

Bayesian posterior probability (aBypp) $p \geq 0.95$. It was rooted at the branch subtending the *Xanthomonas* spp. clade, used as an outgroup. A first taxonomic inconsistency revealed by this

phylogeny is the placement of *S. panacihumi* within the latter clade, making the genus *Stenotrophomonas* paraphyletic. It is worth noting that *S. panacihumi* is a non-validly described,

and poorly characterized species (Yi et al., 2010). The genus *Stenotrophomonas*, as currently defined, and excluding *S. panacihumi*, consists of two major clades, labeled as I and II in **Figure 5**, as previously defined (Ochoa-Sánchez and Vinuesa, 2017).

Clade I groups environmental isolates, recovered from different ecosystems, mostly soils and plant surfaces, classified as *S. ginsengisoli* (Kim et al., 2010), *S. koreensis* (Yang et al., 2006), *S. daejeonensis* (Lee et al., 2011), *S. nitritireducens* (Finkmann et al., 2000), *S. acidaminiphila* (Assih et al., 2002), *S. humi*, and *S. terrae* (Heylen et al., 2007). The recently described *S. pictorum* (Ouattara et al., 2017) is also included in clade I. These are all rather poorly studied species, for which only one or a few strains have been considered in the corresponding species description or to study particular aspects of their biology. None of these species have been reported as opportunistic pathogens, but some contain promising strains for plant growth-promotion and bio-remediation. Particularly notorious are the disproportionately long terminal branches (heterotachy) of *S. ginsengisoli* and *S. koreensis* (**Figure 5**). The potential impact of these long branches on the estimated phylogeny needs to be evaluated in future work.

Clade II contains the species *S. rhizophila* (Wolf et al., 2002), *S. chelatiphaga* (Kaparullina et al., 2009), the recently described *S. bentonitica* (Sánchez-Castro et al., 2017), along with multiple species and genospecies lumped in the *S. maltophilia* complex (Smc; shaded area in **Figure 5**) (Svensson-Stadler et al., 2012; Berg and Martinez, 2015). The Smc includes the validly described *S. maltophilia* (Palleroni and Bradbury, 1993) and *S. pavanii* (Ramos et al., 2011) (collapsed subclades Sm6 and Sm2, respectively, located within the clade labeled as *S. maltophilia sensu lato* in **Figure 5**), along with at least four undescribed genospecies (Sgn1-Sgn4) recently identified in our MLSA study of the genus (Ochoa-Sánchez and Vinuesa, 2017). In light of this phylogeny, we discovered 16 misclassified RefSeq genome sequences (out of 119; 13.44%), 14 of them labeled as *S. maltophilia*. These genomes are highlighted with black arrows in **Figure 5**. The phylogeny also supports the classification, either as a validly published species, or as new genospecies, of 8 (~6.72%) additional RefSeq genomes (gray arrows) lacking a species assignment in the RefSeq record, as summarized in **Table 3**. In addition, the phylogeny resolved 13 highly supported lineages (aBypp > 0.95) within the *S. maltophilia sensu lato* (Smsl) cluster, shown as collapsed clades. They have a cgANiB

TABLE 3 | RefSeq genome sequences reclassified in this study based on the genomic evidence presented herein (see **Figures 5–7**).

DEFINITION (RefSeq classification)	Species/Reclassification*	Status	Fragments	BioProject	BioSample	PMID
<i>Stenotrophomonas</i> sp. 69-14	<i>S. acidaminiphila</i>	Draft	27	PRJNA279279	SAMN05660631	NA
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ZBG7B	<i>S. chelatiphaga</i>	Draft	145	PRJNA272355	SAMN03280975	26659682
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> AA1	Genospecies 2 (Sgn2/Smc2)	Complete	1	PRJNA224116	SAMN06130959	28275097
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 5BA-I-2	Genospecies 3	Draft	4	PRJNA224116	SAMN02641498	24604648
<i>Stenotrophomonas</i> sp. 92mfcol6.1	Genospecies 3	Draft	11	PRJNA224116	SAMN04488690	NA
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> PierC1	Genospecies 3	Draft	59	PRJEB8824	SAMEA3309462	26276674
<i>Stenotrophomonas</i> sp. RIT309	Genospecies 3	Draft	45	PRJNA224116	SAMN02676627	24812212
<i>Stenotrophomonas</i> sp. SC-N050	Genospecies 3	Draft	24	PRJNA224116	SAMN05720615	NA
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> SeITE02	Genospecies 3	Draft	63	PRJNA224116	SAMEA3138997	24812214
<i>Stenotrophomonas</i> sp. YR347	Genospecies 3	Draft	11	PRJNA224116	SAMN05518671	NA
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> B4	Genospecies 4	Draft	180	PRJNA224116	SAMN03753636	NA
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> Sm41DVV	Genospecies 4	Draft	26	PRJNA323790	SAMN05188789	27540065
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> SmCVFa1	Genospecies 4	Draft	30	PRJNA323845	SAMN05190067	27540065
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> IAM 12423	Genospecies 4	Draft	9	PRJNA224116	SAMN04487782	NA
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> SIDR01	genospecies 4	Draft	2	PRJNA248909	SAMN06040735	NA
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 13146	<i>S. bentonitica</i> complex	Draft	60	PRJNA224116	SAMN07237143	NA
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> BR12S	<i>S. bentonitica</i>	Draft	80	PRJNA224116	SAMN03456145	26472823
<i>Stenotrophomonas</i> sp. HMSC10F07	<i>S. bentonitica</i>	Draft	63	PRJNA269850	SAMN03287020	NA
<i>Stenotrophomonas</i> sp. LM091	<i>S. bentonitica</i>	Complete	1	PRJNA344031	SAMN05818440	27979933
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> PML168	<i>S. bentonitica</i>	Draft	97	PRJNA224116	SAMEA2272452	22887661
<i>Stenotrophomonas</i> sp. Leaf70	<i>S. nitritireducens</i>	Draft	11	PRJNA224116	SAMN04151613	26633631
<i>Stenotrophomonas</i> sp. KCTC 12332	<i>S. terrae</i> complex	Complete	1	PRJNA310387	SAMN04451766	28689013
<i>Stenotrophomonas nitritireducens</i> 2001	<i>S. terrae</i> complex	Complete	1	PRJNA224116	SAMN05428703	NA
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> S028	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Draft	297	PRJNA224116	SAMN02469568	23144428
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> QL-P4	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Complete	1	PRJNA326321	SAMN05276013	NA

*The numbered genospecies correspond to novel unnamed species identified by Ochoa-Sánchez and Vinuesa (2017) and in this study. Strains assigned to the *S. bentonitica* and the *S. terrae* complexes. Most likely represent novel species related to these species, respectively.

>96% (Figure 5). These lineages may represent 13 additional species in the Smsl clade, as detailed in following sections. Figure S4 shows the non-collapsed version of the species-tree displayed in Figure 5.

No genome sequences, nor MLSA data are available for the recently described *S. tumulicola* (Handa et al., 2016).

Pan-Genome Phylogenies for the Genus *Stenotrophomonas* Recover the Same Species Clades as the Core-Genome Phylogeny

A limitation of core-genome phylogenies is that they are estimated from the small fraction of single-copy genes shared by all organisms under study. Genes encoding adaptive traits relevant for niche-differentiation and subsequent speciation events typically display a lineage-specific distribution. Hence, phylogenetic analysis of pan-genomes, based on their differential gene-composition profiles, provide a complementary, more resolved and often illuminating perspective on the evolutionary relationships between species.

A consensus PGM containing 29,623 clusters was computed from the intersection of those generated by the COG-triangles and OMCL algorithms (Figure 6). This PGM was subjected to ML tree searching using the binary and morphological models implemented in IQT for phylogenetic analysis of discrete characters with the aid of the `estimate_pangenome_phylogenies.sh` script bundled with GET_PHYLOMARKERS (Figure 1). As shown in the tabular inset of Figure 6, the binary GTR2+FO+R4 model was by large the best-fitting one (with the smallest AIC and BIC values). Twenty five independent IQT searches were performed on the consensus PGM with the best-fitting model. The best tree found is presented in Figure 6, rooted with the *Xanthomonas* spp. outgroup sequences. It depicts the evolutionary relationships of the 119 genomes based on their gene content (presence-absence) profiles. The numbers on the nodes indicate the approximate Bayesian posterior probabilities (aBypp)/UFBoot2 support values (see methods). The same tree, but without collapsing clades, is presented in the Figure S5. This phylogeny resolves exactly the same species-like clades highlighted on the core-genome phylogeny presented in Figure 5, which are also grouped in the two major clades I and II. These are labeled with the same names and color-codes, for easy cross-comparison. However, there are some notorious differences in the phylogenetic relationships between species on both trees, like the placement of *S. panacihumi* outside of the *Xanthomonas* clade, and the sister relation of genospecies 3 (Sgnp3) to the *S. maltophilia sensu lato* clade. These same relationships were found in a multi-state (Wagner) parsimony phylogeny of the PGM shown in Figure S6. In summary, all core-genome and pan-genome analyses presented consistently support our previous claim that the five genospecies defined in our MLSA study represent distinct species and support the existence of multiple cryptic species within the Smsl clade, as defined in Figure 5.

Application of a Non-supervised Learning Approach to BLAST-Based Core-Genome Average Nucleotide Distance (cgANDb) Matrices to Identify Statistically-Consistent Species-Like Clusters

The final goal of any geno-taxonomic study is to identify species-like clusters. These should consist of monophyletic groups identified on genome trees that display average genome identity (gANI) values >94%, based on a widely accepted cutoff-value (Rosselló-Móra and Amann, 2015). In this section we searched for such species-clusters within the taxonomically problematic *Stenotrophomonas maltophilia* complex (Smc). Our core- and pan-genome phylogenies consistently identified potential species-clades within the Smc that grouped exactly the same strains (compare Figures 5, 6). We additionally performed a cluster analysis of core-genome ANI values computed from the pairwise BLASTN alignments (cgANIb) used to define OMCL core-genome clusters for the 86 Smc genomes analyzed in this study. The resulting cgANIb matrix was then converted to a distance matrix (cgANDb = 100%–cgANIb) and clustered with the aid of the `plot_matrix_heatmap.sh` script from the GET_HOMOLOGUES suite. Figure 7 shows the resulting cladogram, which resolves 16 clusters within the Smc at a conservative cgANDb cutoff value of 5% (cgANIb = 95%). At this distance level, the four genospecies labeled as Sgn1–Sgn4 on Figure 5 are resolved as five clusters because the most divergent Sgn1 genome (ESTM1D_MKCIP4_1) is split as a separate lineage. This is the case also at cgANDb = 6 (Figure 7), reason why this strain most likely represents a sixth genospecies. All these genospecies are very distantly related to the large *S. maltophilia sensu lato* cluster, which gets split into 11 sub-clusters at the conservative cgANDb = 5% cutoff. Thirteen clusters are resolved at the 4% threshold, and a minimum of seven at the 6% level (cgANIb = 94%), as shown by the dashed lines (Figure 7). These results strongly suggest that the *S. maltophilia sensu lato* clade (Figure 5) actually comprises multiple species. The challenging question is how many? In an attempt to find a statistically-sound answer, we applied an unsupervised learning approach based on the evaluation of different goodness of clustering statistics to determine the optimal number of clusters (k) for the cgANDb matrix. The gap-statistic and a parametric, model-based cluster analysis, yielded k -values ≥ 35 (data not shown). These values seem too high for this dataset, as they correspond to a gANI value > 98%. However, the more conservative average silhouette width (ASW) method (Kaufman and Rousseeuw, 1990) identified an optimal $k = 19$ (inset in Figure 7) for the complete set of Smc genomes. This number of species-like clusters is much more reasonable for this data set, as it translates to a range of cgANDb between 4.5 and 4.7 (cgANIb range: 95.5–95.3%). Close inspection of the ASW profile reveals that the first peak is found at $k = 13$, which has an almost identical ASW as that of the maximal value and maps to a cgANDg = 5.7 (cgANIb of 94.3%). In summary, the range of reasonable numbers of clusters proposed by the ASW statistic ($k = 13$ to $k = 19$) corresponds to cgANDb values in the range of

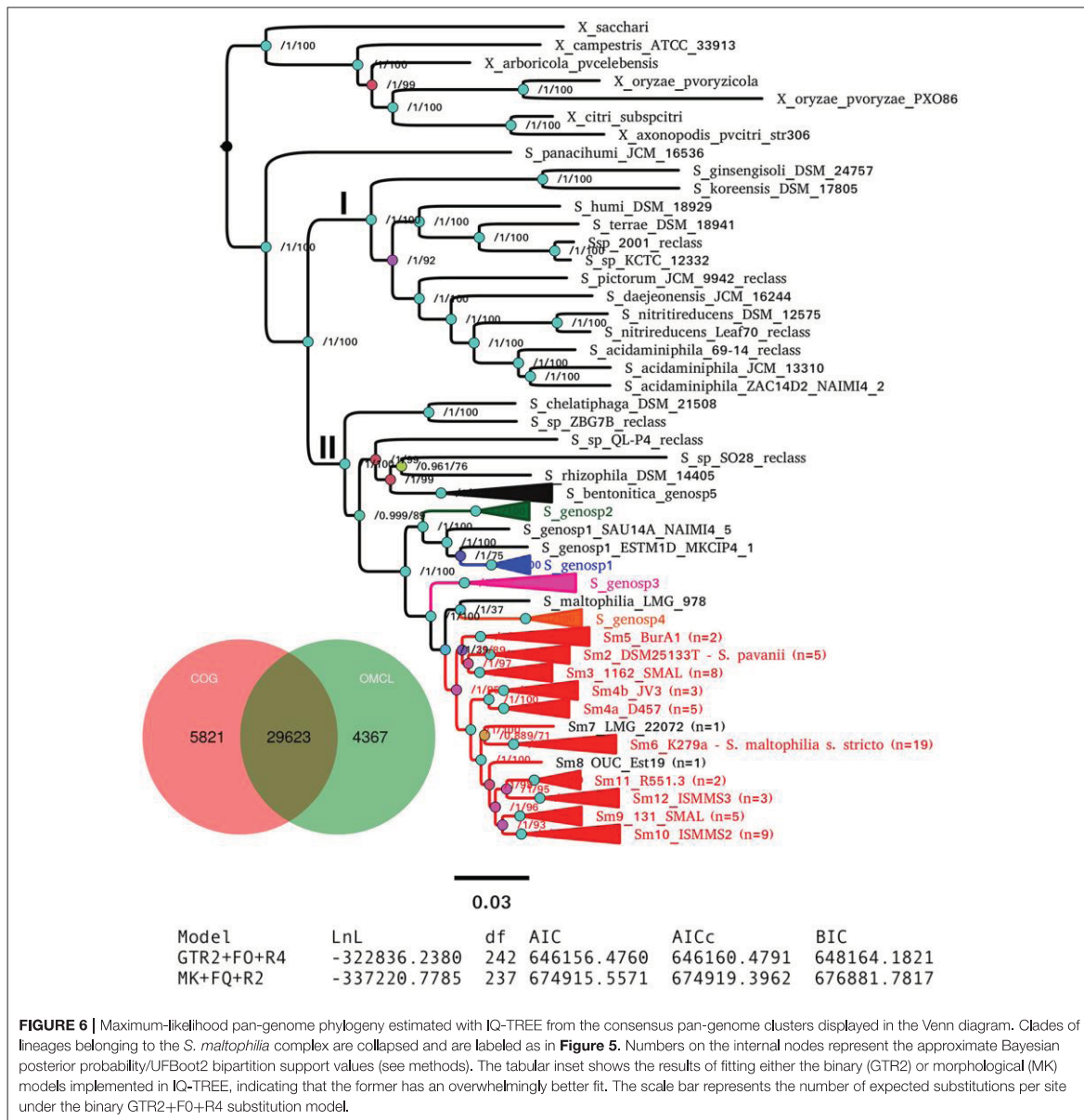
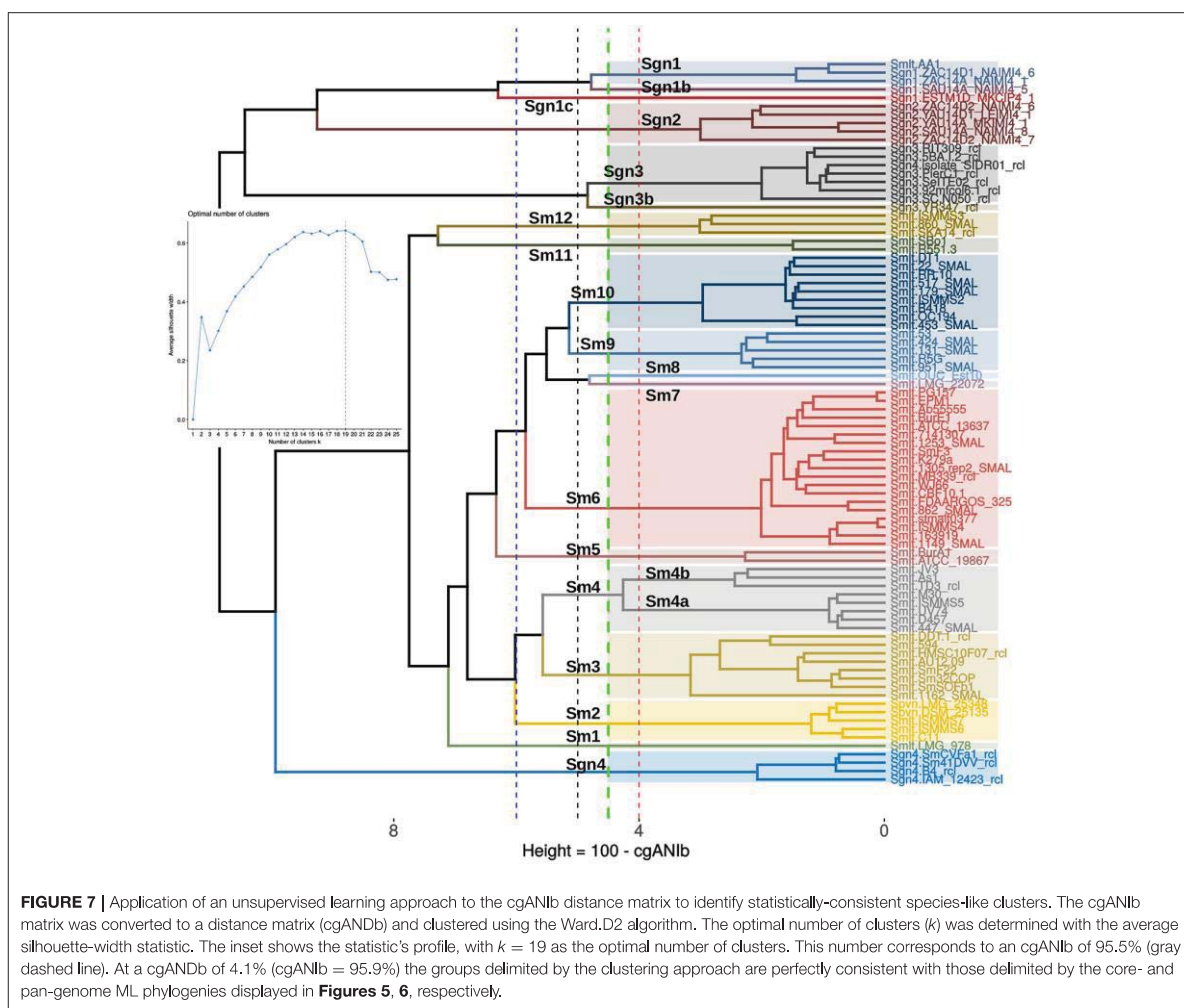


FIGURE 6 | Maximum-likelihood pan-genome phylogeny estimated with IQ-TREE from the consensus pan-genome clusters displayed in the Venn diagram. Clades of lineages belonging to the *S. maltophilia* complex are collapsed and are labeled as in **Figure 5**. Numbers on the internal nodes represent the approximate Bayesian posterior probability/UFBoot2 bipartition support values (see methods). The tabular inset shows the results of fitting either the binary (GTR2) or morphological (MK) models implemented in IQ-TREE, indicating that the former has an overwhelmingly better fit. The scale bar represents the number of expected substitutions per site under the binary GTR2+F0+R4 substitution model.

5.7–4.5% (cgANIb range: 94.3–95.5%), which fits well with the new gold-standard for species delimitation (gANI > 94%), established in influential works (Konstantinidis and Tiedje, 2005; Richter and Rosselló-Móra, 2009). We noted however, that at a cgANDb = 4.1% (cgANIb = 95.9%) the strain composition of the clusters was 100% concordant with the monophyletic subclades shown in the core-genome (**Figure 5**) and pan-genome (**Figure 6**) phylogenies. Importantly, at this cutoff, the length

of the branches subtending each cluster is maximal, both on the core-genome phylogeny (**Figure 5**) and on the cgANDb cladogram (**Figure 7**). Based on the combined and congruent evidence provided by these complementary approaches, we can safely conclude that: (i) the Smc genomes analyzed herein may actually comprise up to 19 or 20 different species-like lineages, and (ii) that only the strains grouped in the cluster labeled as Sm6 in **Figures 5–7** should be called *S. maltophilia*.



The latter is the most densely sampled species-like cluster ($n = 19$) and includes ATCC 13637^T, the type strain of the species.

On the Ecology and Other Biological Attributes of the Species-Like Clusters in the *Stenotrophomonas maltophilia* Complex

In this final section we present a brief summary of the ecological attributes reported for selected members of the species-like clusters resolved within the Smc (**Figures 5, 7**). The four unnamed genospecies (Sgn1-Sgn4) group mainly environmental isolates. This is consistent with our previous evolutionary and ecological analyses of a comprehensive multilocus dataset of the genus (Ochoa-Sánchez and Vinuesa, 2017). In that study only Mexican environmental isolates were found to be members of the

newly discovered genospecies Sgn1 and Sgn2 (named as Smc1 and Smc2, respectively). In this work we discovered that the recently sequenced maize root isolate AA1 (Niu et al., 2017), misclassified as *S. maltophilia*, clusters tightly with the Sgn1 strains (**Figure 5**). The *S. maltophilia sensu lato* clade is split into 12 or 13 groups based on cgANDB (**Figure 7**). Sm6 forms the largest cluster, grouping mostly clinical isolates related to the type strain *S. maltophilia* ATCC 13637^T, like the model strain K279a (Crossman et al., 2008), ISMMS4 (Pak et al., 2015), 862_SMAL, 1149_SMAL, and 1253_SMAL (Roach et al., 2015), as well as EPM1 (Sassera et al., 2013), recovered from the human parasite *Giardia duodenalis*. However, this group also comprises some environmental isolates like BurE1, recovered from a bulk soil sample (Youenou et al., 2015). In summary, cluster Sm6 holds the *bona fide* *S. maltophilia* strains (*sensu stricto*), which may be well-adapted to associate with different eukaryotic hosts and cause opportunistic infections in humans. Cluster Sm4a contains the

model strain D574 (Lira et al., 2012) along with four other clinical isolates (Conchillo-Solé et al., 2015) and therefore may represent a second clade enriched in strains with high potential to cause opportunistic pathogenic infections in humans. Noteworthy, this group is distantly related to Sm6 (Figures 5, 7). Cluster Sm4b is closely related to Sm4a based on the pan-genome phylogeny and the cgANDd cladogram (Figures 6, 7). It groups the Brazilian rhizosphere-colonizing isolate JV3, the Chinese highly metal-tolerant strain TD3 (Ge and Ge, 2016) and strain As1, isolated from the Asian malaria vector *Anopheles stephensi* (Hughes et al., 2016). The lineage Sm3 holds eight isolates of contrasting origin, including the Chinese soil isolate DDT-1, capable of using DDT as the sole source of carbon and energy (Pan et al., 2016), as well as clinical isolates like 1162_SMAL (Roach et al., 2015) and AU12-09, isolated from a vascular catheter (Zhang et al., 2013), and environmental isolates like SmF22, Sm32COP, and SmSOFb1, isolated from different manures in France (Bodilis et al., 2016). Cluster Sm2 groups the *S. pavanii* strains, including the type strain DSM_25135^T, isolated from the stems of sugar cane in Brazil (Ramos et al., 2011), together with the clinical isolates ISMMS6 and ISMMS7, that carry mutations conferring quinolone resistance and causing bacteremia (Pak et al., 2015), and strain C11, recovered from pediatric cystic fibrosis patients (Ormerod et al., 2015). Cluster Sm5 includes two strains recovered from soils, ATCC 19867 which was first classified as *Pseudomonas hibiscicola*, and later reclassified as *S. maltophilia* based on MLSA studies (Vasileuskaya-Schulz et al., 2011), and the African strain BurA1, isolated from bulk soil samples collected in sorghum fields in Burkina Faso (Youenou et al., 2015). Cluster Sm9 holds clinical isolates, like 131_SMAL, 424_SMAL, and 951_SMAL (Roach et al., 2015). Its sister group is Sm10. It holds 9 strains of contrasting geographic and ecological provenances, ranging from Chinese soil and plant-associated bacteria like the rice-root endophyte RR10 (Zhu et al., 2012), the grassland-soil tetracycline degrading isolate DT1 (Naas et al., 2008), and strain B418, isolated from a barley rhizosphere and displaying plant-growth promotion properties (Wu et al., 2015), to clinical isolates (22_SMAL, 179_SMAL, 453_SMAL, 517_SMAL) collected and studied in the context of a large genome sequencing project carried out at the University of Washington Medical Center (Roach et al., 2015). Cluster Sm11 tightly groups the well-characterized poplar endophyte R551-3, which is a model plant-growth-promoting bacterium (Ryan et al., 2009; Taghavi et al., 2009; Alavi et al., 2014) and SBo1, cultured from the gut of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Blow et al., 2016). Cluster Sm 12 contains the environmental strain SKA14 (Adamek et al., 2014), along with the clinical isolates ISMMS3 (Pak et al., 2015) and 860_SMAL (Roach et al., 2015). Sm1, Sm7, and Sm8 each hold a single strain.

The following conclusions can be drawn from this analysis: (i) the species-like clusters within the *S. maltophilia sensu lato* (Smsl) clade (Figure 5) are enriched in opportunistic human pathogens, when compared with the Smc clusters Sgn1-Sgn4; (ii) most Smsl clusters also contain diverse non-clinical isolates isolated from a wide range of habitats, demonstrating the great ecological versatility found even within specific Smsl clusters like Sm3 or Sm10; (iii) taken together, these observations strongly

suggest that the Smsl species-like clusters are all of environmental origin, with the potential for the opportunistic colonization of diverse human organs. This potential may be particularly high in certain lineages, like in *S. maltophilia sensu stricto* (Sm6) or Sm4a, both enriched in clinical isolates. However, a much denser sampling of genomes and associated phenotypes is required for all clusters to be able to identify statistically sound associations between them.

DISCUSSION

In this study we developed and benchmarked GET_PHYLOMARKERS, an open-source, comprehensive, and easy-to-use software package for phylogenomics and microbial genome taxonomy. Programs like amphora (Wu and Eisen, 2008) or phylosift (Darling et al., 2014) allow users to infer genome-phylogenies from huge genomic and metagenomic datasets by scanning new sequences against a reference database of conserved protein sequences to establish the phylogenetic relationships between the query sequences and database hits. The first program searches the input data for homologs to a set of 31 highly conserved proteins used as phylogenetic markers. Phylosift is more oriented toward the phylogenetic analysis of metagenome community composition and structure. Other approaches have been developed to study large populations of a single species. These are based on the identification of SNPs in sequence reads produced by high-throughput sequencers, using either reference-based or reference-free approaches, and subjecting them to phylogenetic analysis (Timme et al., 2013). The GET_PHYLOMARKERS software suite was designed with the aim of identifying orthologous clusters with optimal attributes for phylogenomic analysis and accurate species-tree inference. It also provides tools to infer phylogenies from pan-genomes, as well as non-supervised learning approaches for the analysis of overall genome relatedness indices (OGRI) for geno-taxonomic studies of multiple genomes. These attributes make GET_PHYLOMARKERS unique in the field.

It is well-established that the following factors strongly affect the accuracy of genomic phylogenies: (i) correct orthology inference; (ii) multiple sequence alignment quality; (iii) presence of recombinant sequences; (iv) loci producing anomalous phylogenies, which may result for example from horizontal gene transfer, differential loss of paralogs between lineages, and (v) amount of the phylogenetic signal. GET_PHYLOMARKERS aims to minimize the negative impact of potentially problematic, or poorly performing orthologous clusters, by explicitly considering and evaluating these factors. Orthologous clusters were identified with GET_HOMOLOGUES (Contreras-Moreira and Vinuesa, 2013) because of its distinctive capacity to compute high stringency clusters of single-copy orthologs. In this study we used a combination of BLAST alignment filtering, imposing a high (90%) query coverage threshold, PFAM-domain composition scanning and calculation of a consensus core-genome from the orthologous gene families produced by three clustering algorithms (BDBH, COGtriangles and OMCL) to minimize errors in orthology inference.

Multiple sequence alignments were generated with CLUSTAL-OMEGA (Sievers et al., 2012), a state-of-the-art software under constant development, capable of rapidly aligning hundreds of protein sequences with high accuracy, as reported in recent benchmark studies (Le et al., 2017; Sievers and Higgins, 2018). GET_PHYLOMARKERS generates protein alignments and uses them to compute the corresponding DNA-alignments, ensuring that the codon structure is always properly maintained. Recombinant sequences have been known for a long time to strongly distort phylogenies because they merge independent evolutionary histories into a single lineage. Recombination erodes the phylogenetic signal and misleads classic treeing algorithms, which assume a single underlying history (Schierup and Hein, 2000; Posada and Crandall, 2002; Martin, 2009; Didelot and Maiden, 2010; Pease and Hahn, 2013; Turrientes et al., 2014). Hence, the first filtering step in the pipeline is the detection of putative recombinant sequences using the very fast, sensitive and robust $\phi(w)$ statistic (Brueen et al., 2005). The genus *Stenotrophomonas* has been previously reported to have high recombination rates (Yu et al., 2016; Ochoa-Sánchez and Vinuesa, 2017). It is therefore not surprising that the $\phi(w)$ statistic detected significant evidence for recombination in up to 47% of the orthologous clusters. The non-recombinant sequences are subsequently subjected to maximum-likelihood phylogenetic inference to identify anomalous gene trees using the non-parametric *kdetrees* statistic (Weyenberg et al., 2014, 2017). The method estimates distributions of phylogenetic trees over the “tree space” expected under the multispecies-coalescent, identifying outlier trees based on their topologies and branch lengths in the context of this distribution. Since this test is applied downstream of the recombination analysis, only a modest, although still significant proportion (14–17%) of outlier trees were detected (Table 2). The next step determines the phylogenetic signal content of each gene tree (Vinuesa et al., 2008). It has been previously established that highly informative trees are less prone to get stuck in local optima (Money and Whelan, 2012). They are also required to properly infer divergence at the deeper nodes of a phylogeny (Salichos and Rokas, 2013), and to get reliable estimates of tree congruence and branch support in large concatenated datasets typically used in phylogenomics (Shen et al., 2017). We found that IQT-based searches allowed a significantly more efficient filtering of poorly resolved trees than FastTree. This is likely due to the fact that the former fits more sophisticated models (with more parameters) to better account for among-site rate variation. Under-parameterized and poorly fitting substitution models partly explain the apparent overestimation of bipartition support values done by FastTree. This is also the cause of the poorer performance of FastTree, which finds gene trees that generally have lower $\ln L$ scores than those found by IQT. A recent comparison of the performance of four fast ML phylogenetic programs using large phylogenomic data sets identified IQT (Nguyen et al., 2015) as the most accurate algorithm. It consistently found the highest-scoring trees. FastTree (Price et al., 2010) was, by large, the fastest program evaluated, although at the price of being the less accurate one (Zhou et al., 2017). This is in line with our findings. We could

show that the higher accuracy of IQT is particularly striking when using large concatenated datasets. As stated above, this is largely attributable to the richer choice of models implemented in the former. ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al., 2017) selected GTR+ASC+F+R6 model for the concatenated supermatrix, which is much richer in parameters than the GTR+CAT+Gamma20 model fitted by FastTree. The +ASC is an ascertainment bias correction parameter, which should be applied to alignments without constant sites (Lewis, 2001), such as the supermatrices generated by GET_PHYLOMARKERS (see methods). The FreeRate model (+R) generalizes the +G model (fitting a discrete Gamma distribution to model among-site rate variation) by relaxing the assumption of Gamma-distributed rates (Yang, 1995). The FreeRate model typically fits data better than the +G model and is recommended for the analysis of large data sets (Soubrier et al., 2012).

The impact of substitution models in phylogenetics has been extensively studied (Posada and Buckley, 2004). However, the better models implemented in IQT are not the only reason for its superior performance. A key aspect strongly impacting the quality of phylogenomic inference with large datasets is tree-searching. This has been largely neglected in most molecular systematic and phylogenetic studies of prokaryotes (Vinuesa et al., 2008; Vinuesa, 2010; Ochoa-Sánchez and Vinuesa, 2017). Due to the factorial increase of the number of distinct bifurcating topologies possible with every new sequence added to an alignment (Felsenstein, 2004a), searching the tree-space for large datasets is an NP-hard (non-deterministic polynomial-time) problem that necessarily requires heuristic algorithms. This implies that once an optimum is found, there is no way of telling whether it is the global one. The strategy to gain quantitative evidence about the quality of a certain tree is to compare its score in the context of other trees found in searches initiated from a pool of different seed trees. Due to the high dimensionality of the likelihood space, and the strict “hill-climbing” nature of ML tree search algorithms (Felsenstein, 1981), they generally get stuck in local optima (Money and Whelan, 2012). The scores of the best trees found in each search can then be compared in the form of an “ $\ln L$ score profile,” as performed in our study. Available software implementations for fast ML tree searching use different branch-swapping strategies to try to escape from early encountered “local optima.” IQT implements a more efficient tree-searching strategy than FastTree, based on a combination of hill-climbing and stochastic nearest-neighbor interchange (NNI) operations, always keeping a pool of seed trees, which help to escape local optima (Nguyen et al., 2015). This was evident when the $\ln L$ score profiles of both programs were compared. IQT found a much better scoring species tree despite the much higher number of independent searches performed with FastTree (50 vs. 1,001) using its most intensive branch-swapping regime. An important finding of our study is the demonstration that the $\ln L$ search profile of IQT is much shallower than that of FastTree. This suggests that the former finds trees much closer to the potential optimum than the latter. It has been shown that the highest-scoring (best) trees tend to have shorter branches, and overall tree-length, than those stuck in worse local optima (Money and Whelan, 2012). In agreement with this report, the best

species-tree found by IQT has a notoriously shorter total length and significantly shorter edges than those of the best species-tree found by FastTree.

Our extensive benchmark analysis conclusively demonstrated the superior performance of IQT. Based on this evidence, it was chosen as the default search algorithm for GET_PHYLOMARKERS. However, it should be noted that topological differences between the best trees found by both programs were minor, not affecting the composition of the major clades in the corresponding species trees. It is therefore safe to conclude that the reclassification of *Stenotrophomonas* genome sequences proposed in Table 3 is robust. They are consistently supported by the species-trees estimated with both programs. This result underlines the utility of GET_PHYLOMARKERS to identify misclassified genomes in public sequence repositories, a problem found in many genera (Sangal et al., 2016; Gomila et al., 2017). GET_PHYLOMARKERS is unique in its ability to combine core-genome phylogenomics with ML and parsimony phylogeny estimation from the PGM. In line with other recent studies (Caputo et al., 2015; Tu and Lin, 2016), we demonstrate that pan-genome analyses are valuable in the context of microbial molecular systematics and taxonomy. All genomes found to be misclassified based on the phylogenomic analysis of core-genomes were corroborated by the ML and parsimony analyses of the PGM. Furthermore, the combined evidence gained from these independent approaches consistently revealed that the Smc contains up to 20 monophyletic and strongly supported species-like clusters. These are defined at the cgANIb 95.9% threshold, and include the previously identified genospecies Smc1-Smc4 (Ochoa-Sánchez and Vinuesa, 2017), and up to 13 genospecies within the *S. maltophilia sensu lato* clade. This threshold fits well with the currently favored gANI > 94% cutoff for species delimitation (Konstantinidis and Tiedje, 2005; Richter and Rosselló-Móra, 2009). The consistency among all the different approaches strongly supports the proposed delimitations. We used an unsupervised learning procedure to determine the optimal number of clusters (k) in the cgANDb matrix computed from the 86 Smc genomes analyzed. The ASW goodness of clustering statistic proposed an optimal $k = 19$, which corresponds to a gANI = 95.5%. At this cutoff, 12 (instead of 13) species-like clusters are delimited within the *S. maltophilia sensu lato* clade. This unsupervised learning method therefore seems promising to define the optimal number of clusters in ANI-like matrices using a statistical procedure. However, it should be critically and extensively evaluated in other geno-taxonomic studies to better understand its properties and possible limitations, before being broadly used.

Current models of microbial speciation predict that bacterial species-like lineages should be identifiable by significantly reduced gene flow between them, even when recombination levels are high within species (Cadillo-Quiroz et al., 2012; Shapiro et al., 2012). Such lineages should also display differentiated ecological niches and phenotypes (Koeppel et al., 2008; Shapiro and Polz, 2015). In our previous comprehensive multilocus sequence analysis of species borders in the genus *Stenotrophomonas* (Ochoa-Sánchez and Vinuesa, 2017) we could

show that those models fitted our data well. We found highly significant genetic differentiation and marginal gene-flow across strains from sympatric Smc1 and Smc2 lineages, as well as highly significant differences in the resistance profiles of *S. maltophilia sensu lato* isolates vs. Smc1 and Smc2 isolates. We could also show that all three lineages have different habitat preferences (Ochoa-Sánchez and Vinuesa, 2017). The genomic analyses presented in this study for five Smc1 and Smc2 strains, respectively, fully support their separate species status from a geno-taxonomic perspective. Given the recognized importance of gene gain and loss processes in bacterial speciation and ecological specialization (Richards et al., 2014; Caputo et al., 2015; Shapiro and Polz, 2015; Jeukens et al., 2017), as reported also in plants (Gordon et al., 2017), we think that the evidence gained from pan-genome phylogenies is particularly informative for microbial geno-taxonomic investigations. They should be used to validate the groupings obtained by the classical gANI cutoff-based species delimitation procedure (Konstantinidis and Tiedje, 2005; Goris et al., 2007; Richter and Rosselló-Móra, 2009) that dominates current geno-taxonomic research. It is well documented that pan-genome-based groupings tend to better reflect ecologically relevant phenotypic differences between groups (Lukjancenko et al., 2010; Caputo et al., 2015; Jeukens et al., 2017). We recommend that future geno-taxonomic studies search for a consensus of the complementary views of genomic diversity provided by OGRIs, core- and pan-genome phylogenies, as performed herein. GET_PHYLOMARKERS is a useful and versatile tool for this task.

In summary, in this study we developed a comprehensive and powerful suite of open-source computational tools for state-of-the art phylogenomic and pan-genomic analyses. Their application to critically analyze the geno-taxonomic status of the genus *Stenotrophomonas* provided compelling evidence that the taxonomically ill-defined *S. maltophilia* complex holds many cryptic species. However, we refrain at this point from making formal taxonomic proposals for them because we have not yet performed the above-mentioned population genetic analyses to demonstrate the genetic cohesiveness of the individual species and their differentiation from closely related ones. This will be the topic of a follow-up work in preparation. We think that comparative genomic analyses designed to identify lineage-specific genetic differences that may underlie niche-differentiation of species are also powerful and objective criteria to delimit species in any taxonomic group (Vinuesa et al., 2005; Ochoa-Sánchez and Vinuesa, 2017).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

PV designed the project, wrote the bulk of the code, assembled the genomes, performed the analyses and wrote the paper. LO-S isolated the strains sequenced in this study and performed all wet-lab experiments. BC-M was involved in the original design of the project, contributed code, and set up the docker image. All authors read and approved the final version of the manuscript.

FUNDING

We gratefully acknowledge the funding provided by DGAPA/PAPIIT-UNAM (grants IN201806-2, IN211814 and IN206318) and CONACyT-México (grants P1-60071, 179133 and FC-2105-2-879) to PV, as well as the Fundación ARAID, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (grant 200720I038 and Spanish MINECO (AGL2013-48756-R) to BC-M.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Javier Rivera for excellent technical support with wet-lab experiments and José Alfredo Hernández and Víctor

del Moral for support with server administration. Jason Steel from the DNASU Sequencing Core at The Biodesign Institute, Arizona State University, is acknowledged for generating the genome sequences of our samples. Dr. Claudia Silva is thanked for her critical reading of the manuscript. We are thankful to GitHub (<https://github.com/>), docker (<https://hub.docker.com/>) and the open-source community at large, for providing great resources for software development.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.00771/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Adamek, M., Linke, B., and Schwartz, T. (2014). Virulence genes in clinical and environmental *Stenotrophomonas maltophilia* isolates: a genome sequencing and gene expression approach. *Microb. Pathog.* 67–68, 20–30. doi: 10.1016/j.micpath.2014.02.001
- Adamek, M., Overhage, J., Bathe, S., Winter, J., Fischer, R., and Schwartz, T. (2011). Genotyping of environmental and clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates and their pathogenic potential. *PLoS ONE* 6:e27615. doi: 10.1371/journal.pone.0027615
- Alavi, P., Starcher, M. R., Thallinger, G. G., Zachow, C., Müller, H., and Berg, G. (2014). *Stenotrophomonas* comparative genomics reveals genes and functions that differentiate beneficial and pathogenic bacteria. *BMC Genomics* 15:482. doi: 10.1186/1471-2164-15-482
- Angiuoli, S. V., Gussman, A., Klimke, W., Cochrane, G., Field, D., Garrity, G., et al. (2008). Toward an online repository of standard operating procedures (SOPs) for (meta)genomic annotation. *OMICS* 12, 137–141. doi: 10.1089/omi.2008.0017
- Anisimova, M., and Gascuel, O. (2006). Approximate likelihood-ratio test for branches: a fast, accurate, and powerful alternative. *Syst. Biol.* 55, 352–359. doi: 10.1080/10635150600755453
- Assih, E. A., Ouattara, A. S., Thierry, S., Cayol, J.-L., Labat, M., and Macarie, H. (2002). *Stenotrophomonas acidaminiphila* sp. nov. a strictly aerobic bacterium isolated from an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 559–568. doi: 10.1099/00207713-52-2-559
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., et al. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 19, 455–477. doi: 10.1089/cmb.2012.0021
- Berg, G., and Martinez, J. L. (2015). Friends or foes: can we make a distinction between beneficial and harmful strains of the *Stenotrophomonas maltophilia* complex? *Front. Microbiol.* 6:241. doi: 10.3389/fmicb.2015.00241
- Blow, F., Vontas, J., and Darby, A. C. (2016). Draft genome sequence of *Stenotrophomonas maltophilia* SBo1 isolated from *Bactrocera oleae*. *Genome Announc.* 4:e00905-16. doi: 10.1128/genomeA.00905-16
- Bodilis, J., Youenou, B., Briolay, J., Brothier, E., Favre-Bonté, S., and Nazaret, S. (2016). Draft genome sequences of *Stenotrophomonas maltophilia* strains Sm32COP, Sm41DVV, Sm46PAILV, SmF3, SmF22, SmSOFb1, and SmCVFa1, isolated from different manures in France. *Genome Announc.* 4:e00841-16. doi: 10.1128/genomeA.00841-16
- Bosi, E., Donati, B., Galardini, M., Brunetti, S., Sagot, M.-F., Lió, P., et al. (2015). MeDuSa: a multi-draft based scaffold. *Bioinformatics* 31, 2443–2451. doi: 10.1093/bioinformatics/btv171
- Brooke, J. S. (2012). *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 25, 2–41. doi: 10.1128/CMR.00019-11
- Bruen, T. C., Philippe, H., and Bryant, D. (2005). A simple and robust statistical test for detecting the presence of recombination. *Genetics* 172, 2665–2681. doi: 10.1534/genetics.105.048975
- Cadillo-Quiroz, H., Didelot, X., Held, N. L., Herrera, A., Darling, A., Reno, M. L., et al. (2012). Patterns of gene flow define species of thermophilic Archaea. *PLoS Biol.* 10:e1001265. doi: 10.1371/journal.pbio.1001265
- Caputo, A., Merhej, V., Georgiades, K., Fournier, P.-E., Croce, O., Robert, C., et al. (2015). Pan-genomic analysis to redefine species and subspecies based on quantum discontinuous variation: the *Klebsiella* paradigm. *Biol. Direct* 10:55. doi: 10.1186/s13062-015-0085-2
- Chang, Y.-T., Lin, C.-Y., Chen, Y.-H., and Hsueh, P.-R. (2015). Update on infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia* with particular attention to resistance mechanisms and therapeutic options. *Front. Microbiol.* 6:893. doi: 10.3389/fmicb.2015.00893
- Chen, C., Khaleel, S. S., Huang, H., and Wu, C. H. (2014). Software for pre-processing Illumina next-generation sequencing short read sequences. *Source Code Biol. Med.* 9:8. doi: 10.1186/1751-0473-9-8
- Chun, J., and Rainey, F. A. (2014). Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the Bacteria and Archaea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 316–324. doi: 10.1099/ijs.0.054171-0
- Ciccarelli, F. D., Doerks, T., von Mering, C., Creevey, C. J., Snel, B., and Bork, P. (2006). Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. *Science* 311, 1283–1287. doi: 10.1126/science.1123061
- Conchillo-Solé, O., Yero, D., Coves, X., Huedo, P., Martínez-Servat, S., Daura, X., et al. (2015). Draft genome sequence of *Stenotrophomonas maltophilia* strain UV74 reveals extensive variability within its genomic group. *Genome Announc.* 3:e00611-15. doi: 10.1128/genomeA.00611-15
- Contreras-Moreira, B., and Vinuesa, P. (2013). GET_HOMOLOGUES, a versatile software package for scalable and robust microbial pangenome analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 7696–7701. doi: 10.1128/AEM.02411-13
- Contreras-Moreira, B., Cantalapiedra, C. P., Garcia-Pereira, M. J., Gordon, S. P., Vogel, J. P., Igartua, E., et al. (2017). Analysis of plant pangenomes and transcriptomes with GET_HOMOLOGUES-EST, a clustering solution for sequences of the same species. *Front. Plant Sci.* 8:184. doi: 10.3389/fpls.2017.00184
- Crossman, L. C., Gould, V. C., Dow, J. M., Vernikos, G. S., Okazaki, A., Sebaihia, M., et al. (2008). The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. *Genome Biol.* 9:R74. doi: 10.1186/gb-2008-9-4-r74
- Darling, A. E., Jospin, G., Lowe, E., Matsen, F. A., Bik, H. M., and Eisen, J. A. (2014). PhyloSift: phylogenetic analysis of genomes and metagenomes. *PeerJ* 2:e243. doi: 10.7717/peerj.243
- Daubin, V., Gouy, M., and Perrière, G. (2002). A phylogenomic approach to bacterial phylogeny: evidence of a core of genes sharing a common history. *Genome Res.* 12, 1080–1090. doi: 10.1101/gr.187002
- Davenport, K. W., Daligault, H. E., Minogue, T. D., Broomall, S. M., Bruce, D. C., Chain, P. S., et al. (2014). Complete genome sequence of *Stenotrophomonas*

- multophilia* type strain 810-2 (ATCC 13637). *Genome Announc.* 2:e00974-14. doi: 10.1128/genomeA.00974-14
- Degnan, J. H., and Rosenberg, N. A. (2009). Gene tree discordance, phylogenetic inference and the multispecies coalescent. *Trends Ecol. Evol.* 24, 332–340. doi: 10.1016/j.tree.2009.01.009
- Deredjian, A., Alliot, N., Blanchard, L., Brothier, E., Anane, M., Cambier, P., et al. (2016). Occurrence of *Stenotrophomonas maltophilia* in agricultural soils and antibiotic resistance properties. *Res. Microbiol.* 167, 313–324. doi: 10.1016/j.resmic.2016.01.001
- Didelot, X., and Maiden, M. C. J. (2010). Impact of recombination on bacterial evolution. *Trends Microbiol.* 18, 315–322. doi: 10.1016/j.tim.2010.04.002
- Dornburg, A., Townsend, J. P., and Wang, Z. (2017). “Maximizing power in phylogenetics and phylogenomics: a perspective illuminated by fungal big data,” in *Advances in Genetics*, eds J. P. Townsend and Z. Wang (Cambridge, MA: Academic Press), 1–47.
- Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17, 368–376. doi: 10.1007/BF01734359
- Felsenstein, J. (2004a). *Inferring Phylogenies*. Sunderland, MA: Sinauer Associates INC.
- Felsenstein, J. (2004b). PHYLIP (Phylogeny Inference Package). Seattle, DC: University of Washington. Available online at: <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/>
- Finkmann, W., Altendorf, K., Stackebrandt, E., and Lipski, A. (2000). Characterization of N(2)O-producing *Xanthomonas*-like isolates from biofilters as *Stenotrophomonas nitritireducens* sp. nov. *Luteimonas mephitis* gen. nov. sp. nov. and *Pseudoxanthomonas broegbernensis* gen. nov. sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 273–282. doi: 10.1099/00207713-50-1-273
- Gauthier, J., Vincent, A. T., Charette, S. J., and Derome, N. (2017). Strong genomic and phenotypic heterogeneity in the *Aeromonas sobria* species complex. *Front. Microbiol.* 8:2434. doi: 10.3389/fmicb.2017.02434
- Ge, S., and Ge, S. C. (2016). Simultaneous Cr(VI) reduction and Zn(II) biosorption by *Stenotrophomonas* sp. and constitutive expression of related genes. *Biotechnol. Lett.* 38, 877–884. doi: 10.1007/s10529-016-2057-8
- Gomila, M., Busquets, A., Mulet, M., García-Valdés, E., and Lalucat, J. (2017). Clarification of taxonomic status within the *Pseudomonas syringae* species group based on a phylogenomic analysis. *Front. Microbiol.* 8:2422. doi: 10.3389/fmicb.2017.02422
- Gordon, S. P., Contreras-Moreira, B., Woods, D. P., Des Marais, D. L., Burgess, D., Shu, S., et al. (2017). Extensive gene content variation in the *Brachypodium distachyon* pan-genome correlates with population structure. *Nat. Commun.* 8:2184. doi: 10.1038/s41467-017-02292-8
- Goris, J., Konstantinidis, K. T., Klappenbach, J. A., Coenye, T., Vandamme, P., and Tiedje, J. M. (2007). DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 81–91. doi: 10.1099/ijs.0.64483-0
- Guindon, S., Dufayard, J.-F. 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
- Handa, Y., Tazato, N., Nagatsuka, Y., Koide, T., Kigawa, R., Sano, C., et al. (2016). *Stenotrophomonas tumulicola* sp. nov. a major contaminant of the stone chamber interior in the Takamatsuzuka Tumulus. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 1119–1124. doi: 10.1099/ijsem.0.000843
- Heylen, K., Vanparys, B., Peirsegaale, F., Lebbe, L., and De Vos, P. (2007). *Stenotrophomonas terrae* sp. nov. and *Stenotrophomonas humi* sp. nov. two nitrate-reducing bacteria isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 2056–2061. doi: 10.1099/ijs.0.65044-0
- Hoang, D. T., Chernomor, O., von Haeseler, A., Minh, B. Q., Le, S. V., and Vinh, L. S. (2017). UFBoot2: improving the ultrafast bootstrap approximation. *Mol. Biol. Evol.* 35, 518–522. doi: 10.1101/153916
- Hughes, G. L., Raygoza Garay, J. A., Koundal, V., Rasgon, J. L., and Mwangi, M. M. (2016). Genome sequence of *Stenotrophomonas maltophilia* strain SmAs1, isolated from the asian malaria mosquito *Anopheles stephensi*. *Genome Announc.* 4:e00086-16. doi: 10.1128/genomeA.00086-16.
- Jeukens, J., Freschi, L., Vincent, A. T., Emond-Rheault, J.-G., Kukavica-Ibrulj, I., Charette, S. J., et al. (2017). A pan-genomic approach to understand the basis of host adaptation in *Achromobacter*. *Genome Biol. Evol.* 9, 1030–1046. doi: 10.1093/gbe/evx061
- Kaiser, S., Biehler, K., and Jonas, D. (2009). A *Stenotrophomonas maltophilia* multilocus sequence typing scheme for inferring population structure. *J. Bacteriol.* 191, 2934–2943. doi: 10.1128/JB.00892-08
- Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K. F., von Haeseler, A., and Jermini, L. S. (2017). ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat. Methods* 14, 587–589. doi: 10.1038/nmeth.4285
- Kaparullina, E., Doronina, N., Chistyakova, T., and Trotsenko, Y. (2009). *Stenotrophomonas chelatiphaga* sp. nov. a new aerobic EDTA-degrading bacterium. *Syst. Appl. Microbiol.* 32, 157–162. doi: 10.1016/j.syapm.2008.12.003
- Kaufman, L., and Rousseeuw, P. J. (eds.). (1990). *Finding Groups in Data*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc.
- Kim, H.-B., Srinivasan, S., Sathiyaraj, G., Quan, L.-H., Kim, S.-H., Bui, T. P. N., et al. (2010). *Stenotrophomonas ginsengisoli* sp. nov. isolated from a ginseng field. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 1522–1526. doi: 10.1099/ijs.0.014662-0
- Koeppel, A., Perry, E. B., Sikorski, J., Krizanc, D., Warner, A., Ward, D. M., et al. (2008). Identifying the fundamental units of bacterial diversity: a paradigm shift to incorporate ecology into bacterial systematics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 2504–2509. doi: 10.1073/pnas.0712205105
- Konstantinidis, K. T., and Tiedje, J. M. (2005). Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 2567–2572. doi: 10.1073/pnas.0409727102
- Konstantinidis, K. T., and Tiedje, J. M. (2007). Prokaryotic taxonomy and phylogeny in the genomic era: advancements and challenges ahead. *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 504–509. doi: 10.1016/j.mib.2007.08.006
- Kubatko, L. S., and Degnan, J. H. (2007). Inconsistency of phylogenetic estimates from concatenated data under coalescence. *Syst. Biol.* 56, 17–24. doi: 10.1080/10635150601146041
- Kumar, S., Filipski, A. J., Battistuzzi, F. U., Kosakovsky Pond, S. L., and Tamura, K. (2012). Statistics and truth in phylogenomics. *Mol. Biol. Evol.* 29, 457–472. doi: 10.1093/molbev/msr202
- Le, Q., Sievers, F., and Higgins, D. G. (2017). Protein multiple sequence alignment benchmarking through secondary structure prediction. *Bioinformatics* 33:btw840. doi: 10.1093/bioinformatics/btw840
- Lee, M., Woo, S. G., Chae, M., Shin, M. C., Jung, H.-M., and Ten, L. N. (2011). *Stenotrophomonas daejeonensis* sp. nov. isolated from sewage. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 598–604. doi: 10.1099/ijs.0.017780-0
- Lerat, E., Daubin, V., and Moran, N. A. (2003). From gene trees to organismal phylogeny in prokaryotes: the case of the gamma-Proteobacteria. *PLoS Biol.* 1:E19. doi: 10.1371/journal.pbio.0000019
- Lewis, P. O. (2001). A likelihood approach to estimating phylogeny from discrete morphological character data. *Syst. Biol.* 50, 913–925. doi: 10.1080/106351501753462876
- Li, H., and Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754–1760. doi: 10.1093/bioinformatics/btp324
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., et al. (2009). The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078–2079. doi: 10.1093/bioinformatics/btp352
- Lira, F., Berg, G., and Martínez, J. L. (2017). Double-face meets the bacterial world: the opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Front. Microbiol.* 8:2190. doi: 10.3389/fmicb.2017.02190
- Lira, F., Hernández, A., Belda, E., Sánchez, M. B., Moya, A., Silva, F. J., et al. (2012). Whole-genome sequence of *Stenotrophomonas maltophilia* D457, A clinical isolate and a model strain. *J. Bacteriol.* 194, 3563–3564. doi: 10.1128/JB.00602-12
- Lukjancenko, O., Wassenaar, T. M., and Ussery, D. W. (2010). Comparison of 61 sequenced *Escherichia coli* genomes. *Microb. Ecol.* 60, 708–720. doi: 10.1007/s00248-010-9717-3
- Martin, D. P. (2009). Recombination detection and analysis using RDP3. *Methods Mol. Biol.* 537, 185–205. doi: 10.1007/978-1-59745-251-9_9
- Money, D., and Whelan, S. (2012). Characterizing the phylogenetic tree-search problem. *Syst. Biol.* 61:228. doi: 10.1093/sysbio/syr097
- Naas, T., Cuzon, G., Villegas, M. V., Lartigue, M. F., Quinn, J. P., and Nordmann, P. (2008). Genetic structures at the origin of acquisition of the β -lactamase blaKPC gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 1257–1263. doi: 10.1128/AAC.01451-07
- Nguyen, L.-T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A., and Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood

- phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 32, 268–274. doi: 10.1093/molbev/msu300
- Niu, B., Paulson, J. N., Zheng, X., and Kolter, R. (2017). Simplified and representative bacterial community of maize roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114, E2450–E2459. doi: 10.1073/pnas.1616148114
- Nourdin-Galindo, G., Sánchez, P., Molina, C. F., Espinoza-Rojas, D. A., Oliver, C., Ruiz, P., et al. (2017). Comparative pan-genome analysis of *Piscirickettsia salmonis* reveals genomic divergences within genogroups. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7:459. doi: 10.3389/fcimb.2017.00459
- Ochoa-Sánchez, L. E., and Vinuesa, P. (2017). Evolutionary genetic analysis uncovers multiple species with distinct habitat preferences and antibiotic resistance phenotypes in the *Stenotrophomonas maltophilia* complex. *Front. Microbiol.* 8:1548. doi: 10.3389/fmicb.2017.01548
- Ormerod, K. L., George, N. M., Fraser, J. A., Wainwright, C., and Hugenholtz, P. (2015). Comparative genomics of non-pseudomonad bacterial species colonising paediatric cystic fibrosis patients. *PeerJ* 3:e1223. doi: 10.7717/peerj.1223
- Ouattara, A. S., Le Mer, J., Joseph, M., and Macarie, H. (2017). Transfer of *Pseudomonas pictorum* gray and thornston 1928 to genus *Stenotrophomonas* as *Stenotrophomonas pictorum* comb. nov. and emended description of the genus *Stenotrophomonas*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67, 1894–1900. doi: 10.1099/ijsem.0.001880
- Pak, T. R., Altman, D. R., Attie, O., Sebra, R., Hamula, C. L., Lewis, M., et al. (2015). Whole-genome sequencing identifies emergence of a quinolone resistance mutation in a case of *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 7117–7120. doi: 10.1128/AAC.01723-15
- Palleroni, N. J. (2005). “Genus, IX. *Stenotrophomonas* Palleroni and Bradbury 1993,” in *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Edn.*, eds G. M. Garrity, D. J. Brenner, N. R. Krieg, and J. T. Staley (New York, NY: Springer), 107–115.
- Palleroni, N. J., and Bradbury, J. F. (1993). *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43, 606–609. doi: 10.1099/00207713-43-3-606
- Pan, X., Lin, D., Zheng, Y., Zhang, Q., Yin, Y., Cai, L., et al. (2016). Biodegradation of DDT by *Stenotrophomonas* sp. DDT-1: characterization and genome functional analysis. *Sci. Rep.* 6:21332. doi: 10.1038/srep21332
- Parks, M. B., Wickett, N. J., and Alverson, A. J. (2018). Signal, uncertainty, and conflict in phylogenomic data for a diverse lineage of microbial eukaryotes (Diatoms, Bacillariophyta). *Mol. Biol. Evol.* 35, 80–93. doi: 10.1093/molbev/msx268
- Patil, P. P., Midha, S., Kumar, S., and Patil, P. B. (2016). Genome sequence of type strains of genus *Stenotrophomonas*. *Front. Microbiol.* 7:309. doi: 10.3389/fmicb.2016.00309
- Pease, J. B., and Hahn, M. W. (2013). More accurate phylogenies inferred from low-recombination regions in the presence of incomplete lineage sorting. *Evolution* 67, 2376–2384. doi: 10.1111/evo.12118
- Popescu, A.-A., Huber, K. T., and Paradis, E. (2012). ape 3.0: new tools for distance-based phylogenetics and evolutionary analysis in R. *Bioinformatics* 28, 1536–1537. doi: 10.1093/bioinformatics/bts184
- Posada, D., and Buckley, T. R. (2004). Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Syst. Biol.* 53, 793–808. doi: 10.1080/10635150490522304
- Posada, D., and Crandall, K. A. (2002). The effect of recombination on the accuracy of phylogeny estimation. *J. Mol. Evol.* 54, 396–402. doi: 10.1007/s00239-001-0034-9
- Price, M. N., Dehal, P. S., and Arkin, A. P. (2010). FastTree 2—approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS ONE* 5:e9490. doi: 10.1371/journal.pone.0009490
- Ramos, P. L., Van Trappen, S., Thompson, F. L., Rocha, R. C. S., Barbosa, H. R., De Vos, P., et al. (2011). Screening for endophytic nitrogen-fixing bacteria in Brazilian sugar cane varieties used in organic farming and description of *Stenotrophomonas pavanii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 926–931. doi: 10.1099/ijms.0.019372-0
- Richards, V. P., Palmer, S. R., Pavinski Bitar, P. D., Qin, X., Weinstock, G. M., Highlander, S. K., et al. (2014). Phylogenomics and the dynamic genome evolution of the genus *Streptococcus*. *Genome Biol. Evol.* 6, 741–753. doi: 10.1093/gbe/evu048
- Richter, M., and Rosselló-Móra, R. (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 19126–19131. doi: 10.1073/pnas.0906412106
- Roach, D. J., Burton, J. N., Lee, C., Stackhouse, B., Butler-Wu, S. M., Cookson, B. T., et al. (2015). A year of infection in the intensive care unit: prospective whole genome sequencing of bacterial clinical isolates reveals cryptic transmissions and novel microbiota. *PLoS Genet.* 11:e1005413. doi: 10.1371/journal.pgen.1005413
- Rosselló-Móra, R., and Amann, R. (2015). Past and future species definitions for Bacteria and Archaea. *Syst. Appl. Microbiol.* 38, 209–216. doi: 10.1016/j.syapm.2015.02.001
- Rousseeuw, P. J. (1987). Silhouettes: a graphical aid to the interpretation and validation of cluster analysis. *J. Comput. Appl. Math.* 20, 53–65. doi: 10.1016/0377-0427(87)90125-7
- Ryan, R. P., Monchy, S., Cardinale, M., Taghavi, S., Crossman, L., Avison, M. B., et al. (2009). The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 514–525. doi: 10.1038/nrmicro2163
- Salichos, L., and Rokas, A. (2013). Inferring ancient divergences requires genes with strong phylogenetic signals. *Nature* 497, 327–331. doi: 10.1038/nature12130
- Sánchez-Castro, I., Ruiz-Fresneda, M. A., Bakkali, M., Kämpfer, P., Glaeser, S. P., Busse, H. J., et al. (2017). *Stenotrophomonas bentonitica* sp. nov. isolated from bentonite formations. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67, 2779–2786. doi: 10.1099/ijsem.0.002016
- Sandner-Miranda, L., Vinuesa, P., Cravioto, A., and Morales-Espinoza, R. (2018). The genomic basis of intrinsic and acquired antibiotic resistance in the genus *Serratia*. *Front. Microbiol.* 9:828. doi: 10.3389/fmicb.2018.00828
- Sangal, V., Goodfellow, M., Jones, A. L., Schwalbe, E. C., Blom, J., Hoskisson, P. A., et al. (2016). Next-generation systematics: an innovative approach to resolve the structure of complex prokaryotic taxa. *Sci. Rep.* 6:38392. doi: 10.1038/srep38392
- Sassera, D., Leardini, I., Villa, L., Comandatore, F., Carta, C., Almeida, A., et al. (2013). Draft genome sequence of *Stenotrophomonas maltophilia* Strain EPM1, found in association with a culture of the human parasite *Giardia duodenalis*. *Genome Announc.* 1:e00182-13. doi: 10.1128/genomeA.00182-13
- Savory, E. A., Fuller, S. L., Weisberg, A. J., Thomas, W. J., Gordon, M. I., Stevens, D. M., et al. (2017). Evolutionary transitions between beneficial and phytopathogenic *Rhodococcus* challenge disease management. *Elife* 6:e30925. doi: 10.7554/eLife.30925
- Schierup, M. H., and Hein, J. (2000). Consequences of recombination on traditional phylogenetic analysis. *Genetics* 156, 879–891. Available online at: <http://www.genetics.org/content/156/2/879.long>
- Shapiro, B. J., and Polz, M. F. (2015). Microbial speciation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7:a018143. doi: 10.1101/cshperspect.a018143
- Shapiro, B. J., Friedman, J., Cordero, O. X., Preheim, S. P., Timberlake, S. C., Szabó, G., et al. (2012). Population genomics of early events in the ecological differentiation of bacteria. *Science* 336, 48–51. doi: 10.1126/science.1218198
- Shen, X.-X., Hittinger, C. T., and Rokas, A. (2017). Contentious relationships in phylogenomic studies can be driven by a handful of genes. *Nat. Ecol. Evol.* 1:126. doi: 10.1038/s41559-017-0126
- Sievers, F., and Higgins, D. G. (2018). Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. *Protein Sci.* 27, 135–145. doi: 10.1002/pro.3290
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., et al. (2012). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7:539. doi: 10.1038/msb.2011.75
- Soubrier, J., Steel, M., Lee, M. S., Der Sarkissian, C., Guindon, S., Ho, S. Y. W., et al. (2012). The influence of rate heterogeneity among sites on the time dependence of molecular rates. *Mol. Biol. Evol.* 29, 3345–3358. doi: 10.1093/molbev/mss140
- Stackebrandt, E., and Goebel, B. M. (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 846–849. doi: 10.1099/00207713-44-4-846
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P. A., Kämpfer, P., Maiden, M. C., et al. (2002). Report of the *ad hoc* committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1043–1047. doi: 10.1099/00207713-52-3-1043

- Suyama, M., Torrents, D., and Bork, P. (2006). PAL2NAL: robust conversion of protein sequence alignments into the corresponding codon alignments. *Nucleic Acids Res.* 34, W609–W612. doi: 10.1093/nar/gkl315
- Svensson-Stadler, L. A., Mihaylova, S. A., and Moore, E. R. (2012). *Stenotrophomonas* interspecies differentiation and identification by *gyrB* sequence analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 327, 15–24. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02452.x
- Taghavi, S., Garafola, C., Monchy, S., Newman, L., Hoffman, A., Weyens, N., et al. (2009). Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 748–757. doi: 10.1128/AEM.02239-08
- Tange, O. (2011). GNU parallel: the command-line power tool. *USENIX Mag.* 36, 42–47. Available online at: <https://www.usenix.org/publications/login/february-2011-volume-36-number-1/gnu-parallel-command-line-power-tool>
- Tettelin, H., Masignani, V., Cieslewicz, M. J., Donati, C., Medini, D., Ward, N. L., et al. (2005). Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial “pan-genome.” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 13950–13955. doi: 10.1073/pnas.0506758102
- Thompson, C. C., Chimento, L., Edwards, R. A., Swings, J., Stackebrandt, E., and Thompson, F. L. (2013). Microbial genomic taxonomy. *BMC Genomics* 14:913. doi: 10.1186/1471-2164-14-913
- Thompson, C. C., Vicente, A. C., Souza, R. C., Vasconcelos, A. T., Vesth, T., Alves, N. Jr., et al. (2009). Genomic taxonomy of *Vibrios*. *BMC Evol. Biol.* 9:258. doi: 10.1186/1471-2148-9-258
- Timme, R. E., Pettengill, J. B., Allard, M. W., Strain, E., Barrangou, R., Wehnes, C., et al. (2013). Phylogenetic diversity of the enteric pathogen *Salmonella enterica* subsp. *enterica* inferred from genome-wide reference-free SNP characters. *Genome Biol. Evol.* 5, 2109–2123. doi: 10.1093/gbe/evt159
- Tu, Q., and Lin, L. (2016). Gene content dissimilarity for subclassification of highly similar microbial strains. *BMC Genomics* 17:647. doi: 10.1186/s12864-016-2991-9
- Turrientes, M.-C., González-Alba, J.-M., del Campo, R., Baquero, M.-R., Cantón, R., Baquero, F., et al. (2014). Recombination blurs phylogenetic groups routine assignment in *Escherichia coli*: setting the record straight. *PLoS ONE* 9:e105395. doi: 10.1371/journal.pone.0105395
- Valdezate, S., Vindel, A., Martín-Dávila, P., Del Saz, B. S., Baquero, F., and Cantón, R. (2004). High genetic diversity among *Stenotrophomonas maltophilia* strains despite their originating at a single hospital. *J. Clin. Microbiol.* 42, 693–699. doi: 10.1128/JCM.42.2.693-699.2003
- Vandamme, P., and Peeters, C. (2014). Time to revisit polyphasic taxonomy. *Antonie Van Leeuwenhoek* 106, 57–65. doi: 10.1007/s10482-014-0148-x
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K., and Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60, 407–438.
- Vasileuskaya-Schulz, Z., Kaiser, S., Maier, T., Kostrzewa, M., and Jonas, D. (2011). Delineation of *Stenotrophomonas* spp. by multi-locus sequence analysis and MALDI-TOF mass spectrometry. *Syst. Appl. Microbiol.* 34, 35–39. doi: 10.1016/j.syapm.2010.11.011
- Vinuesa, P. (2010). “Multilocus sequence analysis and bacterial species phylogeny estimation,” in *Molecular Phylogeny of Microorganisms*, eds A. Oren and R. T. Papke (Caister Academic Press), 41–64. Available online at: <http://www.horizonpress.com/phylogeny>
- Vinuesa, P., and Contreras-Moreira, B. (2015). Robust identification of orthologues and paralogues for microbial pan-genomics using GET_HOMOLOGUES: a case study of *pIncA/C* plasmids. *Methods Mol. Biol.* 1231, 203–232. doi: 10.1007/978-1-4939-1720-4_14
- Vinuesa, P., and Ochoa-Sánchez, L. E. (2015). Complete genome sequencing of *Stenotrophomonas acidaminiphila* ZAC14D2_NAIMI4_2, a multidrug-resistant strain isolated from sediments of a polluted river in Mexico, Uncovers new antibiotic resistance genes and a novel class-II lasso peptide biosynthesis gene cluster. *Genome Announc.* 10:e01433-15. doi: 10.1128/genomeA.01433-15
- Vinuesa, P., Rojas-Jiménez, K., Contreras-Moreira, B., Mahna, S. K., Prasad, B. N., Moe, H., et al. (2008). Multilocus sequence analysis for assessment of the biogeography and evolutionary genetics of four *Bradyrhizobium* species that nodulate soybeans on the Asiatic continent. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6987–6996. doi: 10.1128/AEM.00875-08
- Vinuesa, P., Silva, C., Werner, D., and Martínez-Romero, E. (2005). Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. *Mol. Phylogenet. Evol.* 34, 29–54. doi: 10.1016/j.ympev.2004.08.020
- Walker, B. J., Abeel, T., Shea, T., Priest, M., Abouelliel, A., Sakthikumar, S., et al. (2014). Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. *PLoS ONE* 9:e112963. doi: 10.1371/journal.pone.0112963
- Weyenberg, G., Huggins, P. M., Scharld, C. L., Howe, D. K., and Yoshida, R. (2014). kdetrees: non-parametric estimation of phylogenetic tree distributions. *Bioinformatics* 30, 2280–2287. doi: 10.1093/bioinformatics/btu258
- Weyenberg, G., Yoshida, R., and Howe, D. (2017). Normalizing kernels in the billera-holmes-vogtmann treespace. *IEEE/ACM Trans. Comput. Biol. Bioinform.* 14, 1359–1365. doi: 10.1109/TCBB.2016.2565475
- Wolf, A., Fritze, A., Hagemann, M., and Berg, A. (2002). *Stenotrophomonas rhizophila* sp. nov. a novel plant-associated bacterium with antifungal properties. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1937–1944. doi: 10.1099/00207713-52-6-1937
- Wu, M., and Eisen, J. A. (2008). A simple, fast, and accurate method of phylogenomic inference. *Genome Biol.* 9:R151. doi: 10.1186/gb-2008-9-10-r151
- Wu, Y., Wang, Y., Li, J., Hu, J., Chen, K., Wei, Y., et al. (2015). Draft genome sequence of *Stenotrophomonas maltophilia* strain B418, a promising agent for biocontrol of plant pathogens and root-knot nematode. *Genome Announc.* 3:e00015-15. doi: 10.1128/genomeA.00015-15
- Yang, H.-C., Im, W.-T., Kang, M. S., Shin, D.-Y., and Lee, S.-T. (2006). *Stenotrophomonas koreensis* sp. nov. isolated from compost in South Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 81–84. doi: 10.1099/ijs.0.63826-0
- Yang, Z. (1995). A space-time process model for the evolution of DNA sequences. *Genetics* 139, 993–1005.
- Yi, H., Srinivasan, S., and Kim, M. K. (2010). *Stenotrophomonas panacihumi* sp. nov. isolated from soil of a ginseng field. *J. Microbiol.* 48, 30–35. doi: 10.1007/s12275-010-0006-0
- Youenou, B., Favre-Bonté, S., Bodilis, J., Brothier, E., Dubost, A., Muller, D., et al. (2015). Comparative genomics of environmental and clinical *Stenotrophomonas maltophilia* strains with different antibiotic resistance profiles. *Genome Biol. Evol.* 7, 2484–2505. doi: 10.1093/gbe/evv161
- Yu, D., Yin, Z., Li, B., Jin, Y., Ren, H., Zhou, J., et al. (2016). Gene flow, recombination, and positive selection in *Stenotrophomonas maltophilia*: mechanisms underlying the diversity of the widespread opportunistic pathogen. *Genome* 59, 1063–1075. doi: 10.1139/gen-2016-0073
- Zhang, L., Morrison, M. O., Cuiv, P., Evans, P., and Rickard, C. M. (2013). Genome sequence of *Stenotrophomonas maltophilia* Strain AU12-09, isolated from an intravascular catheter. *Genome Announc.* 1:e00195-13. doi: 10.1128/genomeA.00195-13
- Zhou, X., Shen, X.-X., Hittinger, C. T., and Rokas, A. (2017). Evaluating fast maximum likelihood-based phylogenetic programs using empirical phylogenomic data sets. *Mol. Biol. Evol.* 35, 486–503. doi: 10.1101/142323
- Zhu, B., Liu, H., Tian, W.-X., Fan, X.-Y., Li, B., Zhou, X.-P., et al. (2012). Genome sequence of *Stenotrophomonas maltophilia* RR-10, isolated as an endophyte from rice root. *J. Bacteriol.* 194, 1280–1281. doi: 10.1128/JB.06702-11

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 © 2018 Vinuesa, Ochoa-Sánchez and Contreras-Moreira. 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) and the copyright owner 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.

Anexo 5. Material suplementario del artículo GET_PHYLOMARKERS, a Software Package to Select Optimal Orthologous Clusters for Phylogenomics and Inferring Pan-Genome Phylogenies, Used for a Critical Genomic Taxonomic Revision of the Genus *Stenotrophomonas*

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.00771/full#supplementary-material>



Supplementary material for:

Vinuesa P*, Ochoa-Sánchez LE and Contreras-Moreira B (2018). **GET_PHYLOMARKERS, a software package to select optimal orthologous clusters for phylogenomics and inferring pan-genome phylogenies, used for a critical geno-taxonomic revision of the genus *Stenotrophomonas*.** *Front. Microbiol.* 9:771. doi: 10.3389/fmicb.2018.00771

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.00771/full>

Published as part of the Research Topic on: **Microbial Taxonomy, Phylogeny and Biodiversity**: <https://www.frontiersin.org/research-topics/5493/microbial-taxonomy-phylogeny-and-biodiversity>

*Correspondence: Pablo Vinuesa, [vinuesa\[at\]ccg.unam.mx](mailto:vinuesa[at]ccg.unam.mx)

Pablo Vinuesa's ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6119-2956>

Bruno Contrera-Moreira's ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5462-907X>

Running title: **Estimating genome phylogenies with GET_PHYLOMARKERS**

The code described in this work is written in Bash, Perl and R for Linux/Unix/MacOS servers, and is freely available at https://github.com/vinuesa/get_phylomarkers under the GNU GPLv3 license. A docker image bundling it with GET_HOMOLOGUES is also available at https://hub.docker.com/r/csicunam/get_homologues/, which can be run on Windows machines.

Contents:

1. **Supplementary figures S1-S6**
2. **Supplementary tables S1 and S2**
3. **Supplementary code snippets, as examples on how to run a selection of the auxiliary scripts distributed in the GET_PHYLOMARKERS package**

1. Supplementary Figures

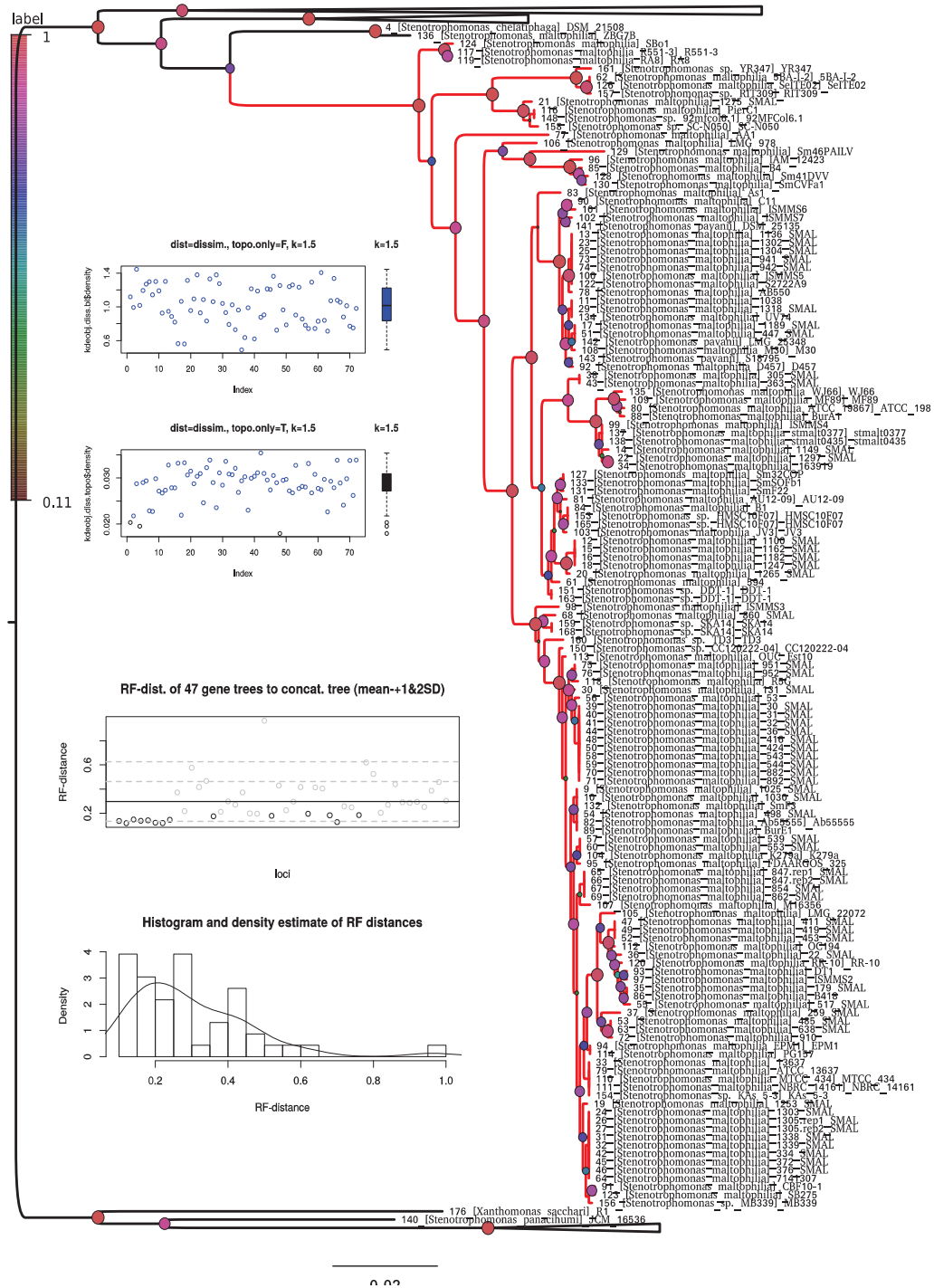


Figure S1. Maximum-likelihood phylogeny (FastTree) of the full set of reference genomes analyzed in this study (170 *Stenotrophomonas* spp. + 7 *Xanthomonas* spp.). Some clades collapsed for better readability of the tree.

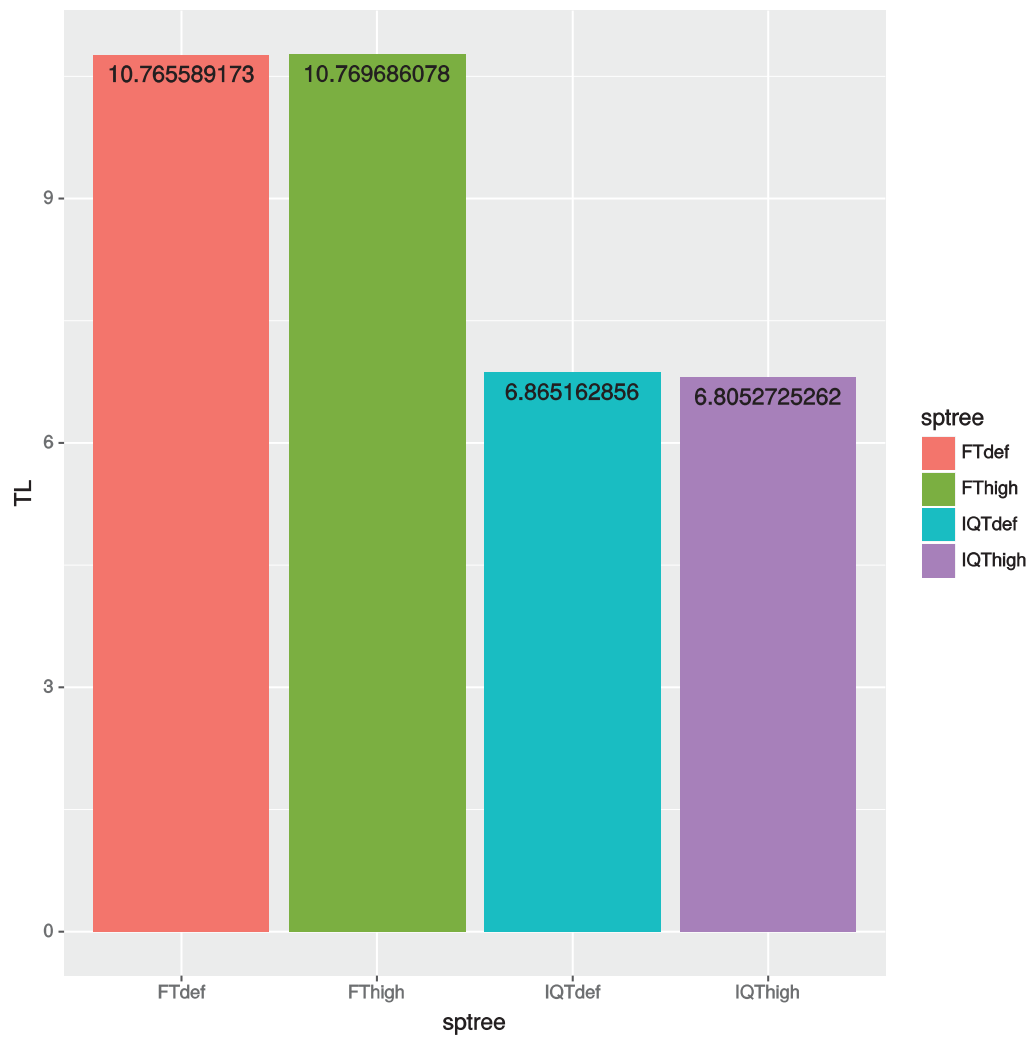


Figure S2. Barplot of the tree-lengths (summ of edge lengths) of each species-tree estimated by the indicated search types (see Table 2).

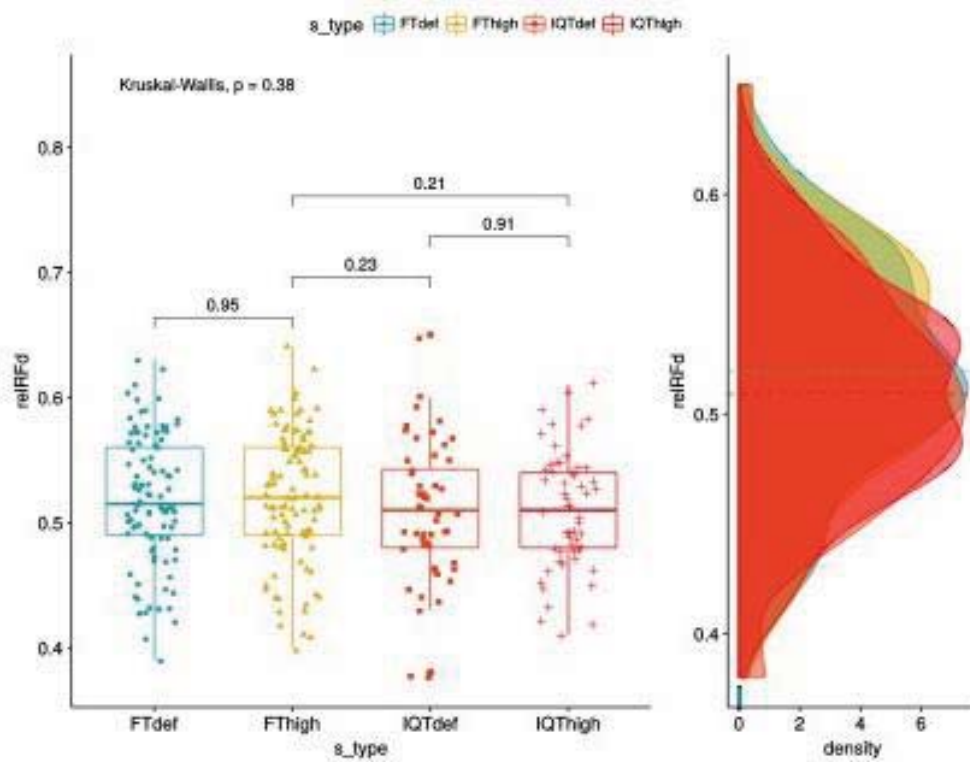


Figure S3. Distribution of Robinson-Foulds distances of gene trees to the corresponding species tree computed from the supermatrix of concatenated top-scoring markers by each search type.

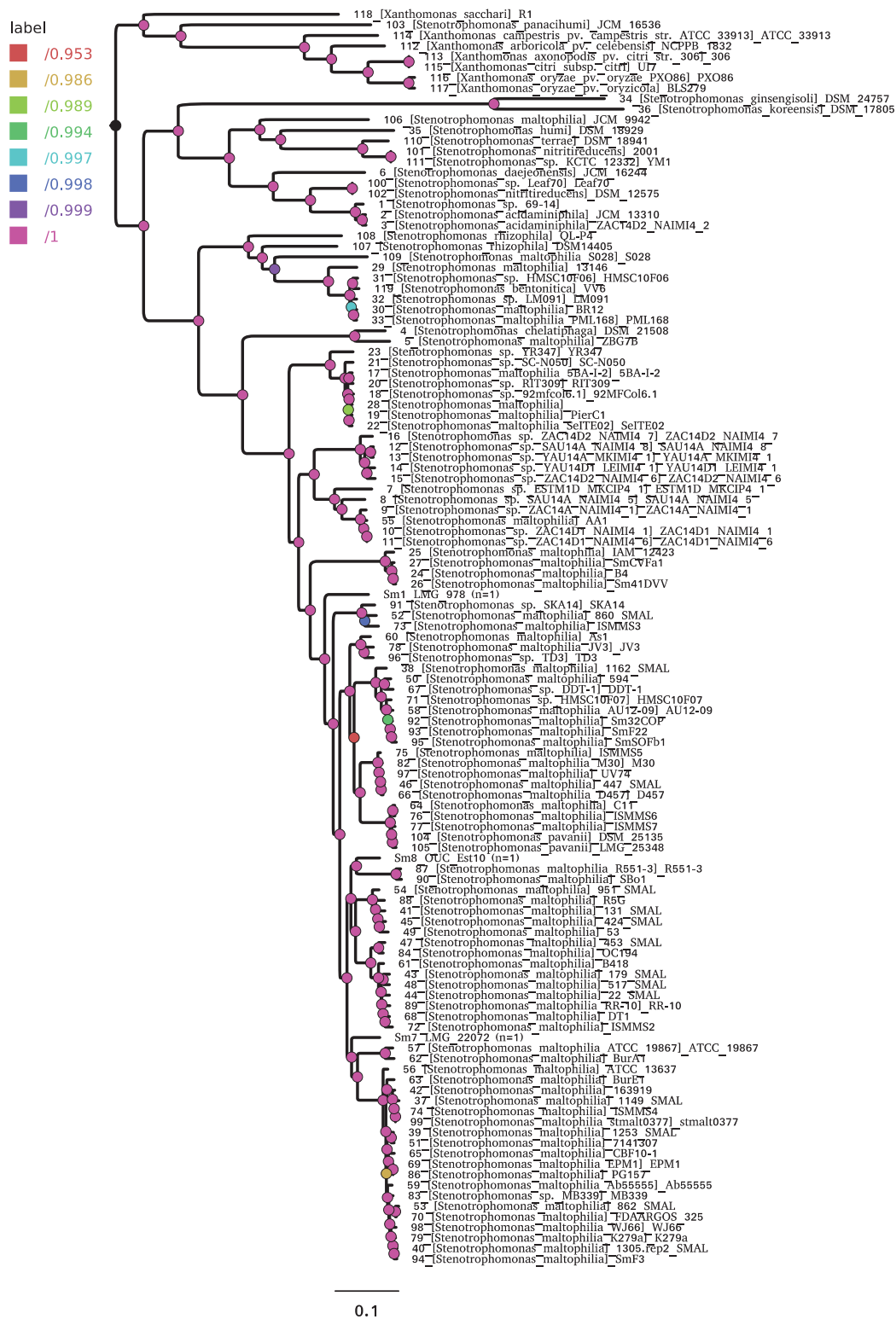


Figure S4. Full version of the IQ-TREE ML species tree for 119 genomes shown in Figure 5 of the main text.

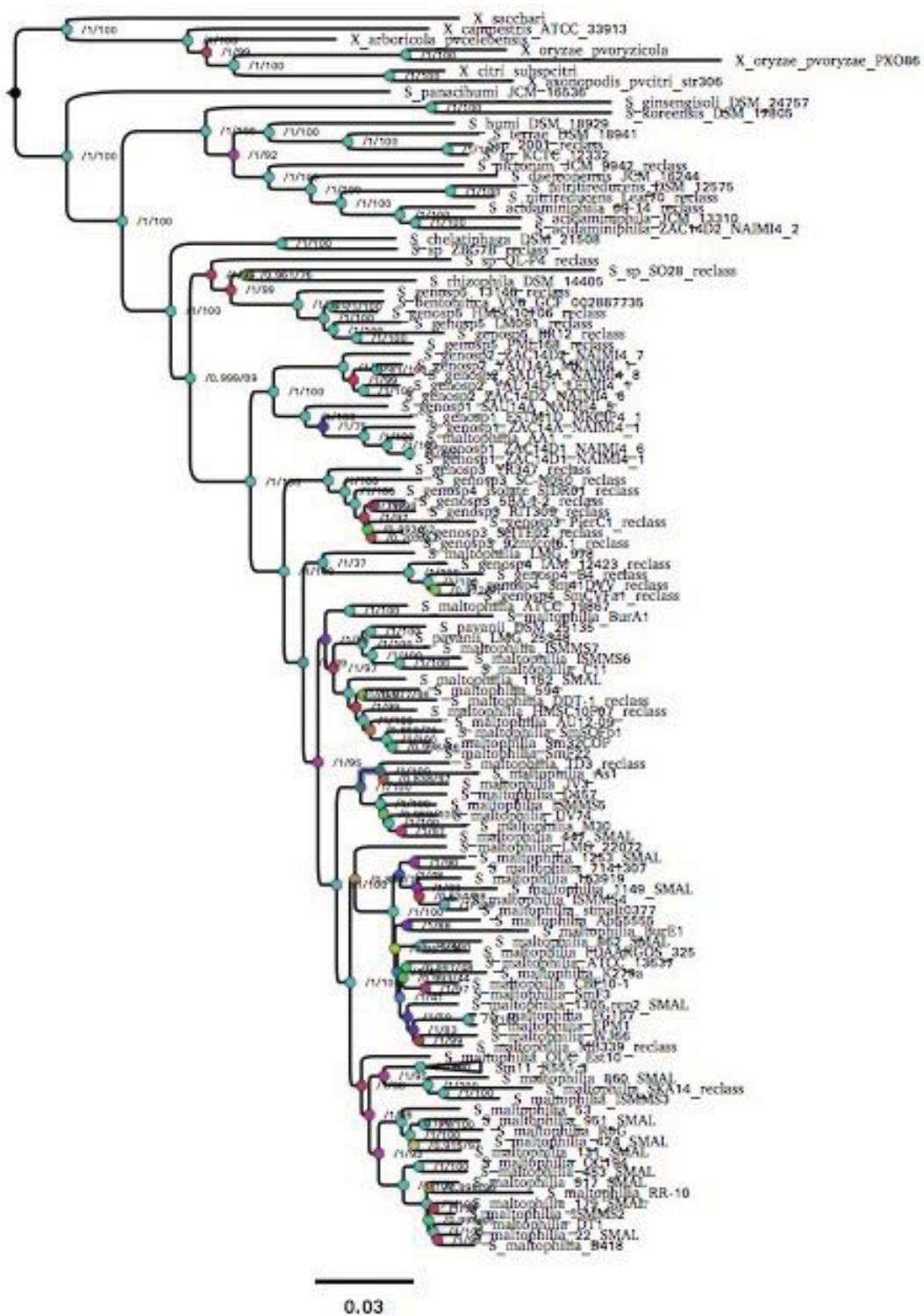


Figure S5. Full version of the ML pan-genome tree shown in Figure 6 of the main text

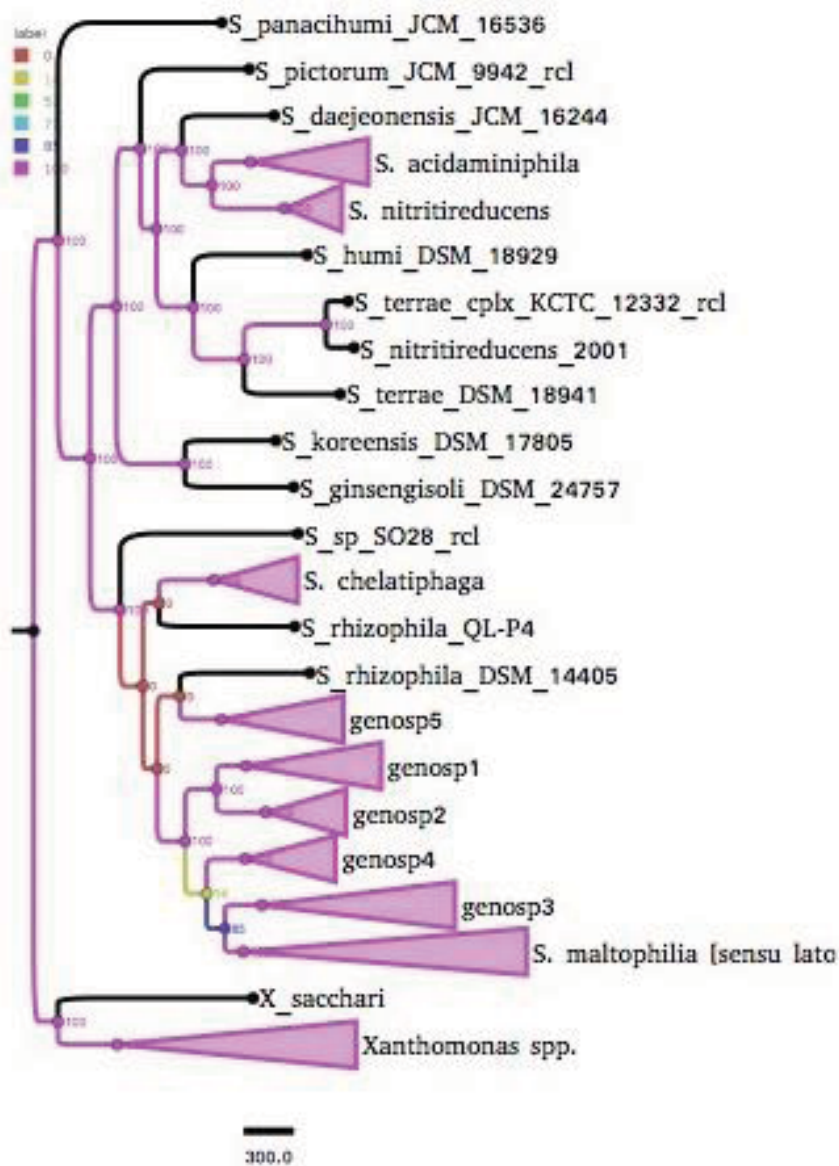


Figure S6. Best parsimony tree (score = 63977) found among 3200 independent pars searches + bootstrap analysis (4000 pseudoreplicates) performed on the PGM (31,433 consensus clusters computed from those identified by COGtriangles + OMC) for 118 selected *Stenotrophomonas* + *Xanthomonas* (outgroup) genomes.

2. Supplementary tables

Table S1. Overview of key characteristics of the genome assemblies reported in this study for 10 environmental isolates recovered from Mexican rivers and classified as genospecies 1 and 2 in the study of Ochoa-Sánchez and Vinuesa (2017). Details of their isolation sites and antimicrobial resistance phenotypes can be found therein. All genomes consist of a single gapped scaffold. The RefSeq acc. numbers and key annotation features for each genome are presented in Table 1 of the main text.

Genome	Num_gaps	Num_Ns	Size_nt	BioProject	BioSample
<i>Stenotrophomonas</i> genospecies1 ESTM1D MKCIP4 1	6	240	4475880	PRJNA429695	SAMN08357817
<i>Stenotrophomonas</i> genospecies1 SAU14A NAIMI4 5	9	180	4570883	PRJNA429695	SAMN08357818
<i>Stenotrophomonas</i> genospecies1 ZAC14A NAIMI4 1	11	575	4698328	PRJNA429695	SAMN08357819
<i>Stenotrophomonas</i> genospecies1 ZAC14D1 NAIMI4 1	3	1076	4702461	PRJNA429695	SAMN08357820
<i>Stenotrophomonas</i> genospecies1 ZAC14D1 NAIMI4 6	11	920	4700343	PRJNA429695	SAMN08357821
<i>Stenotrophomonas</i> genospecies2 SAU14A NAIMI4 8	4	369	4479100	PRJNA429695	SAMN08357822
<i>Stenotrophomonas</i> genospecies2 YAU14A MKIMI4 1	9	1361	4487007	PRJNA429695	SAMN08357823
<i>Stenotrophomonas</i> genospecies2 YAU14D1 LEIMI4 1	5	193	4319112	PRJNA429695	SAMN08357824
<i>Stenotrophomonas</i> genospecies2 ZAC14D2 NAIMI4 6	9	347	4431104	PRJNA429695	SAMN08357825
<i>Stenotrophomonas</i> genospecies2 ZAC14D2 NAIMI4 7	13	423	4468731	PRJNA429695	SAMN08357826

Table S2. Genomic characteristics of the selected reference genomes after excluding the highly fragmented ones (> 300 contigs).

Genus	Species	Reclass	Strain	Fragments	Size_nt	Status	BioProject	BioSample	Assembly	PMID
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>acidaminiphila</i>	Y	69-14	27	3693706	draft	PRJNA279279	SAMN05660631		NA
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>acidaminiphila</i>	N	JCM_13310	126	3942520	draft	PRJNA284377	SAMN03701729		27014232
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>acidaminiphila</i>	N	ZAC14D2_NAIM14_2	1	4138297	complete	PRJNA296415	SAMN04099006	GCA_001314305.1	26659678
<i>Stenotrophomona</i>	<i>bentonitica</i>	N	VV6	45	4364949	draft	PRJNA427609	SAMN08241739	GCA_002887735.1	29472346
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>chelatifhaga</i>	Y	ZBG7B	145	4065399	draft	PRJNA272355	SAMN03280975		26659682
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>chelatifhaga</i>	N	DSM_21508	148	3967734	draft	PRJNA284369	SAMN03701678		27014232
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>daejeonensis</i>	N	JCM_16244	124	3284859	chromosome	PRJNA284378	SAMN03701730		27014232
<i>Stenotrophomonas</i>	genosp3	Y	5BA-l-2	4	4568054	draft	PRJNA224116	SAMN02641498	GCF_000543365.1	24604648
<i>Stenotrophomonas</i>	genosp3	Y	92mfc06.1	11	4596228	draft	PRJNA224116	SAMN04488690	GCF_900116025.1	NA
<i>Stenotrophomonas</i>	genosp3	Y	PierC1	59	4638575	draft	PRJEB8824	SAMEA3309462		26276674
<i>Stenotrophomonas</i>	genosp3	Y	RIT309	45	4634795	draft	PRJNA224116	SAMN02676627	GCF_000632045.1	24812212
<i>Stenotrophomonas</i>	genosp3	Y	SC-N050	24	4484445	draft	PRJNA224116	SAMN05720615	GCF_900111475.1	NA
<i>Stenotrophomonas</i>	genosp3	Y	SeITE02	63	4557111	draft	PRJNA224116	SAMEA3138997	GCF_000613205.1	24812214
<i>Stenotrophomonas</i>	genosp3	Y	YR347	11	4686524	draft	PRJNA224116	SAMN05518671	GCF_900188015.1	NA
<i>Stenotrophomonas</i>	genosp4	Y	B4	180	4334733	draft	PRJNA224116	SAMN03753636	GCF_001276355.1	NA
<i>Stenotrophomonas</i>	genosp4	N	IAM_12423	9	4144460	draft	PRJNA224116	SAMN04487782	GCF_900113425.1	NA
<i>Stenotrophomonas</i>	genosp4	N	isolate_SIDR01	2	4602565	draft	PRJNA248909	SAMN06040735		NA
<i>Stenotrophomonas</i>	genosp4	Y	Sm41DVV	26	4139723	draft	PRJNA323790	SAMN05188789		NA
<i>Stenotrophomonas</i>	genosp4	Y	SmCVFa1	30	4264176	draft	PRJNA323845	SAMN05190067		NA
<i>Stenotrophomonas</i>	genosp5	Y	13146	60	4444179	draft	PRJNA224116	SAMN07237143	GCF_002205165.1	NA
<i>Stenotrophomonas</i>	genosp5	Y	BR12	80	4405362	draft	PRJNA224116	SAMN03456145	GCF_000972335.1	26472823
<i>Stenotrophomonas</i>	genosp5	Y	HMSC10F06	63	4114905	draft	PRJNA269850	SAMN03287020		NA
<i>Stenotrophomonas</i>	genosp5	Y	LM091	1	4317450	complete	PRJNA344031	SAMN05818440		NA
<i>Stenotrophomonas</i>	genosp5	Y	PML168	97	4403876	draft	PRJNA224116	SAMEA2272452	GCF_000308335.1	22887661
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>ginsengisoli</i>	N	DSM_24757	99	3374112	draft	PRJNA284375	SAMN03701688		27014232
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>humi</i>	N	DSM_18929	92	4122049	draft	PRJNA284364	SAMN03701675		27014232
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>korensis</i>	N	DSM_17805	58	3029904	draft	PRJNA284363	SAMN03701670		27014232
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	1149_SMAL	235	4847430	draft	PRJNA224116	SAMN03197105	GCF_001069295.1	26230489
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	1162_SMAL	108	4392826	draft	PRJNA224116	SAMN03197119	GCF_001068765.1	26230489
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	1253_SMAL	102	4833739	draft	PRJNA224116	SAMN03197220	GCF_001068915.1	26230489
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	1305.rep2_SMAL	158	5024838	draft	PRJNA224116	SAMN03197279	GCF_001069615.1	26230489
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	131_SMAL	71	4794818	draft	PRJNA224116	SAMN03197286	GCF_001069645.1	26230489
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	163919	148	4695069	draft	PRJNA224116	SAMN07237142	GCF_002205175.1	NA
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	179_SMAL	67	4533188	draft	PRJNA224116	SAMN03197369	GCF_001071655.1	26230489
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	22_SMAL	38	4457527	draft	PRJNA224116	SAMN03197412	GCF_001071815.1	26230489
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	424_SMAL	68	5202479	draft	PRJNA224116	SAMN03197617	GCF_001072915.1	26230489
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	447_SMAL	47	4802736	draft	PRJNA224116	SAMN03197640	GCF_001071115.1	26230489
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	453_SMAL	28	4779898	draft	PRJNA224116	SAMN03197645	GCF_001073045.1	26230489
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	517_SMAL	108	4569872	draft	PRJNA224116	SAMN03197711	GCF_001073225.1	26230489
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	53	127	4637887	draft	PRJNA260977	SAMN03067892		25883296
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	594	119	4484627	draft	PRJNA224116	SAMN07237146	GCF_002205215.1	NA
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	7141307	129	4725889	draft	PRJNA224116	SAMN07237141	GCF_002205295.1	NA
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	860_SMAL	266	4466361	draft	PRJNA224116	SAMN03198069	GCF_001074685.1	26230489
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	862_SMAL	238	4445747	draft	PRJNA224116	SAMN03198070	GCF_001074705.1	26230489
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	951_SMAL	259	4814445	draft	PRJNA224116	SAMN03198171	GCF_001075475.1	26230489
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	AA1	1	4663337	complete	PRJNA224116	SAMN06130959	GCF_002025605.1	28275097
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	Ab55555	6	4918930	draft	PRJNA164599	SAMN02596924		NA
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	As1	33	4394082	draft	PRJNA224116	SAMN03491122	GCF_001051925.1	26966198
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	ATCC_13637	182	4951541	draft	PRJNA224116	SAMN05721779	GCF_001997185.1	NA

<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	ATCC_19867	14	4424025	draft	PRJNA224116	SAMN02441648	GCF_000382065.1	NA
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	AU12-09	125	4547300	draft	PRJNA174752	SAMN02469852		23640378
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	B418	231	4688249	draft	PRJNA224116	SAMN03161950	GCF_000788095.1	25700397
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	BurA1	64	4360660	draft	PRJEB8824	SAMEA3309460		26276674
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	BurE1	48	4504590	draft	PRJEB8824	SAMEA3309461		26276674
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	C11	242	4770820	draft	PRJNA285410	SAMN03753638		NA
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	CBF10-1	115	4556616	draft	PRJNA312840	SAMN04507546		NA
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	D457	1	4769156	complete	PRJEA89665	SAMEA2272378		22689246
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	Y	DDT-1	97	4514569	draft	PRJNA286061	SAMN03764479		26888254
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	DT1	64	4526952	draft	PRJNA224116	SAMN05915699	GCF_001866065.1	NA
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	EPM1	1	4787769	chromosome	PRJNA224116	SAMN02471395	GCF_000344215.1	23599297
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	FDAARGOS_325	1	4851139	complete	PRJNA224116	SAMN06173338	GCF_002208885.1	NA
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	Y	HMSC10F07	158	4491970	draft	PRJNA269851	SAMN03287021		NA
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	ISMMS2	1	4509724	complete	PRJNA277366	SAMN03389647		26324280
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	ISMMS3	1	4804002	complete	PRJNA277366	SAMN03389650		26324280
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	ISMMS4	3	4752108	draft	PRJNA224116	SAMN03389651	GCF_001275085.1	26324280
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	ISMMS5	18	4784825	draft	PRJNA224116	SAMN03389652	GCF_001275075.1	26324280
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	ISMMS6	10	4832466	draft	PRJNA224116	SAMN03389653	GCF_001275095.1	26324280
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	ISMMS7	2	4702773	draft	PRJNA224116	SAMN03389654	GCF_001651505.1	26324280
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	JV3	1	4544477	complete	PRJNA53943	SAMN02261377		NA
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	K279a	1	4851126	complete	PRJNA30351	SAMEA1705934		18419807
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	LMG_22072	173	4512166	draft	PRJNA224116	SAMN04207869	GCF_001431675.1	27014232
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	LMG_978	109	4484616	draft	PRJNA224116	SAMN04207868	GCF_001431665.1	27014232
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	M30	193	4902008	draft	PRJNA235918	SAMN02592618		24926059
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	Y	MB339	262	4897648	draft	PRJNA224116	SAMN06176942	GCF_001974685.1	NA
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	OC194	202	4688045	draft	PRJNA224116	SAMN04041569	GCF_001297005.1	NA
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	OUC_Est10	1	4668743	complete	PRJNA224116	SAMN04992827	GCF_002138415.1	NA
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	PG157	76	4949420	draft	PRJNA295129	SAMN04260440		NA
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	R551-3	1	4573969	complete	PRJNA224116	SAMN0623065	GCF_000020665.1	NA
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	R5G	79	4992669	draft	PRJNA329467	SAMN05413110		NA
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	RR-10	158	4660562	draft	PRJNA224116	SAMN02471024	GCF_000237025.1	22328769
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	SBo1	23	4800701	draft	PRJNA326914	SAMN05294119		NA
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	Y	SKA14	3	5020454	draft	PRJNA19369	SAMN02436221		NA
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	Sm32COP	45	4548960	draft	PRJNA323771	SAMN05188742		NA
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	SmF22	64	4583062	draft	PRJNA323842	SAMN05190064		NA
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	SmF3	77	4595297	draft	PRJNA323803	SAMN05189120		NA
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	SmSOFb1	93	4483386	draft	PRJNA323844	SAMN05190066		NA
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	stmalt0377	120	4620840	draft	PRJNA224116	SAMEA3138820	GCF_000499565.1	NA
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	Y	TD3	10	4917215	draft	PRJNA224116	SAMN05898096	GCF_001939825.1	NA
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	UV74	179	4889583	draft	PRJNA261822	SAMN03076212		26067959
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	N	WJ66	75	4657282	draft	PRJNA229185	SAMN03334939		25654114
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>nitritireducens</i>	Y	Leaf70	11	4032657	draft	PRJNA224116	SAMN04151613	GCF_001422025.1	26633631
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>nitritireducens</i>	N	2001	1	4541729	complete	PRJNA224116	SAMN05428703	GCF_001700965.1	NA
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>nitritireducens</i>	N	DSM_12575	95	3983487	draft	PRJNA284361	SAMN03701629		27014232
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>panacihumi</i>	N	JCM_16536	141	3923155	draft	PRJNA299448	SAMN04207867		27014232
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>pavanii</i>	N	DSM_25135	129	4313798	draft	PRJNA284376	SAMN03701690		27014232
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>pavanii</i>	N	LMG_25348	17	4424001	draft	PRJNA224116	SAMN04487784	GCF_900101175.1	NA
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>pictorum</i>	N	JCM_9942	829	3508292	draft	PRJNA299446	SAMN04207798	GCF_001310775.1	27014232
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>rhizophila</i>	N	DSM_14405	1	4648976	complete	PRJNA244760	SAMN02727981		NA
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>rhizophila</i>	N	QL-P4	1	4198652	complete	PRJNA326321	SAMN05276013		NA
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>sp.</i>	Y	SO28	297	3754755	draft	PRJNA224116	SAMN02469568	GCF_000295735.1	23144428
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>terrae</i>	Y	KCTC_12332	1	4541594	complete	PRJNA310387	SAMN04451766		NA
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>terrae</i>	N	DSM_18941	143	4410319	draft	PRJNA284366	SAMN03701677		27014232
<i>Xanthomonas</i>	<i>arboricola</i>	N	pvclebensis	3	4908017	draft	PRJNA254393	SAMN02903333		NA

<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	N	pvcitri_str306	3	5274174	complete	PRJNA297	SAMN02603846		12024217
<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	N	ATCC_33913	1	5076188	complete				12024217
<i>Xanthomonas</i>	<i>citri</i>	N	subspcitri	3	5222287	complete	PRJNA255042	SAMN02911839		25689023
<i>Xanthomonas</i>	<i>oryzae</i>	N	pvoryzae_PXO86	1	5016623	complete	PRJNA237250	SAMN02616002		NA
<i>Xanthomonas</i>	<i>oryzae</i>	N	pvoryzicola	1	4790622	complete	PRJNA280380	SAMN03612248		NA
<i>Xanthomonas</i>	<i>sacchari</i>	N		2	5006106	complete	PRJNA271115	SAMN03273272		NA

3. Supplementary code snippets, as examples on how to run a selection of the auxiliary scripts distributed in the GET_PHYLOMARKERS package.

1. Launch parallel IQ-TREE runs on all alignments with “fasta” extension name present in the current directory to find best-fitting model from the specified model set and then estimate the ML phylogeny using the -fast mode implemented in version 1.6.1. Estimate SH-rlrt branch support values during the search.

```
run_parallel_cmmnds.pl fasta 'iqtree -s $file -st DNA -mset
"HKY,TN,TVM,TIM,TIM2,TIM3,GTR" -m MFP -nt 1 -alrt 1000 -fast'
```

2. Parse the lnL scores of the gene-trees the lnL scores of the gene-trees found by IQ-TREE and write them to a file with tab-separated values format.

```
grep '^BEST SCORE' *log | sort -nrk5 | cut -d: -f1,3 | perl -pe 's/\h+/\t/; s/:/ /'
> sorted_IQT_lnL_mset_gene_trees.tsv
```

3. Launch parallel FastTree runs on all alignments with “fasta” extension name present in the current directory using default tree search intensity and parse the lnL scores of the resulting gene-trees.

```
run_parallel_cmmnds.pl fasta 'FastTree -nt -gtr -gamma -slow -slownni -spr 16
-sprlength 10 -log ${file%.*}_FT.log < $file > ${file%.*}_FTGTRG.ph'
```

```
grep '^Gamma20LogLk' *defFT.log | cut -f1,2 | sed 's/:Gamma20LogLk//; s/ /\t/' >
FT_lnL_defFT.tsv
```

4 Compute the average support values and Robinson-Foulds distances of gene trees to a species-tree

```
compute_suppValStas_and_RF-dist.R '/full/path/to/genetrees/' 1 fasta ph 1
```

5. Run multiple iqtree searches on the concatenated supermatrix using the best substitution model on multiple nodes by launching 50 subshels. (This was run on a 64 core server with 0.5 Tb of RAM).

```
for rep in {1..50}
do
  nohup nice iqtree -s concat_cdnAlns.fnainf -st DNA -m GTR+F+ASC+R6 -abayes -nt 1
  -pre abayes_run${rep} &> /dev/null &
done
```

6. Parse FastTree lnL scores and computation times from logfiles (multiple independent runs)

```
grep '^Gamma20LogLk' *FTGTRG_slow_slownni_spr110_spr10.log | cut -f1,2 | sed \
's/:Gamma20LogLk//; s/ /\t/' > FT_lnL_cdnAln_FTGTRG_slow_slownni_spr110_spr10.tsv
```

```
grep '^Total time:' *FTGTRG_slow_slownni_spr110_spr10.log | cut -d' ' -f3 \
> FT_total_wall_clock_seconds_cdnAln_FTGTRG_slow_slownni_spr110_spr10.tsv
```

7. Parse IQ-TREE lnL scores and computation times from logfiles

```
grep '^BEST SCORE' *log | sort -nrk5 | cut -d: -f1,3 | perl -pe 's/\h+/\t/; s:///'
> sorted_IQT_lnL_mset_gene_trees.tsv
```

```
grep '^BEST SCORE' *log | cut -d: -f1,3 | perl -pe 's/\h+/\t/; s:///' >
sorted_by_FILE_NAME_lnL_mset_gene_trees.tsv
```

```
grep 'Total wall-clock' *log | cut -d: -f1,3 | perl -pe 's/:\h+/\t/; s/\s+sec.*$/'
> total_wall_clock_seconds_IQT_mset_MFP.tsv
```

Supplementary References

Luz Edith Ochoa-Sanchez and Pablo Vinuesa (2017). Evolutionary genetic analysis uncovers multiple species with distinct habitat preferences and antibiotic resistance phenotypes in the *Stenotrophomonas maltophilia* complex. *Front. Microbiol.* 8: 1548. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01548> | [PubMed](#) PMID: [28861062](#).

Anexo 6. Lista de especies pertenecientes al género *Stenotrophomonas*

Especie de <i>Stenotrophomonas</i>	Fuente	Cita
<i>S. maltophilia</i>	Humano	(Palleroni and Bradbury 1993) (Denton and Kerr 1998b)
<i>S. africana</i> *	Humano (líquido cefalorraquídeo)	(DRANCOURT, BOLLET, and RAOULT 1997)
<i>S. nitritireducens</i>	Biofiltros de aguas residuales	(Finkmann, Altendorf, and Stackebrandt 2000)
<i>S. acidaminiphila</i>	Lodo de reactor anaeróbico	(Assih et al. 2002)
<i>S. rhizophila</i>	Rizosfera de papa	(Wolf et al. 2002)
<i>S. koreensis</i>	Composta de estiércol de vaca y paja de arroz.	(H. C. Yang et al. 2006)
<i>S. dokdonensis</i>	Suelo	(Yoon et al. 2006)
<i>S. humi</i>	Lodo de aguas residuales	(Heylen et al. 2007)
<i>S. terrae</i>	Lodo de aguas residuales	(Heylen et al. 2007)
<i>S. chelatiphaga</i>	Lodo de aguas residuales	(Kaparullina et al. 2009)
<i>S. ginsengisoli</i>	Suelo de cultivo de ginseng	(H. Bin Kim et al. 2010)
<i>S. daejeonensis</i>	Aguas residuales	(M. Lee et al. 2011)
<i>S. pavannii</i>	Tallos de caña de azúcar	(Ramos et al. 2011)
<i>S. tumulicola</i>	Pinturas de murales antiguos	Handa et al. 2016
<i>S. bentonitica</i>	Bentonita	(Sánchez-Castro et al. 2017)
<i>S. pictorum</i>	Suelo	Ouattara et al. 2017

****S. africana* se reclasificó como *S. maltophilia***

Anexo 7. Métodos de tipificación epidemiológica molecular utilizados en *Stenotrophomonas*

Técnica	Elemento genético	Aplicación	Cita
Métodos basados en fragmentos			
McRAPD	Todo el genoma	Moderado poder de discriminación y buen nivel de tipificación epidemiológica a nivel local.	(Nemec et al. 2011)
Rep-PCR (ERIC-PCR, BOX-PCR y REP-PCR)	Todo el genoma, especialmente en secuencias localizadas entre secuencias repetidas.	Identificación a nivel local y global de clonas y estudios de estructura de la población.	(Lin et al. 2008) (Gülmez and Hasçelik 2005)
PFGE	Todo el genoma	Excelente poder de discriminación y tipificación que es utilizada en investigación a escala local y global.	(Al-Jasser 2006) (Pompilio et al. 2011)
AFLP	Todo el genoma	Identificación de especies de <i>Stenotrophomonas</i>	(Hauben et al. 1999)
MLVA	Polimorfismo genético dentro de <i>loci</i> VNTR	Buen nivel de tipificación y moderado poder discriminatorio.	(Roschetto et al. 2008)
Métodos basados en secuenciación			
MLST	Polimorfismo en siete genes <i>housekeeping</i>	Excelente poder de discriminación y tipificación utilizado en investigación a nivel global y de estructura de la población.	(Kaiser, Biehler, and Jonas 2009)
RFLP y secuenciación de <i>gyrB</i>	Polimorfismo en un gen <i>housekeeping</i>	Buen poder discriminatorio y tipificación a nivel de especie.	(Svensson-Stadler, Mihaylova, and Moore 2012) (Coenye et al. 2004)

AFLP: Polimorfismo de longitud de fragmento amplificado; MLST: tipificación de secuencia de multilocus; MLVA: Análisis multi-locus de número variable de repeticiones en tándem; PFGE: electroforesis en gel de campo pulsado; McRAPD: curva de fusión de amplificación aleatoria de ADN; Rep-PCR: PCR basada en secuencias repetitivas; RFLP: polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción.

Anexo 8. Genómica comparada del género *Stenotrophomonas*

Actividad	Compuesto o actividad	Gene, locus tag, proteína o compuesto	Cepa	Origen	Referencia
Degradación de xenobióticos	17β-estradiol ^[SEP]	ND	<i>S. maltophilia</i> ZL1	Lodo activo	(Z. Li et al. 2012)
	Endosulfan	ND	<i>S. maltophilia</i>	Suelo contaminado	(K. Kumar et al. 2007)
	DDT	ND	<i>S. maltophilia</i>	Rizosfera	(Barragán-Huerta et al. 2007)
	DDT	ND	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Suelo contaminado con pesticida	(Mwangi et al. 2010)
	Tricloroetileno	<i>tce300</i> y <i>tce350</i>	<i>S. maltophilia</i> PM102	Suelo industrial	(Mukherjee and Roy 2013)
	Clorpirifos	<i>Mpd</i>	<i>S. maltophilia</i> MHF ENV20	Rizosfera	(Dubey y Fulekar, 2012)
	Colorantes	<i>Copa</i>	<i>S. maltophilia</i> AAP56	Suelo	(Galai, Limam, and Marzouki 2009)
	Fenantreno	ND	<i>S. maltophilia</i> C-6	Suelo contaminado	(Gao et al. 2013)
	Queratina	Serina proteasa y disulfuro reductasa	<i>Stenotrophomonas</i> sp D-1	Piel de venado	(Yamamura et al. 2002)
	RDX	ND	<i>S. maltophilia</i> PB1	Suelo contaminado	(Binks, Nicklin, and Bruce 1995)
	Geosmina	ND	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Carbono biológicamente activo	(Zhou et al., 2011)
	Atrazina	<i>atzA, atzB, atzC</i> y <i>trzD</i>	<i>S. maltophilia</i>	Suelo de cultivos	(Rousseaux, Hartmann, and Soulas 2001)
	<i>p</i> -nitrofenol	ND	<i>Stenotrophomonas</i> sp LZ-1	Lodo activado	(Edwards, Liu, and Pearl 2007)
	Hidrocarburos monocíclicos	Dioxigenasa	<i>S. maltophilia</i> KB2	Lodo activado	(Urszula et al. 2009)
Biorremediación de metales pesados	Cr	<i>Stmr_2019</i>	<i>S. maltophilia</i> R551-3	Rizosfera	(Ryan et al. 2009)
	Cu	ND	<i>S. maltophilia</i> PD2	Suelo contaminado	(Ghosh and Saha 2013)
	Cu	<i>Stmr_3152-54</i>	<i>S. maltophilia</i> R551-3	Rizosfera	(Ryan et al., 2009)
	Ar	<i>Stmr_2020-2024</i>	<i>S. maltophilia</i> R551-3	Rizosfera	(Ryan et al., 2009)
	Te	<i>Stmr_2893-94</i>	<i>S. maltophilia</i> R551-3	Rizosfera	(Ryan et al., 2009)
	Se	Glutatión reductasa	<i>S. maltophilia</i> SeITE02	Suelo contaminado	(Antonioli et al. 2007)
	Pb, Zn y Ni	ND	<i>S. maltophilia</i>	Planta de tratamiento de aguas residuales	(Wierzba 2015)

Anexo 8. Genómica comparada del género *Stenotrophomonas*

Actividad	Compuesto o actividad	Gene, locus tag, proteína o compuesto	Cepa	Origen	Referencia
Biocontrol	Larvicida	Biosurfactante	<i>S. maltophilia</i>	Suelo contaminado	(Deepali, Sneha, and Sucheta 2014)
	Antifúngico	Quitinasa, proteasa	<i>S. maltophilia</i> PB3533	Rizosfera	(Messiha et al. 2007)
	Antifúngico	Quitinasa, proteasa	<i>S. maltophilia</i> W81	Rizosfera	(Dunne et al. 2017)
	Antifúngico	Xhantobaccina A, B y C	<i>Stenotrophomonas</i> sp. SB-K88	Rizosfera	(Nakayama et al. 1999)
	Antifúngico	ND	<i>S. maltophilia</i>	Raíz	(Kwok et al. 1987)
	Antifúngico	ND	<i>S. maltophilia</i>	Rizosfera	(Lambert et al. 1987)
	Antifúngico	Maltopilina	<i>S. maltophilia</i> R3089	Rizosfera	(Jakobi et al. 1996)
	Antifúngico	Enzimas líticas	<i>S. maltophilia</i>	Rizosfera	(Berg, Marten, and Ballin 1996)
	Antifúngico	Quitinasa	<i>S. maltophilia</i> MUJ	Rizosfera	(Jankiewicz, Brzezinska, and Saks 2012)
Promoción del crecimiento de plantas	Antimicrobiano	ND	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Esponja y erizo de mar	(Romanenko et al. 2008)
	Fitohormona	IAA	<i>S. maltophilia</i> AVP27	Rizosfera	(N. P. Kumar and Audipudi 2015)
	Fitohormona	IAA, ácido giberélico, ácido abscísico	<i>S. maltophilia</i> SSA	Raíz	(Naz and Bano 2012)
	Antioxidante	Flavonoides y Isoflavonoides	<i>S. maltophilia</i> N5.18	Rizosfera	(Algar et al. 2013)
Catálisis	Hidrólisis de zeína	Serina proteasa alcalina	<i>S. maltophilia</i> S-1	Suelo	(Miyaji et al. 2005)
	Sustratos con hidroxiprolina	Dipeptidil aminopeptidasa IV	<i>S. maltophilia</i> DPIV	ND	(Nakajima et al. 2008)
	Monooxigenasa	Flavoproteína clase B	<i>S. maltophilia</i> PML169	Mar	(Willettts et al. 2012)
Resistencia a antibióticos	Estreptomicina	<i>Smlt2336</i>	<i>S. maltophilia</i> K279a	Humano	(Ryan et al. 2009)
	Espectinomicina	<i>Smlt2125</i>	<i>S. maltophilia</i> K279a	Humano	(Ryan et al., 2009)
	Aminoglucósidos	<i>Smlt0191</i> <i>Smlt1669</i> <i>Smlt2120</i> <i>Smlt2336</i> <i>Smlt3615</i>	<i>S. maltophilia</i> K279a	Humano	(Ryan et al., 2009)
	Cloranfenicol	<i>cat</i>	<i>S. maltophilia</i> K279a	Humano	(Ryan et al., 2009)
	Fluoroquinolona	<i>qnrB</i>	<i>S. maltophilia</i> K279a	Humano	(Ryan et al., 2009)
	Macrólidos	<i>Smlt0032</i> <i>Smlt1537-9</i> <i>Smlt2642-3</i>	<i>S. maltophilia</i> K279a	Humano	(Ryan et al., 2009)
	β-lactámicos	<i>blaL1-blaL2</i>	<i>S. maltophilia</i> K279a	Humano	(Ryan et al., 2009)

Anexo 9. Lista de especies de *Acinetobacter* que han sido reportadas y fueron identificadas en nuestro estudio

Especie de <i>Acinetobacter</i>	Fuente ambiental	Cita
<i>A. tandoii</i>	Lodo activado	(Carr et al. 2003)
<i>A. schindleri</i>	Humano	(Nemec et al. 2001)
<i>A. johnsonii</i>	Humano, gallina, agua y ratón	(Bouvet and Grimont 1986)
<i>A. bereziniae</i>	Humano, conejo	(Nemec et al. 2010)
<i>A. soli</i>	Suelo forestal	(D. Kim et al. 2008)
<i>A. baumannii</i>	Humano	(Bouvet and Grimont 1986)
<i>A. pittii</i>	Humano	(Nemec et al. 2011)
<i>A. oleivorans</i>	Suelo de arroz	(Kang et al. 2011)
<i>A. junii</i>	Humano	(Bouvet and Grimont 1986)
<i>A. beijerinckii</i>	Humano	(Nemec et al. 2009)
<i>A. lactucae</i>	Lechuga	(Rooney, Dunlap, and Flor-Weiler 2016)

Anexo 10. Métodos de tipificación epidemiológica molecular que se han utilizado en *Acinetobacter*

Técnica	Elemento genético	Aplicación	Cita
Métodos basados en fragmentos			
Esquema de tipificación de replicones por PCR	Plásmido	Determinación del pan plasmidoma de <i>Acinetobacter</i> , plásmidos circulantes y evolución de los genes de resistencia.	(Bertini et al. 2010)
RAPD	Todo el genoma	Identificación epidemiológica a nivel local.	(Grundmann et al. 1997)
Rep-PCR	Todo el genoma, especialmente en secuencias localizadas entre secuencias repetidas.	Identificación a nivel local y global de la clona y estudios de estructura de la población.	(Reboli et al. 1994) (Higgins et al. 2009)
Ribotyping	rDNA y región flanqueante	Identificación del complejo <i>A. baumannii</i> , clona y en menor medida a nivel de cepa epidémica.	(Nemec et al. 2004) (Dijkshoorn et al. 1996)
PFGE	Todo el genoma	Investigación a escala local y global.	(Harald Seifert et al. 2005)
AFLP	Todo el genoma	Identificación de especies de <i>Acinetobacter</i> , epidemiología a nivel molecular	(Nemec et al. 2004)
MLVA	Polimorfismo genético dentro de <i>loci</i> VNTR	Tipificación epidemiológica a nivel de cepas estrechamente relacionadas	(Pourcel et al. 2011) (Turton et al. 2009) (Hauck et al. 2012) (Hu et al. 2013)
Métodos basados en secuenciación			
SLST	Polimorfismo en la secuencia de un <i>locus</i> (<i>adeB</i> , <i>rpoB</i> , <i>recA</i> , <i>bla_{OXA-51-like}</i>)	Tipificación preliminar y asignación de aislados a clonas establecidas internacionalmente.	(Villalón et al. 2011) (Huys, Cnockaert, Nemec, et al. 2005) (Scola et al. 2006) (Turton et al. 2007)
3-LSD	Polimorfismo en tres <i>loci</i> (<i>ompA</i> , <i>csuE</i> , <i>bla_{OXA-51}</i>)	Estudios de estructura de la población	
MLST	Polimorfismo en siete genes housekeeping	Estructura de la población	(Diancourt et al. 2010) (Bartual et al. 2005)
PCR-ESI/MS	Polimorfismo en nueve fragmentos internos de seis genes housekeeping	Identificación y genotipificación a nivel de clona y en menor medida a nivel de cepa, estudios de estructura de la población y determinación de resistencia a antibióticos.	(Ecker et al. 2006)

3-LST: tipificación de secuencia de 3 locus; AFLP: Polimorfismo en la longitud del fragmento amplificado; MLST: tipificación de secuencia de multilocus; MLVA: Análisis multi-locus de número variable de repeticiones en tándem; PCR / ESI-MS: espectrometría de masas por ionización por electropulverización / PCR Multilocus; PFGE: electroforesis en gel de campo pulsado; RAPD: amplificación aleatoria de ADN; Rep-PCR: PCR basada en secuencias repetitivas; SLST: mecanografía basada en secuencias de un solo locus; VNTR: repetición en tándem de número variable.

Anexo 11. Genómica comparado del género *Acinetobacter*

Función	Compuesto o actividad	Gene o proteína	Cepa	Origen	Referencia
Degradación de xenobióticos	Poliacrilamida	ND	<i>Acinetobacter</i> sp. 11	Suelo	(Matsuoka et al. 2002)
	QACs	ND	<i>Acinetobacter</i> spp.	Aguas residuales	(Al-Ahmad et al. 2000)
	Fenol	ND	<i>Acinetobacter</i> sp. W-17	Aguas residuales	(Beshay et al. 2002)
	Ketoadipato	<i>pcaH</i>	<i>Acinetobacter</i> sp	Marisma	(Buchan, Neidle, and Moran 2001)
	Tolueno	ND	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1	Suelo	(Chamanrokh et al. 2008)
	Diesel	ND	<i>Acinetobacter</i> sp.	Suelo	(Gallego et al. 2001)
	Colorantes	Lignina peroxidasa	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> NCIM	NCIM	(Ghodake et al. 2009)
	Hexadecano	ND	<i>Acinetobacter</i> sp	Suelo	(Gomez et al. 2011)
	Anilina	<i>catRBCAD</i>	<i>Acinetobacter iwoffii</i> K24	Suelo	(S. Il Kim, Yoo, and Kahng 2001)
	Aceite mineral	ND	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> TM-31	Agua	(Pleshakova, Muratova, and Turkovskaya 2001)
	Benceno	Alcalin lipasa	<i>Acinetobacter baylyi</i>	Lodo	(Uttatree, Winayanuwattikun, and Charoenpanich 2010)
	Fenol	<i>mphKLMNOP</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> PHEA-2	Agua	(Xu et al. 2003)
	Benzoato	<i>benMABCDEKP</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> PHEA-2	Suelo	(Zhan et al. 2008)
Resistencia a metales pesados	Co, Cu, Hg, Zn, Cd, Cr, Bi, Ag, As, Sb, Mo, Se, W, Sn, Ni, Li, Al.	ND	<i>Acinetobacter genoespecie3</i>	Suelo	(Dhakephalkar and Chopade 1994)
	Ag	Lignina peroxidasa	<i>Acinetobacter</i> sp MCC 3391	Rizosfera	(Singh et al. 2017)
Promoción del crecimiento de plantas	IAA	ND	<i>Acinetobacter</i> spp	Suelo	(Kuklinsky-Sobral et al. 2004)
	Aumento de biomasa	ND	<i>Acinetobacter baumannii</i> CD-1	Suelo	(Dursun, EkInci, and Dönmez 2010)

Anexo 11. Genómica comparado del género *Acinetobacter*

Función	Compuesto o actividad	Gene o proteína	Cepa	Origen	Referencia
Catálisis	Ethapolan	ND	<i>Acinetobacter</i> sp IMV B-7005	Suelo	(Pirog, Vysyatetskaya, and Korzh 2007)
	Ethapolan	ND	<i>Acinetobacter</i> sp 12S	Suelo	(Pirog, Kovalenko, and Kuz 2002)
	Cianoficina	CphA	<i>Acinetobacter</i> sp ADPI	DSMZ	(Krehenbrink, Oppermann-Sanio, and Steinbüchel 2002)
	Microdiesel	Acetiltransferasa	<i>Acinetobacte baylyi</i> ADPI	Suelo	(Kalscheuer, Stölting, and Steinbüchel 2006)
	Emulsan	ND	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1	Suelo	(Johri, Blank, and Kaplan 2002) (Chamanrokh et al. 2008)
	Lipasa	Alcalin lipasa	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Lodo de aguas residuales	(C. Y. Li et al. 2005)
	Lipasa	Alcalin lipasa	<i>Acinetobacter</i> sp ES-1	Lodo activo	(K. W. Lee et al. 2006)
	Lipasa	Alcalin lipasa	<i>Acinetobacter hemolyticus</i>	Suelo	(Jagtap et al. 2010)
	Lipasa	Alcalin lipasa	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Lodo de aguas residuales	(Chen, Cheng, and Chen 1998)
	Biosurfactante	ND	<i>Acinetobacter</i> spp	Mar	(Satpute et al. 2008)
Biosurfactante	ND	<i>Acinetobacter johnsonii</i> O2F	Pez	(Floris et al. 2018)	
Resistencia a antibióticos	Penicilina, Ampicilina, Carbemecilina, Cloxacilina, Amoxicilina, Cefaloridina, Cefazolina, Estreptomina, Kanamicina, Gentamicina, Cloranfenicol.	ND	<i>Acinetobacter genoespecie3</i>	Suelo	(Dhakephalkar and Chopade 1994)
	Meropenem	<i>bla_{oxa-40}</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> ACB20	Humano	(Lolans et al. 2006)
	Oxitetraciclina	<i>tet(39)</i>	<i>Acinetobacter</i> spp	Sedimentos de agua	(Agersø and Petersen 2007)
	Sulfametoxazol	<i>sull, sulll</i>	<i>Acinetobacter</i> spp	Estiércol de pollo	(Agersø and Petersen 2007)
	Ceftazidima	<i>ampC</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> *	Humano	(Corvec et al. 2003)
	Ciprofloxacino, Cefepime, Imipenem, Meropenem, Cefoperazona/sulbactam, Netelmicina.	ND	<i>Acinetobacter baumannii</i> *	Humano	(Dizbay et al. 2008)
	Oxitetraciclina, Cloranfenicol, Sulfametoxazol, Gentamicina, Ciprofloxacino, Amoxicilina	ND	<i>Acinetobacter</i> spp	Agua	(Luca Guardabassi, Petersen, and Olsen 1998)
	Tetraciclina	<i>tetA, tetB</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> *	Humano	(L. Guardabassi et al. 2000)
Tetraciclina	<i>tetA, tetB, tetM</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> *	Humano	(Huys, Cnockaert, Vaneechoutte, et al. 2005)	

Anexo 11. Genómica comparado del género *Acinetobacter*

Función	Compuesto o actividad	Gene o proteína	Cepa	Origen	Referencia
---------	-----------------------	-----------------	------	--------	------------

Resistencia a antibióticos	Carbapenemicos	<i>bla_{OXA-40}</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> *	Humano	(Lolans et al. 2006)
	Penicilina, Ampicilina, Carbenicilina, Cloxacilina, Amoxicilina, Cefaloridina, Cefazolina, Estreptomina, Kanamicina, Gentamicina, Cloranfenicol.	ND	<i>Acinetobacter genoespecie3</i>	Suelo	(Dhakephalkar and Chopade 1994)
	Trimetoprim	<i>dfrA7</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> *	Humano	(Segal, Thomas, and Elisha 2003)
	Aminoglucósidos	<i>aac(3)-IIa</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> *	Humano	(Segal, Thomas, and Elisha 2003)
	Amoxicilina, Gentamicina, Ciprofloxacina, Ticarcilina, Cefalotina.	ND	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Agua	(Tahrani et al. 2018)

• Varios aislados; Ag: Plata; Al: Aluminio; As: Arsénico; B: Boro; Bi: Bismuto; Cd: Cadmio; Cr: Cromo; Co, Cobalto; Cu: Cobre; DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; Hg: Mercurio; IAA: Ácido indolacético Li: Litio; Mo: Molibdeno; NCIM: National Collection of Industrial Microorganisms ND: no definido; Ni: Níquel; QACs: compuestos cuaternarios de amonio; Sb: Antimonio; Se: Selenio; Sn: Estaño; W: Volfrabio y Zn:

Anexo 12. Oligonucleótidos utilizados en este estudio

Stenotrophomonas			
<i>Oligonucleótido</i>	Secuencia	TM (°C)	Referencia
<i>atpD Fw</i>	5'-ATGAGTCAGGGCAAGATCGTTC-3'	56	Kaiser S. et al., 2009.
<i>atpD Rv</i>	5'-TCCTGCAGGACGCCCATTTTC-3'	56	Kaiser S. et al., 2009.
<i>gapA Fw</i>	5'-TGGCAATCAAGGTTGGTATCAAC-3'	56	Kaiser S. et al., 2009.
<i>gapA Rv</i>	5'-TTCGCTCTGTGCCTTCACTTC-3'	56	Kaiser S. et al., 2009.
<i>ppsA Fw</i>	5'-CAAGGCGATCCGCATGGTGTATTC-3'	62	Kaiser S. et al., 2009.
<i>ppsA Rv</i>	5'-CCTTCGTAGATGAARCCGGTRTC-3'	62	Kaiser S. et al., 2009.
<i>recA Fw</i>	5'-ATGGACGAGAACAAGAAGCGC-3'	56	Kaiser S. et al., 2009.
<i>recA Rv</i>	5'-GGTGATGACCTGCTTGAACGG-3'	56	Kaiser S. et al., 2009.
<i>guaA Fw</i>	5'-AACGAAGAAAAGCGCTGGTA-3'	56	Kaiser S. et al., 2009.
<i>guaA Rv</i>	5'-ACGGATGGCGGTAGACCAT-3'	56	Kaiser S. et al., 2009.
<i>nuoD Fw</i>	5'-TTCGACACTACCCATGAAC-3'	48	Kaiser S. et al., 2009.
<i>nuoD Rv</i>	5'-CAGCGCGACTCCTTGTACTT-3'	48	Kaiser S. et al., 2009.
<i>mutM Fw</i>	5'-YTDCCCGAAGTMGAAACYAC-3'	56	En este estudio
<i>mutM Rv</i>	5'-GCAGYTCCTGYTCGAARTARCC-3'	56	En este estudio
Acinetobacter			
<i>Oligonucleótido</i>	Secuencia	TM (°C)	Referencia
<i>atpD Fw</i>	5'-ACTCGTGAAGGTAAYGAYTTCTA-3'	55	En este estudio
<i>atpD Rv</i>	5'-GACCTTTAAAGCACAGRATNGT-3'	55	En este estudio
<i>fusA Fw</i>	5'-TTTAGAACGTATGGAATCCCDGA-3'	55	En este estudio
<i>fusA Rv</i>	5'-TTTAGAACGTATGGAATCCCDGA-3'	55	En este estudio
<i>infB Fw</i>	5'-TTGAAGAAATGGNCAYMAYCC-3'	55	En este estudio
<i>infB Rv</i>	5'-TCACCACCCCAYSYTCWGC-3'	55	En este estudio
<i>recA Fw</i>	5'-ATGTCAAATTGAAAARCARTTYGG-3'	55	En este estudio
<i>recA Rv</i>	5'-AATTTTCATACGAATYGGTTRAT-3'	55	En este estudio
<i>gyrB Fw</i>	5'-TTGGTCGTCAAGARTAYAAYCC-3'	50	En este estudio
<i>gyrB Rv</i>	5'-CATCATCACCCATBARRCA-3'	50	En este estudio
<i>rpoC Fw</i>	5'-GCAGCAATTAAGARTTYTTGG-3'	55	En este estudio
<i>rpoC Rv</i>	5'-GTTATAACCATTCCANGTCATRA-3'	55	En este estudio

Anexo 12. Oligonucleótidos utilizados en este estudio

Gen blanco o región	Oligos (5'-3')	Producto de PCR esperado (bp)	Referencia
bla-VIM	VIM-F- GTGTTTGGTCGCATATCGC	380	(Garza-Ramos et al. 2009)
	VIM-R-CGAGCACCAGGATAGAAG		
bla-GIM	GIM-F-TGTAGCGTTGCCAGCTTTAG	633	(Garza-Ramos et al. 2009)
	GIM-R-TTCCAACCTTGCCATGCCCC		
bla-IMP	IMP-F-GGAATAGAGTGGCTTAATTC	271	(Garza-Ramos et al. 2009)
	IMP-R-GCCAAGCTTCTATATTTGCG		
bla-SPM	SPM-F-AACTCACCTAAATCGAGAGGC	818	(Garza-Ramos et al. 2009)
	SPM-R-TACAGTTCTATTTCCCAAC		
bla-KPC	KPC-F-CTGTCTTGCTCTCATGGCC	796	(Naas et al. 2008)
	KPC-R-CCTCGCTGTGCTTGTCATCC		
bla-GES	GES-F-CTTCATTCACGCACTATTAC	827	(Wachino et al. 2004)
	GES-R-TAACTTGACCGACAGAGG		
5CS'	5CS-GGCATCCAAGCAGCAAG		(Levesque et al. 1995)
3CS'	3CS-AAGCAGACTTGACCTGA		(Levesque et al. 1995)
Int1/HS463a	CTGGATTCGATCACGGCACG		(Stokes et al. 2006)
Int1/HS464	ACATGCGTGTAATCATCGTCG		(Stokes et al. 2006)

Anexo 13. Recetas de medios utilizados en este estudio

Medio NAA *Pseudomonas*

Solución Winogradsky (3 soluciones) (1L)

- | | | |
|----|---------------------------------|---------|
| 1) | K ₂ HPO ₄ | 0.8 g |
| 2) | MgSO ₄ | 0.26 g |
| 3) | MnSO ₄ | 3.04 mg |
| 4) | NH ₄ NO ₃ | 1 g |

Medio base (1 L)

- | | | |
|----|---------------------------------|--------|
| 1) | N-lauroyl sarcosine sodium salt | 1.2 g |
| 2) | Agar noble | 18 g |
| 3) | Casaminoácidos | 5 g |
| 4) | H ₂ O destilada | 550 ml |

*Mezclar las soluciones con medio base a temperaturas bajas (puede causar precipitaciones a temperaturas altas).

Adicionar 150 ml de cada solución para 1L de medio.

Medio Simmons-Citrato

- | | | |
|---|--|--------|
| 1 | K ₂ HPO ₄ | 1 g |
| 2 | NaCl | 5 g |
| 3 | Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ | 2 g |
| 4 | MgSO ₄ | 0.2 g |
| 5 | Azul bromotimol | 0.08 g |
| 6 | Inositol | 1.5 % |

Anexo 14. Metodología de extracción de plásmidos (Kieser et al., 1984)

Solución I	
Sacarosa 1M	15ml
Tris-HCL 1M pH 8	1.25ml
EDTA 0.5M pH8	2.5ml
H2O	31.25ml
Volumen final	50ml

Solución II	
NaOH 5M	300ul
SDS 10%	1.0ml
H2O	3.7ml
Volumen final	5ml

- 1.- Cultivar en overnight a 37°C medio LB
- 2.- Alicuotar centrifugando a 14, 000rpm por 3 minutos
- 3.- Adicionar 400ul de Solución I. Mezclar en vortex
- 4.- Adicionar 100ul de lisozima preparada (10mg/ml). Mezclar muy suavemente por inmersión
- 5.- Incubar 30 minutos en hielo
- 6.- Adicionar 250u de solución II. Mezclar suavemente por inmersión
- 7.- Incubar 30 minutos a 55°C, posteriormente enfriar en agua
- 8.- Agregar 80ul de fenol-cloroformo. Mezclar con vortex
- 9.- Centrifugar a 14, 000rpm a 4°C por 20 minutos. Guardar 450ml de sobrenadante
- 10.- Cargar en agarosa 0.7% Buffer TBE 1X, 6 horas (80V)

10. Bibliografía

- Aagot, Nina, Ole Nybroe, Preben Nielsen, and Kaare Johnsen. 2001. "An Altered Pseudomonas Diversity Is Recovered from Soil by Using Nutrient-Poor Pseudomonas-Selective Soil Extract Media." *Applied and Environmental Microbiology* 67 (3–12): 5233–39. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.11.5233-5239.2001>.
- Agersø, Yvonne, and Andreas Petersen. 2007. "The Tetracycline Resistance Determinant Tet 39 and the Sulphonamide Resistance Gene SullI Are Common among Resistant Acinetobacter Spp. Isolated from Integrated Fish Farms in Thailand." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59 (1): 23–27. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl419>.
- Al-Ahmad, A., M. Wiedmann-Al-Ahmad, G. Schön, F. D. Daschner, and K. Kümmerer. 2000. "Role of Acinetobacter for Biodegradability of Quaternary Ammonium Compounds." *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 64 (6): 764–70. <https://doi.org/10.1007/s001280000069>.
- Al-Jasser, Asma Marzouq. 2006. "Stenotrophomonas Maltophilia Resistant to Trimethoprim – Sulfamethoxazole: An Increasing Problem." *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 5: 23. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-5-Received>.
- Algar, Elena, Beatriz Ramos-Solano, Ana García-Villaraco, M. Dolores Saco Sierra, M. Soledad Martín Gómez, and F. Javier Gutiérrez-Mañero. 2013. "Bacterial Bioeffectors Modify Bioactive Profile and Increase Isoflavone Content in Soybean Sprouts (Glycine Max Var Osumi)." *Plant Foods for Human Nutrition* 68 (3): 299–305. <https://doi.org/10.1007/s11130-013-0373-x>.
- Antonoli, Paolo, Silvia Lampis, Irene Chesini, Giovanni Vallini, Sara Rinalducci, Lello Zolla, and Pier Giorgio Righetti. 2007. "Stenotrophomonas Maltophilia SeITE02, a New Bacterial Strain Suitable for Bioremediation of Selenite-Contaminated Environmental Matrices." *Applied and Environmental Microbiology* 73 (21): 6854–63. <https://doi.org/10.1128/AEM.00957-07>.
- Antunes, Luísa C.S., Francesco Imperi, Alessandra Carattoli, and Paolo Visca. 2011. "Deciphering the Multifactorial Nature of Acinetobacter Baumannii Pathogenicity." *PLoS ONE* 6 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022674>.
- Arias-Flores, Rafael, Ulises Rosado-Quiab, Alfredo Vargas-Valerio, and Concepción Grajales-Muñiz. 2016. "Los Microorganismos Causantes de Infecciones Nosocomiales En El Instituto Mexicano Del Seguro Social." *Microorganisms Responsible of Nosocomial Infections in the Instituto Mexicano Del Seguro Social*. 54 (1): 20–24. <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=112752580&lang=es&site=ehost-live>.
- Arocha-Garza, Hector Fernando, Ricardo Canales-Del Castillo, Luis E. Eguiarte, Valeria Souza, and Susana De la Torre-Zavala. 2017. "High Diversity and Suggested Endemicity of Culturable Actinobacteria in an Extremely Oligotrophic Desert Oasis." *PeerJ* 5: e3247. <https://doi.org/10.7717/peerj.3247>.
- Assih, Essokazi A., Aboubakar S. Ouattara, Sébastien Thierry, Jean Luc Cayol, Marc Labat, and Hervé Macarie. 2002. "Stenotrophomonas Acidaminiphila Sp. Nov., a Strictly Aerobic Bacterium Isolated from an Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) Reactor." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52 (2): 559–68. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-2-559>.
- Bankevich, Anton, Sergey Nurk, Dmitry Antipov, Alexey A Gurevich, Mikhail Dvorkin, Alexander S Kulikov, Valery M Lesin, et al. 2012. "SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing." *JOURNAL OF COMPUTATIONAL BIOLOGY* 19 (5): 455–77. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>.
- Baquero, Fernando, José Luis Martínez, and Rafael Cantón. 2008. "Antibiotics and Antibiotic Resistance in Water Environments." *Current Opinion in Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.05.006>.
- Barbolla R, Catalano M, Orman BE, Famiglietti A, Vay C, Smayevsky J, et al. 2004. "Class 1 Integrons Increase Trimethoprim-Sulphamethaxazole MICs against Epidemiologically Unrelated Stenotrophomonas Maltophilia." *Antimicrob Agents Chemother* 48 (2): 666–669. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.2.666>.
- Baron, Sophie, Gregory Dubourg, and Jean Marc Rolain. 2018. "Isolation of Acinetobacter Junii Strain Carrying BlaOXA-58 from a Rectal Swab, Marseille, France." *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 12. Taibah University: 61–62. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.12.002>.
- Barragán-Huerta, B. E., C. Costa-Pérez, J. Peralta-Cruz, J. Barrera-Cortés, F. Esparza-García, and R. Rodríguez-Vázquez. 2007. "Biodegradation of Organochlorine Pesticides by Bacteria Grown in Microniches of the Porous Structure of Green Bean Coffee." *International Biodeterioration and Biodegradation* 59 (3 SPEC. ISS.): 239–44.

<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.11.001>.

- Bartoloni, Alessandro, Lucia Pallecchi, Costanza Fiorelli, Tiziana Di Maggio, Connie Fernandez, Ana Liz Villagran, Antonia Mantella, et al. 2008. "Increasing Resistance in Commensal Escherichia Coli, Bolivia and Peru [2]." *Emerging Infectious Diseases* 14 (2): 338–40. <https://doi.org/10.3201/eid1402.070138>.
- Bartoloni, Alessandro, Lucia Pallecchi, Hugo Rodríguez, Connie Fernandez, Antonia Mantella, Filippo Bartalesi, Marianne Strohmeyer, et al. 2009. "Antibiotic Resistance in a Very Remote Amazonas Community." *International Journal of Antimicrobial Agents* 33 (2): 125–29. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.07.029>.
- Bartual, Sergio G, Harald Seifert, Corinna Hippler, Francisco Rodríguez-valera, and M Angeles Domi. 2005. "Development of a Multilocus Sequence Typing Scheme for Characterization of Clinical Isolates of Acinetobacter Baumannii Development of a Multilocus Sequence Typing Scheme for Characterization of Clinical Isolates of Acinetobacter Baumannii." *Journal of Clinical Microbiology* 43 (9): 4382–90. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.9.4382>.
- Baumann, Paul. 1968. "Isolation of *Acinetobacter* from Soil and Water." *Journal of Bacteriology* 96 (1): 39–42. <http://jb.asm.org/content/96/1/39.short>.
- Berardinis, Véronique de, Maxime Durot, Jean Weissenbach, and Marcel Salanoubat. 2009. "Acinetobacter Baylyi ADP1 as a Model for Metabolic System Biology." *Current Opinion in Microbiology* 12 (5): 568–76. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.07.005>.
- Berg, Gabriele, Petra Marten, and Günter Ballin. 1996. "Stenotrophomonas Maltophilia in the Rhizosphere of Oilseed Rape - Occurrence, Characterization and Interaction with Phytopathogenic Fungi." *Microbiological Research* 151 (1): 19–27. [https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(96\)80051-6](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(96)80051-6).
- Berg, Gabriele, and Jose L. Martinez. 2015. "Friends or Foes: Can We Make a Distinction between Beneficial and Harmful Strains of the Stenotrophomonas Maltophilia Complex?" *Frontiers in Microbiology* 6 (MAR): 1–6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00241>.
- Bertini, Alessia, Laurent Poirel, Pauline D Mugnier, Laura Villa, Patrice Nordmann, and Alessandra Carattoli. 2010. "Characterization and PCR-Based Replicon Typing of Resistance Plasmids in Acinetobacter Baumannii." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (10): 4168–77. <https://doi.org/10.1128/AAC.00542-10>.
- Beshay, Usama, Desouky Abd-El-Haleem, Hassan Moawad, and Sahar Zaki. 2002. "Phenol Biodegradation by Free and Immobilized Acinetobacter." *Biotechnology Letters* 24 (15): 1295–97. <https://doi.org/10.1023/A:1016222328138>.
- Binks, P. R., S. Nicklin, and N. C. Bruce. 1995. "Degradation of Hexahydro-1,3,5-Trinitro-1,3,5-Triazine (RDX) by Stenotrophomonas Maltophilia PB1." *Applied and Environmental Microbiology* 61 (4): 1318–22.
- Boucher, Helen W., George H. Talbot, John S. Bradley, John E. Edwards, David Gilbert, Louis B. Rice, Michael Scheld, Brad Spellberg, and John Bartlett. 2009. "Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America." *Clinical Infectious Diseases* 48 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1086/595011>.
- Bouvet, P. J. M., and P. A. D. Grimont. 1986. "Taxonomy of the Genus Acinetobacter with the Recognition of Acinetobacter Baumannii Sp. Nov., Acinetobacter Haemolyticus Sp. Nov., Acinetobacter Johnsonii Sp. Nov., and Acinetobacter Junii Sp. Nov. and Emended Descriptions of Acinetobacter Calcoaceticus A." *International Journal of Systematic Bacteriology* 36 (2): 228–40. <https://doi.org/10.1099/00207713-36-2-228>.
- Brisou, J, and A R Prevot. 1954. "Etudes de Systematique Bacterienne. 10. Revision Des Espèces Reunies Dans Le Genre Acrhomobacter." In *Annales De L Institut Pasteur*, 86:722–28. MASSON EDITEUR 21 STREET CAMILLE DESMOULINS, ISSY, 92789 MOULINEAUX CEDEX 9
- Brooke, Joanna S. 2012. "Stenotrophomonas Maltophilia: An Emerging Global Opportunistic Pathogen." *Clinical Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1128/CMR.00019-11>.
- Brooke, Joanna S. 2014. "New Strategies against Stenotrophomonas Maltophilia: A Serious Worldwide Intrinsically Drug-Resistant Opportunistic Pathogen." *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 12 (1): 1–4. <https://doi.org/10.1586/14787210.2014.864553>.
- Brovedan, Marco, Patricia M. Marchiaro, Jorgelina Morán-Barrio, Santiago Revale, Marcela Cameranesi, Luciano Brambilla, Alejandro M. Viale, and Adriana S. Limansky. 2016. "Draft Genome Sequence of Acinetobacter Bereziniiae HPC229, a Carbapenem-Resistant Clinical Strain from Argentina Harboring *Bla*_{NDM-1}." *Genome Announcements* 4 (2): e00117-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00117-16>.

- Buchan, Alison, Ellen L. Neidle, and Mary Ann Moran. 2001. "Diversity of the Ring-Cleaving Dioxygenase Gene PcaH in a Salt Marsh Bacterial Community." *Applied and Environmental Microbiology* 67 (12): 5801–9. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.12.5801-5809.2001>.
- Bush, Karen, and George A. Jacoby. 2010. "Updated Functional Classification of β -Lactamases." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (3): 969–76. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>.
- Cadillo-Quiroz, Hinsby, Xavier Didelot, Nicole L. Held, Alfa Herrera, Aaron Darling, Michael L. Reno, David J. Krause, and Rachel J. Whitaker. 2012. "Patterns of Gene Flow Define Species of Thermophilic Archaea." *PLoS Biology* 10 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001265>.
- Cambray, Guillaume, Anne-Marie Guerout, and Didier Mazel. 2010. "Integrations." *Annual Review of Genetics* 44 (1): 141–66. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102209-163504>.
- Cao, Jin Gui, Hu Zhang, Ya Ping Xu, Zhong Qiang Yan, and Yun Xi Liu. 2015. "First Report of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter Soli* Isolates Coharboring BlaNDM-1 and BlaOXA-58 genes from China." *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 83 (4). Elsevier Inc.: 407–8. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.08.008>.
- Carlet, Jean, Peter Collignon, Don Goldmann, Herman Goossens, Inge C Gyssens, Stephan Harbarth, Vincent Jarlier, et al. 2011. "Society's Failure to Protect a Precious Resource: Antibiotics." *The Lancet*, 2011. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60401-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60401-7).
- Carr, Emma L., Peter Kämpfer, Bharat K.C. Patel, Volker Gürtler, and Robert J. Seviour. 2003. "Seven Novel Species of *Acinetobacter* Isolated from Activated Sludge." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53 (4): 953–63. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02486-0>.
- Chagas, Thiago Pavoni Gomes, Ana Paula D Alincourt Carvalho-Assef, Caio Augusto Martins Aires, Rita Bertocini, and Marise Dutra Asensi. 2015. "Detection of an NDM-1-Producing *Acinetobacter Bereziniae* Strain in Brazil." *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 3 (2). Taibah University: 147–48. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2015.03.005>.
- Chamanrokh, P, M M Assadi, A Noohi, and S Yahyai. 2008. "Emulsan Analysis Produced by Locally Isolated Bacteria and *Acinetobacter Calcoaceticus* RAG-1." *Iran J Environ Health Sci Eng* 5 (2): 101–8.
- Chang, Lin Li, Hui Feng Chen, Chung Yu Chang, Tsong Ming Lee, and Wen Jeng Wu. 2004. "Contribution of Integrations, and SmeABC and SmeDEF Efflux Pumps to Multidrug Resistance in Clinical Isolates of *Stenotrophomonas Maltophilia*." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53 (3): 518–21. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh094>.
- Chen, Shu Jen, Chu Yuan Cheng, and Teh Liang Chen. 1998. "Production of an Alkaline Lipase by *Acinetobacter Radioresistens*." *Journal of Fermentation and Bioengineering* 86 (3): 308–12. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(98\)80135-9](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(98)80135-9).
- Cisneros, J. M., M. J. Reyes, J. Pachon, B. Becerril, F. J. Caballero, J. L. Garcia Garmendia, C. Ortiz, and A. R. Cobacho. 1996. "Bacteremia Due to *Acinetobacter Baumannii*: Epidemiology, Clinical Findings, and Prognostic Features." *Clinical Infectious Diseases* 22 (6): 1026–32. <https://doi.org/10.1093/clinids/22.6.1026>.
- Cisneros, José M., J. Rodríguez-Baño, F. Fernández-Cuenca, A. Ribera, J. Vila, A. Pascual, L. Martínez-Martínez, G. Bou, and J. Pachón. 2005. "Risk-Factors for the Acquisition of Imipenem-Resistant *Acinetobacter Baumannii* in Spain: A Nationwide Study." *Clinical Microbiology and Infection* 11 (11): 874–79. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01256.x>.
- Clark, Nina M., George G. Zhanel, and Joseph P. Lynch. 2016. "Emergence of Antimicrobial Resistance among *Acinetobacter* Species." *Current Opinion in Critical Care* 22 (5): 491–99. <https://doi.org/10.1097/MCC.0000000000000337>.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2013. "Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing." CLSI, Wayne, PA, USA, 2010.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2016. "Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twentieth Informational Supplement." CLSI, Wayne, PA, USA, 2010.
- Coenen, Samuel, Nick Francis, Mark Kelly, Kerensa Hood, Jacqui Nuttall, Paul Little, Theo J.M. Verheij, et al. 2013. "Are Patient Views about Antibiotics Related to Clinician Perceptions, Management and Outcome? A Multi-Country Study in Outpatients with Acute Cough." *PLoS ONE* 8 (10): 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076691>.
- Coenye, Tom, Elke Vanlaere, Enevold Falsen, and Peter Vandamme. 2004. "*Stenotrophomonas Africana* Drancourt et Al. 1997 Is a Later Synonym of *Stenotrophomonas Maltophilia* (Hugh 1981) Palleroni and Bardbury 1993."

- International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54 (4): 1235–37. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.63093-0>.
- Cole, J. R., B. Chai, R. J. Farris, Q. Wang, A. S. Kulam-Syed-Mohideen, D. M. McGarrell, A. M. Bandela, E. Cardenas, G. M. Garrity, and J. M. Tiedje. 2007. "The Ribosomal Database Project (RDP-II): Introducing MyRDP Space and Quality Controlled Public Data." *Nucleic Acids Research* 35 (SUPPL. 1): 169–72. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl889>.
- Contreras-Moreira, Bruno, Bernardo Sachman-Ruiz, Iraís Figueroa-Palacios, and Pablo Vinuesa. 2009. "Primers4clades: A Web Server That Uses Phylogenetic Trees to Design Lineage-Specific PCR Primers for Metagenomic and Diversity Studies." *Nucleic Acids Research* 37 (SUPPL. 2): 95–100. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp377>.
- Contreras-Moreira, Bruno, and Pablo Vinuesa. 2013. "GET_HOMOLOGUES, a Versatile Software Package for Scalable and Robust Microbial Pangenome Analysis." *Applied and Environmental Microbiology* 79 (24): 7696–7701. <https://doi.org/10.1128/AEM.02411-13>.
- Cooper, Robert M., Lev Tsimring, and Jeff Hasty. 2017. "Inter-Species Population Dynamics Enhance Microbial Horizontal Gene Transfer and Spread of Antibiotic Resistance." *ELife* 6 (Cdc): 1–26. <https://doi.org/10.7554/eLife.25950>.
- Cordero, Otto X., and Martin F. Polz. 2014. "Explaining Microbial Genomic Diversity in Light of Evolutionary Ecology." *Nature Reviews Microbiology* 12 (4). Nature Publishing Group: 263–73. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3218>.
- Corvec, Stéphane, Nathalie Caroff, Eric Espaze, Cécile Giraudeau, Henri Drugeon, and Alain Reynaud. 2003. "AmpC Cephalosporinase Hyperproduction in *Acinetobacter Baumannii* Clinical Strains." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52 (4): 629–35. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg407>.
- Cosgaya, Clara, Marta Mari-Almirall, Ado Van Assche, Dietmar Fernández-Orth, Noraida Mosqueda, Murat Telli, Geert Huys, et al. 2016. "*Acinetobacter Dijkshoorniae* Sp. Nov., a Member of the *Acinetobacter Calcoaceticus*–*Acinetobacter Baumannii* Complex Mainly Recovered from Clinical Samples in Different Countries." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66 (10): 4105–11. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001318>.
- Dantas, Gautam, and Morten O A Sommer. 2012. "Context Matters — the Complex Interplay between Resistome Genotypes and Resistance Phenotypes." *Current Opinion in Microbiology* 15 (5). Elsevier Ltd: 577–82. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.07.004>.
- Darriba, Diego, Guillermo L. Taboada, Rama Doallo, and David Posada. 2012. "JModelTest 2: More Models, New Heuristics and Parallel Computing." *Nature Methods* 9 (8). Nature Publishing Group: 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>.
- Deepali, Korade, Puranik Sneha, and Patil Sucheta. 2014. "Larvicidal Activity of Rhamnolipid Biosurfactant Produced by *Stenotrophomonas Maltophilia* ." 5 (4): 60–63.
- Degnan, James H., and Noah A. Rosenberg. 2009. "Gene Tree Discordance, Phylogenetic Inference and the Multispecies Coalescent." *Trends in Ecology and Evolution* 24 (6): 332–40. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.01.009>.
- Denton, Miles, and Kevin G. Kerr. 1998a. "Microbiological and Clinical Aspects of Infection Associated with *Stenotrophomonas Maltophilia*." *Clinical Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007003200>.
- Denton, Miles, and Kevin G Kerr. 1998b. "Microbiological and Clinical Aspects of Infection Associated with *Stenotrophomonas Maltophilia* Microbiological and Clinical Aspects of Infection Associated with *Stenotrophomonas Maltophilia*." *American Society for Microbiology* 11 (1): 57–80.
- Deredjian, Amélie, Nolwenn Alliot, Laurine Blanchard, Elisabeth Brothier, Makram Anane, Philippe Cambier, Claudy Jolivet, et al. 2016. "Occurrence of *Stenotrophomonas Maltophilia* in Agricultural Soils and Antibiotic Resistance Properties." *Research in Microbiology* 167 (4): 313–24. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.01.001>.
- Dhakephalkar, P K, and B a Chopade. 1994. "High-Levels of Multiple Metal Resistance and Its Correlation to Antibiotic-Resistance in Environmental Isolates of *Acinetobacter*." *Biometals* 7 (1): 67–74.
- Diancourt, Laure, Virginie Passet, Alexandr Nemec, Lenie Dijkshoorn, and Sylvain Brisse. 2010. "The Population Structure of *Acinetobacter Baumannii*: Expanding Multiresistant Clones from an Ancestral Susceptible Genetic Pool." *PLoS ONE* 5 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010034>.

- Dijkshoorn, L, H Aucken, P. Gerner-Smidt, P Janssen, M E Kaufmann, J Garaizar, J Ursing, and T L Pitt. 1996. "Comparison of Outbreak and Nonoutbreak *Acinetobacter Baumannii* Strains by Genotypic and Phenotypic Methods." *Journal of Clinical Microbiology* 34 (6): 1519–25.
- Dizbay, M., A. Altuncekic, B. Ergut Sezer, K. Ozdemir, and D. Arman. 2008. "Colistin and Tigecycline Susceptibility among Multidrug-Resistant *Acinetobacter Baumannii* Isolated from Ventilator-Associated Pneumonia." *International Journal of Antimicrobial Agents* 32 (1): 29–32. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.02.016>.
- Dougan, Gordon, Johanna J. Kenyon, Mark B. Schultz, Mohammad Hamidian, Derek J. Pickard, Ruth Hall, and Kathryn Holt. 2016. "Five Decades of Genome Evolution in the Globally Distributed, Extensively Antibiotic-Resistant *Acinetobacter Baumannii* Global Clone 1." *Microbial Genomics* 2 (2). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000052>.
- Doughari, Hamuel James, Patrick Alois Ndakidemi, Izanne Susan Human, and Spinney Benade. 2011. "The Ecology, Biology and Pathogenesis of *Acinetobacter* Spp.: An Overview." *Microbes and Environments* 26 (2): 101–12. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME10179>.
- Drancourt, M., C. Bollet, and D. Raout. 1997. "*Stenotrophomonas Africana* Sp. Nov., an Opportunistic Human Pathogen in Africa." *International Journal of Systematic Bacteriology* 47 (1): 160–63. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-1-160>.
- Dunne, W Michael, Hannes Pouseele, Stefan Monecke, Ralf Ehricht, and Alex Van Belkum. 2017. "Infection , Genetics and Evolution Epidemiology of Transmissible Diseases : Array Hybridization and next Generation Sequencing as Universal Nucleic Acid-Mediated Typing Tools." *Infection, Genetics and Evolution*, no. September. Elsevier: 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.09.019>.
- Dursun, Atilla, Melek Eklnci, and Mesude Flgen Dönmez. 2010. "Effects of Foliar Application of Plant Growth Promoting Bacterium on Chemical Contents, Yield and Growth of Tomato (*Lycopersicon Esculentum* L.) and Cucumber (*Cucumis Sativus* L.)." *Pakistan Journal of Botany* 42 (5): 3349–56.
- Ecker, Joseph A., Christian Massire, Thomas A Hall, Raymond Ranken, Thuy Trang D Pennella, Cristina Agasino Ivy, Lawrence B Blyn, et al. 2006. "Identification of *Acinetobacter* Species and Genotyping of *Acinetobacter Baumannii* by Multilocus PCR and Mass Spectrometry." *Journal of Clinical Microbiology* 44 (8): 2921–32. <https://doi.org/10.1128/JCM.00619-06>.
- Edwards, S. V., L. Liu, and D. K. Pearl. 2007. "High-Resolution Species Trees without Concatenation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (14): 5936–41. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607004104>.
- Espinal, P, I Roca, and J Vila. 2011. "Clinical Impact and Molecular Basis of Antimicrobial Resistance in Non-Baumannii *Acinetobacter*." *Future Microbiol.* 6 (1746–0921 (Electronic)): 495–511. <https://doi.org/10.1080/17445019.2011.608888>.
- Ewing, Brent, LaDeana Hillier, Michael C. Wendl, and Phil Green. 1998. "Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. I. Accuracy Assessment." *Genome Research* 8 (3): 175–85. <https://doi.org/10.1101/gr.8.3.175>.
- Ezzariai, Amine, Mohamed Hafidi, Ahmed Khadra, Quentin Aemig, Loubna El Fels, Maialen Barret, Georges Merlina, Dominique Patureau, and Eric Pinelli. 2018. "Human and Veterinary Antibiotics during Composting of Sludge or Manure: Global Perspectives on Persistence, Degradation, and Resistance Genes." *Journal of Hazardous Materials* 359 (July): 465–81. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2018.07.092>.
- Factors, Bayes, Robert E Kass, and Adrian E Raftery. 1995. "Bayes Factors." *Source: Journal of the American Statistical Association*. Vol. 90. <https://www.jstor.org/stable/pdf/2291091.pdf>.
- Feng, Yu, Ping Yang, Xiaohui Wang, and Zhiyong Zong. 2016. "Characterization of *Acinetobacter Johnsonii* Isolate XBB1 Carrying Nine Plasmids and Encoding NDM-1, OXA-58 and PER-1 by Genome Sequencing." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 71 (1): 71–75. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv324>.
- Ferreira, Alessandra Einsfeld, Desirée Padilha Marchetti, Gabriela Rosa da Cunha, Lyvia Moreira de Oliveira, Daiane Bopp Fuentefria, Aline Gehlen Dall Bello, Afonso Luis Barth, and Gertrudes Corção. 2011. "Molecular Characterization of Clinical Multiresistant Isolates of *Acinetobacter* Sp. from Hospitals in Porto Alegre, State of Rio Grande Do Sul, Brazil." *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 44 (6): 725–30. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822011000600014>.
- Figueiredo, S., R. A. Bonnin, L. Poirel, J. Duranteau, and P. Nordmann. 2012. "Identification of the Naturally Occurring Genes Encoding Carbapenem-Hydrolysing Oxacillinases from *Acinetobacter Haemolyticus*, *Acinetobacter Johnsonii*, and *Acinetobacter Calcoaceticus*." *Clinical Microbiology and Infection* 18 (9). European Society of

- Clinical Infectious Diseases: 907–13. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03708.x>.
- Finkmann, Wolfgang, Karlheinz Altendorf, and Erko Stackebrandt. 2000. "Characterization of N₂ O-Producing Xanthomonas-like Isolates from Biofilters as Stenotrophomonas Nitritireducens Sp. Nov., Luteimonas Mephitis Gen. Nov., Sp. Nov. and Pseudoxanthomonas Broegbernensis Gen. Nov., Sp. Nov." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50 (2000): 273–82.
- Fitzpatrick, Margaret A, Egon A Ozer, and Alan R Hauser. 2016. "Utility of Whole-Genome Sequencing in Characterizing Acinetobacter Epidemiology and Analyzing Hospital Outbreaks" 54 (3): 593–612. <https://doi.org/10.1128/JCM.01818-15.Editor>.
- Floris, R., G. Scanu, N. Fois, C. Rizzo, R. Malavenda, N. Spanò, and A. Lo Giudice. 2018. "Intestinal Bacterial Flora of Mediterranean Gilthead Sea Bream (Sparus Aurata Linnaeus) as a Novel Source of Natural Surface Active Compounds." *Aquaculture Research* 49 (3): 1262–73. <https://doi.org/10.1111/are.13580>.
- Fonseca, Érica Loureno, Fernanda Dos Santos Freitas, Érica Miranda D Scheidegger, Tânia Jacinto, and Ana Carolina Paulo Vicente. 2011. "Class 2 Integrons in Multidrug-Resistant Acinetobacter Baumannii Circulating in Different Brazilian Geographic Regions." *International Journal of Antimicrobial Agents* 38 (1): 95–96. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.03.013>.
- Fournier, Pierre-Edouard, David Vallenet, Valérie Barbe, Stéphane Audic, Hiroyuki Ogata, Laurent Poirel, Hervé Richet, et al. 2006. "Comparative Genomics of Multidrug Resistance in Acinetobacter Baumannii." *PLoS Genetics* 2 (1): e7. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020007>.
- Franke, A. E., and D. B. Clewell. 1981. "Evidence for a Chromosome-Borne Resistance Transposon (Tn916) in Streptococcus Faecalis That Is Capable of 'conjugal' Transfer in the Absence of a Conjugative Plasmid." *Journal of Bacteriology* 145 (1): 494–502.
- Friedman, Jonathan, Eric J. Alm, and B. Jesse Shapiro. 2013. "Sympatric Speciation: When Is It Possible in Bacteria?" *PLoS ONE* 8 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053539>.
- Galai, Said, Ferid Limam, and M. Nejib Marzouki. 2009. "A New Stenotrophomonas Maltophilia Strain Producing Laccase. Use in Decolorization of Synthetic Dyes." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 158 (2): 416–31. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8369-y>.
- Gallagher, Larry A., Elizabeth Ramage, Eli J. Weiss, Matthew Radey, Hillary S. Hayden, Kiara G. Held, Holly K. Huse, Daniel V. Zurawski, Mitchell J. Brittnacher, and Colin Manoil. 2015. "Resources for Genetic and Genomic Analysis of Emerging Pathogen Acinetobacter Baumannii." *Journal of Bacteriology* 197 (12): 2027–35. <https://doi.org/10.1128/JB.00131-15>.
- Gallego, José L.R., Jorge Loredó, Juan F. Llamas, Fernando Vázquez, and Jesús Sánchez. 2001. "Bioremediation of Diesel-Contaminated Soils: Evaluation of Potential In Situ Techniques by Study of Bacterial Degradation." *Biodegradation* 12 (5): 325–35. <https://doi.org/10.1023/A:1014397732435>.
- Gao, Shumei, Jong Su Seo, Jun Wang, Young Soo Keum, Jianqiang Li, and Qing X. Li. 2013. "Multiple Degradation Pathways of Phenanthrene by Stenotrophomonas Maltophilia C6." *International Biodeterioration and Biodegradation* 79. Elsevier Ltd: 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.01.012>.
- Garrity, George M., and Timothy G. Lilburn. 2005. "Self-Organizing and Self-Correcting Classifications of Biological Data." *Bioinformatics* 21 (10): 2309–14. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti346>.
- Garza-Ramos, U., G. Davila, V. Gonzalez, C. Alpuche-Aranda, V. R. López-Collada, D. Alcantar-Curiel, O. Newton, and J. Silva-Sanchez. 2009. "The BlaSHV-5gene Is Encoded in a Compound Transposon Duplicated in Tandem in Enterobacter Cloacae." *Clinical Microbiology and Infection* 15 (9): 878–80. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02790.x>.
- Gerner-Smidt, P., I. Tjernberg, and J. Ursing. 1991. "Reliability of Phenotypic Tests for Identification of Acinetobacter Species." *Journal of Clinical Microbiology* 29 (2): 277–82.
- Ghodake, Gajanan S., Satish D. Kalme, Jyoti P. Jadhav, and Sanjay P. Govindwar. 2009. "Purification and Partial Characterization of Lignin Peroxidase from Acinetobacter Calcoaceticus NCIM 2890 and Its Application in Decolorization of Textile Dyes." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 152 (1): 6–14. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8258-4>.
- Ghosh, Arpita, and Papita Das Saha. 2013. "Optimization of Copper Bioremediation by Stenotrophomonas Maltophilia PD2." *Journal of Environmental Chemical Engineering* 1 (3). Elsevier B.V.: 159–63. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2013.04.012>.

- Girlich, Delphine, Laurent Poirel, and Patrice Nordmann. 2010. "First Isolation of the BlaOXA-23 carbapenemase Gene from an Environmental Acinetobacter Baumannii Isolate." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/AAC.00861-09>.
- Gomez, Andres M., Anthony C. Yannarell, Gerald K. Sims, Gloria Cadavid-Restrepo, and Claudia X. Moreno Herrera. 2011. "Characterization of Bacterial Diversity at Different Depths in the Moravia Hill Landfill Site at Medellín, Colombia." *Soil Biology and Biochemistry* 43 (6). Elsevier Ltd: 1275–84. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.02.018>.
- Goodwin, Sara, John D. McPherson, and W. Richard McCombie. 2016. "Coming of Age: Ten Years of next-Generation Sequencing Technologies." *Nature Reviews Genetics* 17 (6). Nature Publishing Group: 333–51. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49>.
- Grundmann, H J, K J Towner, L Dijkshoorn, M Maher, H Seifert, M Vaneechoutte, and J C L I N M Icrobiol. 1997. "Multicenter Study Using Standardized Protocols and Reagents for Evaluation of Reproducibility of PCR-Based Fingerprinting of Acinetobacter Spp ." 35 (12): 3071–77.
- Guardabassi, L., L. Dijkshoorn, J. M. Collard, J. E. Olsen, and A. Dalsgaard. 2000. "Distribution and In-Vitro Transfer of Tetracycline Resistance Determinants in Clinical and Aquatic Acinetobacter Strains." *Journal of Medical Microbiology* 49 (10): 929–36. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-49-10-929>.
- Guardabassi, Luca, Andreas Petersen, and John E Olsen. 1998. "Antibiotic Resistance in Acinetobacter Spp . Isolated from Sewers Receiving Waste Effluent from a Hospital and a Pharmaceutical Plant Antibiotic Resistance in Acinetobacter Spp . Isolated from Sewers Receiving Waste Effluent from a Hospital and a Pharmacee." *Applied and Environment Microbiology* 64 (9): 3499–3502.
- Guindon, Stéphane, Jean Francois Dufayard, Vincent Lefort, Maria Anisimova, Wim Hordijk, and Olivier Gascuel. 2010. "New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0." *Systematic Biology* 59 (3): 307–21. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>.
- Gülmez, D., and G. Haşçelik. 2005. "Stenotrophomonas Maltophilia: Antimicrobial Resistance and Molecular Typing of an Emerging Pathogen in a Turkish University Hospital." *Clinical Microbiology and Infection* 11 (11): 880–86. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01257.x>.
- Hamidian, Mohammad, Stephanie J. Ambrose, and Ruth M. Hall. 2016. "A Large Conjugative Acinetobacter Baumannii Plasmid Carrying the Sul2 Sulphonamide and StrAB Streptomycin Resistance Genes." *Plasmid* 87–88. Elsevier B.V.: 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2016.09.001>.
- Hamidian, Mohammad, and Ruth M. Hall. 2014. "Resistance to Third-Generation Cephalosporins in Acinetobacter Baumannii Due to Horizontal Transfer of a Chromosomal Segment Containing ISAba1-AmpC." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 69 (10): 2865–66. <https://doi.org/10.1093/jac/dku202>.
- Hanage, William P., Christophe Fraser, and Brian G. Spratt. 2005. "Fuzzy Species among Recombinogenic Bacteria." *BMC Biology* 3. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-3-6>.
- Handa, Yutaka, Nozomi Tazato, Yuka Nagatsuka, Tomomi Koide, Rika Kigawa, Chie Sano, and Junta Sugiyama. 2016. "Stenotrophomonas Tumulicola Sp. Nov., a Major Contaminant of the Stone Chamber Interior in the Takamatsuzuka Tumulus." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66 (3): 1119–24. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000843>.
- Harding, Christian M., Seth W. Hennon, and Mario F. Feldman. 2018. "Uncovering the Mechanisms of Acinetobacter Baumannii Virulence." *Nature Reviews Microbiology* 16 (2). Nature Publishing Group: 91–102. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.148>.
- Hauben, L, L Vauterin, E R Moore, B Hoste, and J Swings. 1999. "Genomic Diversity of the Genus Stenotrophomonas." *International Journal of Systematic Bacteriology* 49 Pt 4 (1 999): 1749–60. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-4-1749>.
- Hauck, Yolande, Charles Soler, Patrick Jault, Audrey Mérens, Patrick Gérome, Christine Mac Nab, François Trueba, et al. 2012. "Diversity of Acinetobacter Baumannii in Four French Military Hospitals, as Assessed by Multiple Locus Variable Number of Tandem Repeats Analysis." *PLoS ONE* 7 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044597>.
- Heylen, Kim, Bram Vanparys, Filip Peirsegeale, Liesbeth Lebbe, and Paul De Vos. 2007. "Stenotrophomonas Terrae Sp. Nov. and Stenotrophomonas Humi Sp. Nov., Two Nitrate-Reducing Bacteria Isolated from Soil." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57 (9): 2056–61. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.65044-0>.

- Higgins, Paul G, Cathrin Dammhayn, Meredith Hackel, and Harald Seifert. 2009. "Global Spread of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter Baumannii*." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65 (2): 233–38. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp428>.
- Houang, E T, Y W Chu, C M Leung, K Y Chu, J Berlau, K C Ng, and A F Cheng. 2001. "Epidemiology and Infection Control Implications of *Acinetobacter* Spp. in Hong Kong." *Journal of Clinical Microbiology* 39 (1): 228–34. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.1.228-234.2001>.
- Hrenovic, J, S Kazazic, A Kovacic, M Ganjto, and M Tonkic. 2016. "Carbapenem-Resistant Isolates of *Acinetobacter Baumannii* in a Municipal Wastewater Treatment Plant, Croatia, 2014." *Eurosurveillance Edition* 21 (15): 1–10. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.15.30195>.
- Hu, Yuan, Boqing Li, Dazhi Jin, Zhigang Cui, Xiaoxia Tao, and Binghua Zhang. 2013. "Analysis with Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of *Acinetobacter Baumannii* in China" 51 (4): 1263–68. <https://doi.org/10.1128/JCM.03108-12>.
- Huang, Tzu Wen, Tsai Ling Lauderdale, Tsai Lien Liao, Ming Chia Hsu, Feng Yee Chang, Shan Chwen Chang, Wei Xin Khong, et al. 2015. "Effective Transfer of a 47 Kb NDM-1-Positive Plasmid among *Acinetobacter* Species." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 70 (10): 2734–38. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv191>.
- Hudson, Richard R, Dennis D Boos, and Norman L Kaplan. 1992. "A Statistical Test for Detecting Geographic Subdivision." *Molecular Biology and Evolution*, no. August. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040703>.
- Hugh, R., and E. Leifson. 1963. "A Description of the Type Strain of *Pseudomonas Maltophilia*." *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy* 13 (3): 133–38. <https://doi.org/10.1099/0096266X-13-3-133>.
- Hughes, Peter. 2004. "Antibiotic Use in Food Animals." *Assessing Quality and Safety of Animal Feeds*, 129–53. <http://animalagriculture.org/Solutions/Proceedings/Symposia/2011Antibiotics/WhitePaper.pdf>.
- Huys, Geert, Margo Cnockaert, Alexandr Nemeč, and Jean Swings. 2005. "Sequence-Based Typing of AdeB as a Potential Tool To Identify Intraspecific Groups among Clinical Strains of Multidrug-Resistant *Acinetobacter Baumannii*" 43 (10): 5327–31. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.10.5327>.
- Huys, Geert, Margo Cnockaert, Mario Vaneechoutte, Neil Woodford, Alexandr Nemeč, Lenie Dijkshoorn, and Jean Swings. 2005. "Distribution of Tetracycline Resistance Genes in Genotypically Related and Unrelated Multiresistant *Acinetobacter Baumannii* Strains from Different European Hospitals." *Research in Microbiology* 156 (3): 348–55. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.10.008>.
- Jagtap, Shweta, Sharad Gore, Supriya Yavankar, Karishma Pardesi, and Balu Chopade. 2010. "Optimization of Medium for Lipase Production by *Acinetobacter Haemolyticus* from Healthy Human Skin." *Indian Journal of Experimental Biology* 48 (9): 936–41.
- Jakobi, Monika, Gunther Winkelmann, Dietmar Kaiser, C Kempler, Gunther Jung, G Berg, and H Bahl. 1996. "Maltophilin: A New Antifungal Compound Produced by *Stenotrophomonas Maltophilia* R3089." *The Journal of Antibiotics* 49 (11): 1101–4. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.49.1101>.
- Jankiewicz, Urszula, Maria Swiontek Brzezinska, and Elzbieta Saks. 2012. "Identification and Characterization of a Chitinase of *Stenotrophomonas Maltophilia*, a Bacterium That Is Antagonistic towards Fungal Phytopathogens." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 113 (1): 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.08.023>.
- Jia, Baofeng, Amogelang R Raphenya, Brian Alcock, Nicholas Waglechner, Peiyao Guo, Kara K Tsang, Briony A Lago, et al. 2017. "CARD 2017 : Expansion and Model-Centric Curation of the Comprehensive Antibiotic Resistance Database" 45 (October 2016): 566–73. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1004>.
- Jiang, Yan, Hui Qi, and Xian M. Zhang. 2018. "Co-Biodegradation of Anthracene and Naphthalene by the Bacterium *Acinetobacter Johnsonii*." *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* 53 (5). Taylor & Francis: 448–56. <https://doi.org/10.1080/10934529.2017.1409579>.
- Johri, A. K., W. Blank, and David L. Kaplan. 2002. "Bioengineered Emulsans from *Acinetobacter Calcoaceticus* RAG-1 Transposon Mutants." *Applied Microbiology and Biotechnology* 59 (2–3): 217–23. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-0994-8>.
- Jones, A. L., D. DeShazer, and D. E. Woods. 1997. "Identification and Characterization of a Two-Component Regulatory System Involved in Invasion of Eukaryotic Cells and Heavy-Metal Resistance in *Burkholderia*

- Pseudomallei." *Infection and Immunity* 65 (12): 4972–77.
- Jones, Lim S., Maria J. Carvalho, Mark A. Toleman, P. Lewis White, Thomas R. Connor, Ammara Mushtaq, Janis L. Weeks, et al. 2015. "Characterization of Plasmids in Extensively Drug-Resistant Acinetobacter Strains Isolated in India and Pakistan." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59 (2): 923–29. <https://doi.org/10.1128/AAC.03242-14>.
- Jung, Jaejoon, Eugene L. Madsen, Che Ok Jeon, and Woojun Park. 2011. "Comparative Genomic Analysis of Acinetobacter Oleivorans DR1 To Determine Strain-Specific Genomic Regions and Gentisate Biodegradation." *Applied and Environmental Microbiology* 77 (20): 7418–24. <https://doi.org/10.1128/AEM.05231-11>.
- Jung, Jaejoon, and Woojun Park. 2015. "Acinetobacter Species as Model Microorganisms in Environmental Microbiology: Current State and Perspectives." *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6439-y>.
- Kaiser, Sabine, Klaus Biehler, and Daniel Jonas. 2009. "A Stenotrophomonas Maltophilia Multilocus Sequence Typing Scheme for Inferring Population Structured." *Journal of Bacteriology* 191 (9): 2934–43. <https://doi.org/10.1128/JB.00892-08>.
- Kalscheuer, Rainer, Torsten Stölting, and Alexander Steinbüchel. 2006. "Microdiesel: Escherichia Coli Engineered for Fuel Production." *Microbiology* 152 (9): 2529–36. <https://doi.org/10.1099/mic.0.29028-0>.
- Kang, Yoon Suk, Jaejoon Jung, Che Ok Jeon, and Woojun Park. 2011. "Acinetobacter Oleivorans Sp. Nov. Is Capable of Adhering to and Growing on Diesel-Oil." *Journal of Microbiology* 49 (1): 29–34. <https://doi.org/10.1007/s12275-011-0315-y>.
- Kaparullina, Elena, Nina Doronina, Tatyana Chistyakova, and Yuri Trotsenko. 2009. "Stenotrophomonas Chelatiphaga Sp. Nov., a New Aerobic EDTA-Degrading Bacterium." *Systematic and Applied Microbiology* 32 (3): 157–62. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.12.003>.
- Karah, Nabil, Bjørg Haldorsen, Kristin Hegstad, Gunnar Skov Simonsen, Arnfinn Sundsfjord, and Ørjan Samuelsen. 2011. "Species Identification and Molecular Characterization of Acinetobacter Spp. Blood Culture Isolates from Norway." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66 (4): 738–44. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq521>.
- Kim, Duwoon, Keun Sik Baik, Mi Sun Kim, Seong Chan Park, Seon Suk Kim, Moon Soo Rhee, Young Se Kwak, and Chi Nam Seong. 2008. "Acinetobacter Soli Sp. Nov., Isolated from Forest Soil." *Journal of Microbiology* 46 (4): 396–401. <https://doi.org/10.1007/s12275-008-0118-y>.
- Kim, Ho Bin, Sathiyaraj Srinivasan, Gayathri Sathiyaraj, Lin Hu Quan, Se Hwa Kim, Thi Phuong Nam Bui, Zhi Qi Liang, Yeon Ju Kim, and Deok Chun Yang. 2010. "Stenotrophomonas Ginsengisoli Sp. Nov., Isolated from a Ginseng Field." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.014662-0>.
- Kim, Seung Il, Yong Cheol Yoo, and Hyung Yeel Kahng. 2001. "Complete Nucleotide Sequence and Overexpression of Cat1gene Cluster, and Roles of the Putative Transcriptional Activator CatR1 in Acinetobacter Lwoffii K24 Capable of Aniline Degradation." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 288 (3): 645–49. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5818>.
- Koepfel, A., E. B. Perry, J. Sikorski, D. Krizanc, A. Warner, D. M. Ward, A. P. Rooney, et al. 2008. "Identifying the Fundamental Units of Bacterial Diversity: A Paradigm Shift to Incorporate Ecology into Bacterial Systematics." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (7): 2504–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712205105>.
- Kostka, Joel E, Om Prakash, Will A Overholt, Stefan J Green, Gina Freyer, Andy Canion, Jonathan Delgardio, Nikita Norton, Terry C Hazen, and Markus Huettel. 2011. "Hydrocarbon-Degrading Bacteria and the Bacterial Community Response in Gulf of Mexico Beach Sands Impacted by the Deepwater Horizon Oil Spill." *Applied and Environmental Microbiology* 77 (22): 7962–74. <https://doi.org/10.1128/AEM.05402-11>.
- Kouyama, Yuichi, Sohei Harada, Yoshikazu Ishii, Tomoo Saga, Ayumi Yoshizumi, Kazuhiro Tateda, and Keizo Yamaguchi. 2012. "Molecular Characterization of Carbapenem-Non-Susceptible Acinetobacter Spp. in Japan: Predominance Ofmultidrug-Resistant Acinetobacter Baumannii Clonal Complex 92 and IMP-Type Metallo-β-Lactamase-Producing Non- BaumanniiAcinetobacter Species." *Journal of Infection and Chemotherapy* 18 (4). Elsevier: 522–28. <https://doi.org/10.1007/s10156-012-0374-y>.
- Kramer, Axel, Ingeborg Schwebke, and Günter Kampf. 2006. "How Long Do Nosocomial Pathogens Persist on Inanimate Surfaces? A Systematic Review." *BMC Infectious Diseases* 6: 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-6-130>.

- Krehenbrink, Martin, Fred Bernd Oppermann-Sanio, and Alexander Steinbüchel. 2002. "Evaluation of Non-Cyanobacterial Genome Sequences for Occurrence of Genes Encoding Proteins Homologous to Cyanophycin Synthetase and Cloning of an Active Cyanophycin Synthetase from *Acinetobacter* Sp. Strain DSM 587." *Archives of Microbiology* 177 (5): 371–80. <https://doi.org/10.1007/s00203-001-0396-9>.
- Kuhn, Emanuele, Giovanni Sebben Bellicanta, and Vivian Helena Pellizari. 2009. "New Alk Genes Detected in Antarctic Marine Sediments." *Environmental Microbiology* 11 (3): 669–73. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01843.x>.
- Kuklinsky-Sobral, J??lia, Wellington Luiz Ara??jo, Rodrigo Mendes, Isaias Ol??vio Geraldi, Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner, and Jo??o L??cio Azevedo. 2004. "Isolation and Characterization of Soybean-Associated Bacteria and Their Potential for Plant Growth Promotion." *Environmental Microbiology* 6 (12): 1244–51. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00658.x>.
- Kumar, Koel, Sivanesan Saravana Devi, Kannan Krishnamurthi, Gajanan Sitaramji Kanade, and Tapan Chakrabarti. 2007. "Enrichment and Isolation of Endosulfan Degrading and Detoxifying Bacteria." *Chemosphere* 68 (2): 317–22. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.12.076>.
- Kumar, Nokku Pradeep, and Amrutha V Audipudi. 2015. "Exploration of a Novel Plant Growth Promoting Bacteria *Stenotrophomonas Maltophilia* AVP27 Isolated from the Chilli Rhizosphere Soil." *International Journal of Engineering Research and General Science* 3 (1): 265–76. www.ijergs.org.
- Kumsa, Bersissa, Cristina Socolovschi, Philippe Parola, Jean Marc Rolain, and Didier Raoult. 2012. "Molecular Detection of *Acinetobacter* Species in Lice and Keds of Domestic Animals in Oromia Regional State, Ethiopia." *PLoS ONE* 7 (12): 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052377>.
- Kwok, O.C.H, P.C. Fahy, H.A.J Hoitink, and G.A. Kuter. 1987. "Interactions between Bacteria and *Trichoderma Hamatum* in Suppression of *Rhizoctonia* Damping-off in Bark Compost Media." *Phytopathology*. <https://doi.org/10.1094/Phyto-77-1206>.
- Lambert, B, F Leyns, L Van Rooyen, F Gosselé, Y Papon, and J Swings. 1987. "Rhizobacteria of Maize and Their Antifungal Activities." *Applied and Environmental Microbiology* 53 (8): 1866–71.
- Larkin, M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. Mcgettigan, H. McWilliam, F. Valentin, et al. 2007. "Clustal W and Clustal X Version 2.0." *Bioinformatics* 23 (21): 2947–48. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>.
- Lee, Kwang Woo, Hyun Ae Bae, Gab Sang Shin, and Yong Hyun Lee. 2006. "Purification and Catalytic Properties of Novel Enantioselective Lipase from *Acinetobacter* Sp. ES-1 for Hydrolysis of (S)-Ketoprofen Ethyl Ester." *Enzyme and Microbial Technology* 38 (3–4): 443–48. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.06.017>.
- Lee, Myungjin, Sung Geun Woo, Myoungsoo Chae, Min Cheol Shin, Hae Min Jung, and Leonid N. Ten. 2011. "*Stenotrophomonas Daejeonensis* Sp. Nov., Isolated from Sewage." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61 (3): 598–604. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.017780-0>.
- Lelie, Daniel Van Der, Tanja Schwuchow, Uta Schwidetzky, Stefan Wuertz, Wilfried Baeyens, Max Mergeay, and Dietrich H. Nies. 1997. "Two-Component Regulatory System Involved in Transcriptional Control of Heavy-Metal Homeostasis in *Alcaligenes Eutrophus*." *Molecular Microbiology* 23 (3): 493–503. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.d01-1866.x>.
- Levesque, C., L. Piche, C. Larose, and P. H. Roy. 1995. "PCR Mapping of Integrons Reveals Several Novel Combinations of Resistance Genes." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39 (1): 185–91. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.1.185>.
- Li, Chen You, Shu Jen Chen, Chu Yuan Cheng, and Teh Liang Chen. 2005. "Production of *Acinetobacter* Radioresistens Lipase with Repeated Fed-Batch Culture." *Biochemical Engineering Journal* 25 (3): 195–99. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.05.002>.
- Li, Jibing, Chunling Luo, Mengke Song, Qing Dai, Longfei Jiang, Dayi Zhang, and Gan Zhang. 2017. "Biodegradation of Phenanthrene in Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Contaminated Wastewater Revealed by Coupling Cultivation-Dependent and -Independent Approaches." *Environmental Science and Technology* 51 (6): 3391–3401. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04366>.
- Li, Zhongtian, Renu Nandakumar, Nandakumar Madayiputhiya, and Xu Li. 2012. "Proteomic Analysis of 17 β -Estradiol Degradation by *Stenotrophomonas Maltophilia*." *Environmental Science and Technology* 46 (11): 5947–55. <https://doi.org/10.1021/es300273k>.

- Liaw, S. J., Y. L. Lee, and P. R. Hsueh. 2010. "Multidrug Resistance in Clinical Isolates of *Stenotrophomonas Maltophilia*: Roles of Integrons, Efflux Pumps, Phosphoglucosyltransferase (SpgM), and Melanin and Biofilm Formation." *International Journal of Antimicrobial Agents* 35 (2): 126–30. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.09.015>.
- Lin, C. W., C. S. Chiou, Y. C. Chang, and T. C. Yang. 2008. "Comparison of Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Three Rep-PCR Methods for Evaluating the Genetic Relatedness of *Stenotrophomonas Maltophilia* Isolates." *Letters in Applied Microbiology* 47 (5): 393–98. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02443.x>.
- Lolans, Karen, Thomas W. Rice, L. Silvia Munoz-Price, and John P. Quinn. 2006. "Multicity Outbreak of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter Baumannii* Isolates Producing the Carbapenemase OXA-40." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50 (9): 2941–45. <https://doi.org/10.1128/AAC.00116-06>.
- Magiorakos, A. P., A. Srinivasan, R. B. Carey, Y. Carmeli, M. E. Falagas, C. G. Giske, S. Harbarth, et al. 2012. "Multidrug-Resistant, Extensively Drug-Resistant and Pandrug-Resistant Bacteria: An International Expert Proposal for Interim Standard Definitions for Acquired Resistance." *Clinical Microbiology and Infection* 18 (3). European Society of Clinical Infectious Diseases: 268–81. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>.
- Mahjoubi, Mouna, Atef Jaouani, Amel Guesmi, Sonia Ben Amor, Ahlem Jouini, Hanen Cherif, Afef Najjari, Abdellatif Boudabous, Nedra Koubaa, and Ameer Cherif. 2013. "Hydrocarbonoclastic Bacteria Isolated from Petroleum Contaminated Sites In Tunisia: Isolation, Identification and Characterization of the Biotechnological Potential." *New Biotechnology* 30 (6). Elsevier B.V.: 723–33. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.03.004>.
- Marquez-Ortiz, Ricaurte Alejandro, Leanne Haggerty, Narda Olarte, Carolina Duarte, Ulises Garza-Ramos, Jesus Silva-Sanchez, Betsy E. Castro, et al. 2017. "Genomic Epidemiology of NDM-1-Encoding Plasmids in Latin American Clinical Isolates Reveals Insights into the Evolution of Multidrug Resistance." *Genome Biology and Evolution* 9 (6): 1725–41. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx115>.
- Martínez, José Luis. 2018. "Ecology and Evolution of Chromosomal Gene Transfer between Environmental Microorganisms and Pathogens." *Microbiology Spectrum* 6 (1): 1–16. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MTBP-0006-2016>.
- Matsuoka, H, F Ishimura, T Takeda, and M Hikuma. 2002. "Isolation of Polyacrylamide-Degrading Microorganisms from Soil." *Biotechnology and Bioengineering* 7 (5): 327–30. <https://doi.org/10.1007/BF02932844>.
- McQueary, Christin N., Benjamin C. Kirkup, Yuanzheng Si, Miriam Barlow, Luis A. Actis, David W. Craft, and Daniel V. Zurawski. 2012. "Extracellular Stress and Lipopolysaccharide Modulate *Acinetobacter Baumannii* Surface-Associated Motility." *Journal of Microbiology* 50 (3): 434–43. <https://doi.org/10.1007/s12275-012-1555-1>.
- Med, Christian, College Hosp, M Biendo, G Laurans, J F Lefebvre, F Daoudi, and Laboratoire De Bacte. 1999. "Epidemiological Study of an *Acinetobacter Baumannii* Outbreak by Using a Combination of Antibiotyping and Ribotyping These Include : Epidemiological Study of an *Acinetobacter Baumannii* Outbreak by Using a Combination of Antibiotyping and Ribotyping" 37 (7): 2170–75.
- Medini, Duccio, Claudio Donati, Hervé Tettelin, Vega Massignani, and Rino Rappuoli. 2005. "The Microbial Pan-Genome." *Current Opinion in Genetics and Development*. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2005.09.006>.
- Messiha, N. A. S., A. D. van Diepeningen, N. S. Farag, S. A. Abdallah, J. D. Janse, and A. H. C. van Bruggen. 2007. "*Stenotrophomonas Maltophilia*: A New Potential Biocontrol Agent of *Ralstonia Solanacearum*, Causal Agent of Potato Brown Rot." *European Journal of Plant Pathology* 118 (3): 211–25. <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9136-6>.
- Miyaji, Tatsuro, Y. Otta, T. Shibata, K. Mitsui, T. Nakagawa, T. Watanabe, Y. Niimura, and N. Tomizuka. 2005. "Purification and Characterization of Extracellular Alkaline Serine Protease from *Stenotrophomonas Maltophilia* Strain S-1." *Letters in Applied Microbiology* 41 (3): 253–57. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01750.x>.
- Montaña, S., S. Palombarani, M. Carulla, A. Kunst, C. H. Rodriguez, M. Nastro, C. Vay, M. S. Ramirez, and M. Almuzara. 2018. "First Case of Bacteraemia Due to *Acinetobacter Schindleri* Harboring blaNDM-1 in an Immunocompromised Patient." *New Microbes and New Infections* 21. Elsevier Ltd: 28–30. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2017.10.004>.
- Mostachio, Anna Karina, Anna Sara Levin, Camila Rizek, Flavia Rossi, Jessika Zerbini, and Silvia Figueiredo Costa. 2012. "High Prevalence of OXA-143 and Alteration of Outer Membrane Proteins in Carbapenem-Resistant *Acinetobacter* Spp. Isolates in Brazil." *International Journal of Antimicrobial Agents* 39 (5). Elsevier B.V.: 396–401. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.01.021>.

- Mukherjee, Piyali, and Pranab Roy. 2013. "Copper Enhanced Monooxygenase Activity and FT-IR Spectroscopic Characterisation of Biotransformation Products in Trichloroethylene Degrading Bacterium: *Stenotrophomonas Maltophilia* PM102." *BioMed Research International* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/723680>.
- Mwangi, K, H I Boga, A W Muigai, C Kiiyukia, and M K Tsanuo. 2010. "Degradation of Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) by Bacterial Isolates from Cultivated and Uncultivated Soil." *African Journal of Microbiology Research* 4 (3): 185–96.
- Naas, Thierry, Gaelle Cuzon, Maria Virginia Villegas, Marie Frédérique Lartigue, John P. Quinn, and Patrice Nordmann. 2008. "Genetic Structures at the Origin of Acquisition of the β -Lactamase BlaKPC Gene." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52 (4): 1257–63. <https://doi.org/10.1128/AAC.01451-07>.
- Nakajima, Yoshitaka, Kiyoshi Ito, Tsubasa Toshima, Takashi Egawa, Heng Zheng, Hiroshi Oyama, Yu Fan Wu, Eiji Takahashi, Kiyoshi Kyono, and Tadashi Yoshimoto. 2008. "Dipeptidyl Aminopeptidase IV from *Stenotrophomonas Maltophilia* Exhibits Activity against a Substrate Containing a 4-Hydroxyproline Residue." *Journal of Bacteriology* 190 (23): 7819–29. <https://doi.org/10.1128/JB.02010-07>.
- Nakayama, Takato, Yoshihisa Homma, Yasuyuki Hashidoko, Junya Mizutani, and Satoshi Tahara. 1999. "Possible Role of Xanthobaccins Produced by *Stenotrophomonas* Sp. Strain SB-K88 in Suppression of Sugar Beet Damping-off Disease." *Applied and Environmental Microbiology* 65 (10): 4334–39.
- Nasser, Kother, Salim Mustafa, Wasif Khan, Prashant Purohit, Inaam Al-obaid, Rita Dhar, and Wadha Al-fouzan. 2018. "Cross Strains of *Acinetobacter Baumannii*, Isolated at Two Major," 1–2.
- Naz, Irum, and Asghari Bano. 2012. "Assessment of Phytohormones Producing Capacity of *Stenotrophomonas Maltophilia* SSA and Its Interaction with *Zea Mays* L." *Pakistan Journal of Botany* 44 (1): 465–69. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132006000400001>.
- Nemec, Alexandr, Thierry De Baere, Ingela Tjernberg, Mario Vanechoutte, Tanny J K Van Der Reijden, and Lenie Dijkshoorn. 2001. "*Acinetobacter Schindleri* Sp. Nov., Isolated from Human Clinical Specimens within the Genus *Acinetobacter*, Designated Phenon 1 and Phenon 2, Was New Genomic Species. Furthermore, 16S rRNA Gene Sequence Analysis of Three." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51 (2001): 1891–99.
- Nemec, Alexandr, Lucilla Dolzani, Sylvain Brisse, Peterhans Van Den Broek, and Lenie Dijkshoorn. 2004. "Diversity of Aminoglycoside-Resistance Genes and Their Association with Class 1 Integrons among Strains of Pan-European *Acinetobacter Baumannii* Clones." *Journal of Medical Microbiology* 53 (12): 1233–40. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45716-0>.
- Nemec, Alexandr, Lenka Krizova, Martina Maixnerova, Tanny J.K. van der Reijden, Pieter Deschaght, Virginie Passet, Mario Vanechoutte, Sylvain Brisse, and Lenie Dijkshoorn. 2011. "Genotypic and Phenotypic Characterization of the *Acinetobacter Calcoaceticus*-*Acinetobacter Baumannii* Complex with the Proposal of *Acinetobacter Pittii* Sp. Nov. (Formerly *Acinetobacter* Genomic Species 3) and *Acinetobacter Nosocomialis* Sp. Nov. (Formerly Ac." *Research in Microbiology* 162 (4). Elsevier Masson SAS: 393–404. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.02.006>.
- Nemec, Alexandr, Martin Musílek, Martina Maixnerová, Thierry De Baere, Tanny J.K. van der Reijden, Mario Vanechoutte, and Lenie Dijkshoorn. 2009. "*Acinetobacter Beijerinckii* Sp. Nov. and *Acinetobacter Gyllenbergii* Sp. Nov., Haemolytic Organisms Isolated from Humans." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59 (1): 118–24. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.001230-0>.
- Nemec, Alexandr, Martin Musílek, Ondrej Šedo, Thierry De Baere, Martina Maixnerová, Tanny J.K. Reijden, Zbyněk Zdráhal, Mario Vanechoutte, and Lenie Dijkshoorn. 2010. "*Acinetobacter Berezinae* Sp. Nov. and *Acinetobacter Guillouiae* Sp. Nov., to Accommodate *Acinetobacter* Genomic Species 10 and 11, Respectively." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60 (4): 896–903. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.013656-0>.
- Oakley, Brian B, Franck Carbonero, Christopher J. Van Der Gast, Robert J Hawkins, and Kevin J Purdy. 2010. "Evolutionary Divergence and Biogeography of Sympatric Niche-Differentiated Bacterial Populations." *ISME Journal* 4 (4). Nature Publishing Group: 488–97. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.146>.
- Pagano, M., A. F. Martins, A. B M P MacHado, J. Barin, and A. L. Barth. 2013. "Carbapenem-Susceptible *Acinetobacter Baumannii* Carrying the ISAbal1 Upstream Bla OXA-51-like Gene in Porto Alegre, Southern Brazil." *Epidemiology and Infection* 141 (2): 330–33. <https://doi.org/10.1017/S095026881200074X>.
- Pagano, Mariana, Andreza Francisco Martins, and Afonso Luis Barth. 2016. "Mobile Genetic Elements Related to

- Carbapenem Resistance in *Acinetobacter Baumannii*." *Brazilian Journal of Microbiology* 47 (4). Sociedade Brasileira de Microbiologia: 785–92. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.06.005>.
- Palleroni, N J, and J F Bradbury. 1993. "Stenotrophomonas, a New Bacterial Genus for Xanthomonas Maltophilia (Hugh 1980) Swings et Al. 1983." *International Journal of Systematic Bacteriology* 43 (3): 606–9. <https://doi.org/10.1099/00207713-43-3-606>.
- Papadakis, Konstantinos A., Shahe E. Vartivarian, Maria E. Vassilaki, and Elias J. Anaissie. 1995. "Stenotrophomonas Maltophilia: An Unusual Cause of Biliary Sepsis." *Clinical Infectious Diseases* 21 (4): 1032–34. <https://doi.org/10.1093/clinids/21.4.1032>.
- Peleg, Anton Y., Harald Seifert, and David L. Paterson. 2008. "Acinetobacter Baumannii: Emergence of a Successful Pathogen." *Clinical Microbiology Reviews* 21 (3): 538–82. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-07>.
- Pellegrino, Flávia Lúcia Piffano Costa, Verônica V. Vieira, Paulo Victor Pereira Baio, Rosana Maria R. Dos Santos, Ana Lucia Alves Dos Santos, Nadir Gomes De Barros Santos, Martha Maria Gaudie Ley Meohas, et al. 2011. "Acinetobacter Soli as a Cause of Bloodstream Infection in a Neonatal Intensive Care Unit." *Journal of Clinical Microbiology* 49 (6): 2283–85. <https://doi.org/10.1128/JCM.00326-11>.
- Pendleton, Jack N., Sean P. Gorman, and Brendan F. Gilmore. 2013. "Clinical Relevance of the ESKAPE Pathogens." *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. <https://doi.org/10.1586/eri.13.12>.
- Perez, Federico, Andrea M. Hujer, Kristine M. Hujer, Brooke K. Decker, Philip N. Rather, and Robert A. Bonomo. 2007. "Global Challenge of Multidrug-Resistant *Acinetobacter Baumannii*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51 (10): 3471–84. <https://doi.org/10.1128/AAC.01464-06>.
- Perry, Julie A, and Gerard D Wright. 2013. "The Antibiotic Resistance 'Mobilome': Searching for the Link between Environment and Clinic." *Frontiers in Microbiology* 4 (MAY): 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00138>.
- Pirog, T P, M A Kovalenko, and Yu V Kuz. 2002. "Exopolysaccharide Production and Peculiarities of C 6 -Metabolism in *Acinetobacter* Sp . Grown on Carbohydrate Substrates" 71 (2): 215–21.
- Pirog, T P, N V Vysyatetskaya, and Yu V Korzh. 2007. "Specific Features of the Synthesis of the Exopolysaccharide Ethapolan on a Mixture of Energy-Deficient Growth Substrates." *Microbiology* 76 (1): 25–30. <https://doi.org/10.1134/S0026261707010043>.
- Pleshakova, E V, A Yu Muratova, and O V Turkovskaya. 2001. "Degradation of Mineral Oil with a Strain of *Acinetobacter Calcoaceticus*" 37 (4): 342–47.
- Poirel, Laurent, Rémy A. Bonnin, and Patrice Nordmann. 2011. "Analysis of the Resistome of a Multidrug-Resistant NDM-1-Producing *Escherichia Coli* Strain by High-Throughput Genome Sequencing." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (9): 4224–29. <https://doi.org/10.1128/AAC.00165-11>.
- Pompilio, Arianna, Stefano Pomponio, Valentina Crocetta, Giovanni Gherardi, Fabio Verginelli, Ersilia Fiscarelli, Giordano Dicuonzo, Vincenzo Savini, Domenico D Antonio, and Giovanni Di Bonaventura. 2011. "Phenotypic and Genotypic Characterization of *Stenotrophomonas Maltophilia* Isolates from Patients with Cystic Fibrosis : Genome Diversity , Biofilm Formation , and Virulence Phenotypic and Genotypic Characterization of *Stenotrophomonas Maltophilia* Isolates" 159 (July).
- Potron, Anaïs, Laurent Poirel, and Patrice Nordmann. 2015. "Emerging Broad-Spectrum Resistance in *Pseudomonas Aeruginosa* and *Acinetobacter Baumannii*: Mechanisms and Epidemiology." *International Journal of Antimicrobial Agents* 45 (6). Elsevier B.V.: 568–85. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.03.001>.
- Pourcel, Christine, Fabrizia Minandri, Yolande Hauck, Silvia D Arezzo, Francesco Imperi, Gilles Vergnaud, and Paolo Visca. 2011. "Identification of Variable-Number Tandem-Repeat (VNTR) Sequences in *Acinetobacter Baumannii* and Interlaboratory Validation of an Optimized Multiple-Locus VNTR Analysis Typing Scheme ¶" 49 (2): 539–48. <https://doi.org/10.1128/JCM.02003-10>.
- Rafei, Rayane, Fouad Dabboussi, Monzer Hamze, Matthieu Eveillard, Carole Lemarié, Marie Pierre Gaultier, Hassan Mallat, et al. 2014. "Molecular Analysis of *Acinetobacter Baumannii* Strains Isolated in Lebanon Using Four Different Typing Methods." *PLoS ONE* 9 (12): 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115969>.
- Ramos, Patrícia L., Stefanie Van Trappen, Fabiano L. Thompson, Rafael C S Rocha, Heloiza R. Barbosa, Paul de Vos, and Carlos A. Moreira-Filho. 2011. "Screening for Endophytic Nitrogen-Fixing Bacteria in Brazilian Sugar Cane Varieties Used in Organic Farming and Description of *Stenotrophomonas Pavanii* Sp. Nov." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61 (4): 926–31. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.019372-0>.
- Rannala, Bruce, and Ziheng Yang. 2003. "Bayes Estimation of Species Divergence Times and Ancestral Population

- Sizes Using DNA Sequences from Multiple Loci." *Genetics* 164 (4): 1645–56. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913022107>.
- Rathinavelu, Sivaprakash, Yana Zavros, and Juanita L. Merchant. 2003. "Acinetobacter Lwoffii Infection and Gastritis." *Microbes and Infection* 5 (7): 651–57. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(03\)00099-6](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(03)00099-6).
- Reboli, Annette C, Eric D Houston, Joseph S Monteforte, Craig A Wood, and Richard J Hamill. 1994. "Discrimination of Epidemic and Sporadic Isolates of Acinetobacter Baumannii by Repetitive Element PCR-Mediated DNA Fingerprinting JK" 32 (11): 2635–40.
- Rebollar, Eria A., Morena Avitia, Luis E. Eguiarte, Andrea González-González, Lucy Mora, Germán Bonilla-Rosso, and Valeria Souza. 2012. "Water-Sediment Niche Differentiation in Ancient Marine Lineages of Exiguobacterium Endemic to the Cuatro Ciénegas Basin." *Environmental Microbiology* 14 (9): 2323–33. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02784.x>.
- Regeen, Handal, Dalia Al-Sharafa-Kittaneh, Randa Kattan, Rula Al-Dawodi, Hiyam Marzouqa, and Musa Y. Hindiyeh. 2014. "First Report of BlaNDMand BlaOXA-58 Coexistence in Acinetobacter Junii." *Journal of Clinical Microbiology* 52 (9): 3492–93. <https://doi.org/10.1128/JCM.01152-14>.
- Rice, Louis B. 2008. "Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE." *The Journal of Infectious Diseases* 197 (8): 1079–81. <https://doi.org/10.1086/533452>.
- Richter, M., and R. Rossello-Mora. 2009. "Shifting the Genomic Gold Standard for the Prokaryotic Species Definition." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (45): 19126–31. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906412106>.
- Riesenfeld, Christian S., Robert M. Goodman, and Jo Handelsman. 2004. "Uncultured Soil Bacteria Are a Reservoir of New Antibiotic Resistance Genes." *Environmental Microbiology* 6 (9): 981–89. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00664.x>.
- Roca, I, M Akova, F Baquero, J Carlet, M Cavaleri, S Coenen, J Cohen, et al. 2015. "The Global Threat of Antimicrobial Resistance: Science for Intervention." *New Microbes and New Infections*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2015.02.007>.
- Rocha, Lidianne L, Geórgia B Colares, Alysson L Angelim, Thalles B Grangeiro, and Vânia M M Melo. 2013. "Culturable Populations of Acinetobacter Can Promptly Respond to Contamination by Alkanes in Mangrove Sediments." *Marine Pollution Bulletin* 76 (1–2). Elsevier Ltd: 214–19. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.08.040>.
- Romanenko, Lyudmila A., Masataka Uchino, Naoto Tanaka, Galina M. Frolova, Natalia N. Slinkina, and Valery V. Mikhailov. 2008. "Occurrence and Antagonistic Potential of Stenotrophomonas Strains Isolated from Deep-Sea Invertebrates." *Archives of Microbiology* 189 (4): 337–44. <https://doi.org/10.1007/s00203-007-0324-8>.
- Romano, Sara, Fabien Aujoulat, Estelle Jumas-Bilak, Agnès Masnou, Jean Luc Jeannot, Enevold Falsen, Hélène Marchandin, and Corinne Teyssier. 2009. "Multilocus Sequence Typing Supports the Hypothesis That Ochrobactrum Anthropi Displays a Human-Associated Subpopulation." *BMC Microbiology* 9: 1–18. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-267>.
- Rooney, Alejandro P., Christopher A. Dunlap, and Lina B. Flor-Weiler. 2016. "Acinetobacter Lactucae Sp. Nov., Isolated from Iceberg Lettuce (Asteraceae: Lactuca Sativa)." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66 (9): 3566–72. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001234>.
- Roschetto, Emanuela, M Stella Carlomagno, Mariassunta Casalino, Bianca Colonna, Raffaele Zarrilli, and Pier Paolo Di Nocera. 2008. "PCR-Based Rapid Genotyping of Stenotrophomonas Maltophilia Isolates." *BMC Microbiology* 8: 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-202>.
- Rousseaux, Sandrine, Alain Hartmann, and Guy Soulas. 2001. "Isolation and Characterisation of New Gram-Negative and Gram-Positive Atrazine-Degrading Bacteria from Different French Soils." *Fems Microbiology Ecology* 36 (2–3): 211–22. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2001.tb00842.x>.
- Ryan, Robert P., Sebastien Monchy, Massimiliano Cardinale, Safiyh Taghavi, Lisa Crossman, Matthew B. Avison, Gabriele Berg, Daniel van der Lelie, and J. Maxwell Dow. 2009. "The Versatility and Adaptation of Bacteria from the Genus Stenotrophomonas." *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2163>.
- Salto, Ileana P., Gonzalo Torres Tejerizo, Daniel Wibberg, Alfred Pühler, Andreas Schlüter, and Mariano Pistorio. 2018. "Comparative Genomic Analysis of Acinetobacter Spp. Plasmids Originating from Clinical Settings and Environmental Habitats." *Scientific Reports* 8 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26180-3>.
- Sánchez-Castro, Iván, Miguel Angel Ruiz-Fresneda, Mohammed Bakkali, Peter Kämpfer, Stefanie P. Glaeser, Hans

- Jürgen Busse, Margarita López-Fernández, Pablo Martínez-Rodríguez, and Mohamed Larbi Merroun. 2017. "Stenotrophomonas Bentonitica Sp. Nov., Isolated from Bentonite Formations." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 67 (8): 2779–86. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002016>.
- Satpute, S K, B D Bhawsar, P K Dhakephalkar, and B A Chopade. 2008. "Assessment of Different Screening Methods for Selecting Biosurfactant Producing Marine Bacteria." *Indian Journal of Marine Sciences* 37 (3): 243–50.
- Schafer, Jason J., Debra A. Goff, Kurt B. Stevenson, and Julie E. Mangino. 2007. "Early Experience with Tigecycline for Ventilator-Associated Pneumonia and Bacteremia Caused by Multidrug-Resistant *Acinetobacter Baumannii*." *Pharmacotherapy* 27 (7): 980–87. <https://doi.org/10.1592/phco.27.7.980>.
- Schmidt, S. K., E. M.S. Gendron, K. Vincent, A. J. Solon, P. Sommers, Z. R. Schubert, L. Vimercati, D. L. Porazinska, J. L. Darcy, and P. Sowell. 2018. "Life at Extreme Elevations on Atacama Volcanoes: The Closest Thing to Mars on Earth?" *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*. Springer International Publishing, 1–13. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1066-0>.
- Scola, Bernard La, Vijay A K B Gundi, Atieh Khamis, and Didier Raoult. 2006. "Sequencing of the RpoB Gene and Flanking Spacers for Molecular Identification of *Acinetobacter* Species †" 44 (3): 827–32. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.3.827>.
- Scott, P., G. Deye, A. Srinivasan, C. Murray, K. Moran, E. Hulten, J. Fishbain, et al. 2007. "An Outbreak of Multidrug-Resistant *Acinetobacter Baumannii*-Calcoaceticus Complex Infection in the US Military Health Care System Associated with Military Operations in Iraq." *Clinical Infectious Diseases* 44 (12): 1577–84. <https://doi.org/10.1086/518170>.
- Seemann, Torsten. 2014. "Prokka : Rapid Prokaryotic Genome Annotation" 30 (14): 2068–69. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>.
- Segal, Heidi, Robin Thomas, and B. Gay Elisha. 2003. "Characterization of Class 1 Integron Resistance Gene Cassettes and the Identification of a Novel IS-like Element in *Acinetobacter Baumannii*." *Plasmid* 49 (2): 169–78. [https://doi.org/10.1016/S0147-619X\(03\)00011-8](https://doi.org/10.1016/S0147-619X(03)00011-8).
- Seifert, H, A Schulze, and R Baginski. 1994. "Plasmid DNA Fingerprinting of *Acinetobacter* Species Other than *Acinetobacter Baumannii* . Plasmid DNA Fingerprinting of *Acinetobacter* Species Other than *Acinetobacter Baumannii*." *Journal of Clinical Microbiology* 32 (1): 82–86.
- Seifert, Harald, Lucilla Dolzani, Raffaella Bressan, Tanny Van Der Reijden, Beppie Van Strijen, Danuta Stefanik, Herre Heersma, and Lenie Dijkshoorn. 2005. "Standardization and Interlaboratory Reproducibility Assessment of Pulsed-Field Gel Electrophoresis-Generated Fingerprints of *Acinetobacter Baumannii*" 43 (9): 4328–35. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.9.4328>.
- Serrano, Pilar Hernández. 2013. *Responsible Use of Antibiotics in Aquaculture. Journal of Chemical Information and Modeling*. Vol. 53. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- Shapiro, B. Jesse, Jean-Baptiste Leducq, and James Mallet. 2016. "What Is Speciation?" *PLOS Genetics* 12 (3): e1005860. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005860>.
- Shapiro, B. Jesse, and Martin F. Polz. 2015. "Microbial Speciation." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7 (10). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018143>.
- Shapiro, B Jesse. 2014. "Signatures of Natural Selection and Ecological Differentiation in Microbial Genomes." *Springer Science* 781. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-7347-9>.
- Shrishrimal, Kumarpal. 2012. "Recurrent *Ochrobactrum Anthropi* and *Shewanella Putrefaciens* Bloodstream Infection Complicating Hemodialysis." *Hemodialysis International* 16 (1): 113–15. <https://doi.org/10.1111/j.1542-4758.2011.00586.x>.
- Silva, Liliana, Joana Mourão, Filipa Grosso, and Luísa Peixe. 2018. "Uncommon Carbapenemase-Encoding Plasmids in the Clinically Emergent *Acinetobacter Pittii*." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 73 (1): 52–56. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx364>.
- Singh, Richa, Utkarsha U Shedbalkar, Shradhda B Nadhe, Sweetey A Wadhvani, and Balu A Chopade. 2017. "Lignin Peroxidase Mediated Silver Nanoparticle Synthesis in *Acinetobacter* Sp." *AMB Express* 7 (1). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0528-5>.
- Sommer, Morten O. A., Gautam Dantas, and George M. Church. 2009. "Functional Characterization of the Antibiotic Resistance Reservoir in the Human." *Science* 197 (4300): 215–23. <https://doi.org/10.1126/science.1176950>.

- Souza, Maria Judith De, Shanta Nair, P. A. Loka Bharathi, and D. Chandramohan. 2006. "Metal and Antibiotic-Resistance in Psychrotrophic Bacteria from Antarctic Marine Waters." In *Ecotoxicology*, 15:379–84. <https://doi.org/10.1007/s10646-006-0068-2>.
- Stanier, R. Y., N. J. Palleroni, and M. Doudoroff. 1966. "The Aerobic Pseudomonads a Taxonomic Study." *Journal of General Microbiology* 43 (2): 159–271. <https://doi.org/10.1099/00221287-43-2-159>.
- Stokes, H. W., Camilla L. Nesbø, Marita Holley, Martin I. Bahl, Michael R. Gillings, and Yan Boucher. 2006. "Class 1 Integrons Potentially Predating the Association with Tn402-like Transposition Genes Are Present in a Sediment Microbial Community." *Journal of Bacteriology* 188 (16): 5722–30. <https://doi.org/10.1128/JB.01950-05>.
- Sung, Ji Youn, Sun Hoe Koo, Semi Kim, and Kye Chul Kwon. 2014. "Epidemiological Characterizations of Class 1 Integrons from Multidrug-Resistant Acinetobacter Isolates in Daejeon, Korea." *Annals of Laboratory Medicine* 34 (4): 293–99. <https://doi.org/10.3343/alm.2014.34.4.293>.
- Svensson-Stadler, Liselott A., Sashka A. Mihaylova, and Edward R B Moore. 2012. "Stenotrophomonas Interspecies Differentiation and Identification by GyrB Sequence Analysis." *FEMS Microbiology Letters* 327 (1): 15–24. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02452.x>.
- Tacconelli, Evelina, Frangiscos Sifakis, Stephan Harbarth, Remco Schrijver, Maaïke van Mourik, Andreas Voss, Mike Sharland, Nithya Babu Rajendran, and Jesu's Rodríguez-Baño. 2017. "Surveillance for Control of Antimicrobial Resistance." *The Lancet Infectious Diseases*, 99–106. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30485-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30485-1).
- Tahrani, Leyla, Ines Mehri, Tim Reyns, Roel Anthonissen, Luc Verschaeve, Anis Bel, and Haj Khalifa. 2018. "UPLC-MS / MS Analysis of Antibiotics in Pharmaceutical Effluent in Tunisia : Ecotoxicological Impact and Multi-Resistant Bacteria Dissemination." *Archives of Microbiology* 200 (4). Springer Berlin Heidelberg: 553–65. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1467-x>.
- Tettelin, H., V. Massignani, M. J. Cieslewicz, C. Donati, D. Medini, N. L. Ward, S. V. Angiuoli, et al. 2005. "Genome Analysis of Multiple Pathogenic Isolates of Streptococcus Agalactiae: Implications for the Microbial 'Pan-Genome.'" *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (39): 13950–55. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506758102>.
- Thomas, Christopher M., and Kaare M. Nielsen. 2005. "Mechanisms of, and Barriers to, Horizontal Gene Transfer between Bacteria." *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1234>.
- Tien, Homer C., Anthony Battad, Elizabeth A. Bryce, Jeffrey Fuller, Michael Mulvey, Kathy Bernard, Ronald Brisebois, et al. 2007. "Multi-Drug Resistant Acinetobacter Infections in Critically Injured Canadian Forces Soldiers." *BMC Infectious Diseases* 7: 1–6. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-7-95>.
- Tognim, Maria Cristina Bronharo, Soraya Sgambatti Andrade, Suzane Silbert, Ana Cristina Gales, Ronald N. Jones, and Hélio S. Sader. 2004. "Resistance Trends of Acinetobacter Spp. in Latin America and Characterization of International Dissemination of Multi-Drug Resistant Strains: Five-Year Report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program." *International Journal of Infectious Diseases* 8 (5): 284–91. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2003.11.009>.
- Toleman, M. A., J. Spencer, L. Jones, and T. R. Walsh. 2012. "Bla NDM-1 Is a Chimera Likely Constructed in Acinetobacter Baumannii." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56 (5): 2773–76. <https://doi.org/10.1128/AAC.06297-11>.
- Touchon, Marie, Jean Cury, Eun Jeong Yoon, Lenka Krizova, Gustavo C. Cerqueira, Cheryl Murphy, Michael Feldgarden, et al. 2014a. "The Genomic Diversification of the Whole Acinetobacter Genus: Origins, Mechanisms, and Consequences." *Genome Biology and Evolution* 6 (10): 2866–82. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu225>.
- Touchon, Marie, Jean Cury, Eun Jeong Yoon, Lenka Krizova, Gustavo C Cerqueira, Cheryl Murphy, Michael Feldgarden, et al. 2014b. "The Genomic Diversification of the Whole Acinetobacter Genus: Origins, Mechanisms, and Consequences." *Genome Biology and Evolution* 6 (10): 2866–82. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu225>.
- Turton, J F, S N Gabriel, C Valderrey, M E Kaufmann, and T L Pitt. 2007. "Use of Sequence-Based Typing and Multiplex PCR to Identify Clonal Lineages of Outbreak Strains of Acinetobacter Baumannii." <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01759.x>.
- Turton, J F, J Matos, M E Kaufmann, and T L Pitt. 2009. "Variable Number Tandem Repeat Loci Providing Discrimination within Widespread Genotypes of Acinetobacter Baumannii," 499–507. <https://doi.org/10.1007/s10096-008-0659-3>.

- Ultee, A., N. Souvatzi, K. Maniadi, and H. König. 2004. "Identification of the Culturable and Nonculturable Bacterial Population in Ground Water of a Municipal Water Supply in Germany." *Journal of Applied Microbiology* 96 (3): 560–68. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02174.x>.
- Urszula, Guzik, Greń Izabela, Wojcieszńska Danuta, and Łabużek Sylwia. 2009. "Isolation and Characterization of a Novel Strain of *Stenotrophomonas Maltophilia* Possessing Various Dioxygenases for Monocyclic Hydrocarbon Degradation." *Brazilian Journal of Microbiology* 40 (2): 285–91. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000200014>.
- Uttatree, Sasithorn, Pakorn Winayanuwattikun, and Jittima Charoenpanich. 2010. "Isolation and Characterization of a Novel Thermophilic-Organic Solvent Stable Lipase from *Acinetobacter Baylyi*." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 162 (5): 1362–76. <https://doi.org/10.1007/s12010-010-8928-x>.
- Vallenet, David, Patrice Nordmann, Valérie Barbe, Laurent Poirel, Sophie Mangenot, Elodie Bataille, Carole Dossat, et al. 2008. "Comparative Analysis of *Acinetobacters*: Three Genomes for Three Lifestyles." *PLoS ONE* 3 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001805>.
- Vasileuskaya-Schulz, Zinaida, Sabine Kaiser, Thomas Maier, Markus Kostrzewa, and Daniel Jonas. 2011. "Delineation of *Stenotrophomonas* Spp. by Multi-Locus Sequence Analysis and MALDI-TOF Mass Spectrometry." *Systematic and Applied Microbiology* 34 (1): 35–39. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.11.011>.
- Vásquez-Ponce, Felipe, Sebastián Higuera-Llantén, María S. Pavlov, Sergio H. Marshall, and Jorge Olivares-Pacheco. 2018. "Phylogenetic MLSA and Phenotypic Analysis Identification of Three Probable Novel *Pseudomonas* Species Isolated on King George Island, South Shetland, Antarctica." *Brazilian Journal of Microbiology*. Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.02.005>.
- Vila, Jordi, Sara Martí, and Javier Sánchez-Céspedes. 2007. "Porins, Efflux Pumps and Multidrug Resistance in *Acinetobacter Baumannii*." *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59 (6): 1210–15. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl509>.
- Villalón, Pilar, Sylvia Valdezate, Maria J. Medina-Pascual, Virginia Rubio, Ana Vindel, and Juan A. Saez-Nieto. 2011. "Clonal Diversity of Nosocomial Epidemic *Acinetobacter Baumannii* Strains Isolated in Spain." *Journal of Clinical Microbiology* 49 (3): 875–82. <https://doi.org/10.1128/JCM.01026-10>.
- Vinuesa, Pablo, Luz E. Ochoa-Sánchez, and Bruno Contreras-Moreira. 2018. "GET_PHYLOMARKERS, a Software Package to Select Optimal Orthologous Clusters for Phylogenomics and Inferring Pan-Genome Phylogenies, Used for a Critical Geno-Taxonomic Revision of the Genus *Stenotrophomonas*." *Frontiers in Microbiology* 9 (MAY): 1–22. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00771>.
- Vinuesa, Pablo, and Luz Edith Ochoa-Sánchez. 2015. "Complete Genome Sequencing of *Stenotrophomonas Acidaminiphila* ZAC14D2_NAIMI4_2, a Multidrug-Resistant Strain Isolated from Sediments of a Polluted River in Mexico, Uncovers New Antibiotic Resistance Genes and a Novel Class-II Lasso Peptide Biosynthesis Ge." *Genome Announcements* 3 (6): 14–15. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01433-15>.
- Vinuesa, Pablo, Keilor Rojas-Jiménez, Bruno Contreras-Moreira, Suresh K. Mahna, Braj Nandan Prasad, Hla Moe, Suresh Babu Selvaraju, Heidemarie Thierfelder, and Dietrich Werner. 2008. "Multilocus Sequence Analysis for Assessment of the Biogeography and Evolutionary Genetics of Four *Bradyrhizobium* Species That Nodulate Soybeans on the Asiatic Continent." *Applied and Environmental Microbiology* 74 (22): 6987–96. <https://doi.org/10.1128/AEM.00875-08>.
- Vinuesa, Pablo, Claudia Silva, Dietrich Werner, and Esperanza Martínez-Romero. 2005. "Population Genetics and Phylogenetic Inference in Bacterial Molecular Systematics: The Roles of Migration and Recombination in *Bradyrhizobium* Species Cohesion and Delineation." *Molecular Phylogenetics and Evolution* 34 (1): 29–54. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.08.020>.
- Vos, Michiel. 2011. "A Species Concept for Bacteria Based on Adaptive Divergence." *Trends in Microbiology* 19 (1). Elsevier Ltd: 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.10.003>.
- Wachino, Jun Ichi, Yohei Doi, Kunikazu Yamane, Naohiro Shibata, Tetsuya Yagi, Takako Kubota, and Yoshichika Arakawa. 2004. "Molecular Characterization of a Cephamycin-Hydrolyzing and Inhibitor-Resistant Class A β -Lactamase, GES-4, Possessing a Single G170S Substitution in the ω -Loop." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48 (8): 2905–10. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.8.2905-2910.2004>.
- Walsh, Fiona. 2013. "Investigating Antibiotic Resistance in Non-Clinical Environments." *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00019>.
- Walsh, T R, A P MacGowan, and P M Bennett. 1997. "Sequence Analysis and Enzyme Kinetics of the L2 Serine Beta-

- Lactamase from *Stenotrophomonas Maltophilia*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41 (7): 1460–64. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=163940&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Weisburg, William G, Susan M Barns, Dale A Pelletier, and David J Lane. 1991. "16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study." *Journal of Bacteriology* 173 (2): 697–703. <https://doi.org/n.a>.
- Wick, Ryan R, Louise M Judd, Claire L Gorrie, and Kathryn E Holt. 2017. "Unicycler : Resolving Bacterial Genome Assemblies from Short and Long Sequencing Reads," 1–22.
- Wierzba, Slawomir. 2015. "Biosorption of Lead (II), Zinc (II) and Nickel (II) from Industrial Wastewater by *Stenotrophomonas Maltophilia* and *Bacillus Subtilis*." *Polish Journal of Chemical Technology* 17 (1): 79–87.
- Willets, Andrew, Ian Joint, Jack A. Gilbert, William Trimble, and Martin Mühling. 2012. "Isolation and Initial Characterization of a Novel Type of Baeyer-Villiger Monooxygenase Activity from a Marine Microorganism." *Microbial Biotechnology* 5 (4): 549–59. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2012.00337.x>.
- Woese, C. R., O. Kandler, and M. L. Wheelis. 1990. "Towards a Natural System of Organisms: Proposal for the Domains Archaea, Bacteria, and Eucarya." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87 (12): 4576–79. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.12.4576>.
- Wolf, Arite, Antje Fritze, Martin Hagemann, and Gabriele Berg. 2002. "*Stenotrophomonas Rhizophila* Sp. Nov., a Novel Plant-Associated Bacterium with Antifungal Properties." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02135-0>.
- Xu, Yuquan, Ming Chen, Wei Zhang, and Min Lin. 2003. "Genetic Organization of Genes Encoding Phenol Hydroxylase, Benzoate 1,2-Dioxygenase Alpha Subunit and Its Regulatory Proteins in *Acinetobacter Calcoaceticus* PHEA-2." *Current Microbiology* 46 (4): 235–40. <https://doi.org/10.1007/s00284-002-3840-4>.
- Yamamura, Shohei, Yasutaka Morita, Quamrul Hasan, Kenji Yokoyama, and Eiichi Tamiya. 2002. "Keratin Degradation: A Cooperative Action of Two Enzymes from *Stenotrophomonas* Sp." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 294 (5): 1138–43. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00580-6](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00580-6).
- Yang, Hee Chan, Wan Taek Im, Myung Suk Kang, Do Yun Shin, and Sung Taik Lee. 2006. "*Stenotrophomonas Koreensis* Sp. Nov., Isolated from Compost in South Korea." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56 (1): 81–84. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63826-0>.
- Yang, Zuoyi, Junhui Zhou, Yanbin Xu, Yaping Zhang, Haien Luo, Kenlin Chang, and Yujie Wang. 2017. "Analysis of the Metabolites of Indole Degraded by an Isolated *Acinetobacter Pittii* L1." *BioMed Research International*.
- Yoon, Jung-Hoon, So-Jung Kang, Hyun Woo Oh, and Tae-Kwang Oh. 2006. "*Stenotrophomonas Dokdonensis* Sp. Nov., Isolated from Soil." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56 (Pt 6): 1363–67. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64091-0>.
- Yun, Heather C., Clinton K. Murray, Stuart A. Roop, Duane R. Hospenenthal, Emmett Gouridine, and David P. Dooley. 2006. "Bacteria Recovered from Patients Admitted to a Deployed U.S. Military Hospital in Baghdad, Iraq." *Military Medicine* 171 (9): 821–25. <https://doi.org/10.7205/MILMED.171.9.821>.
- Zander, Esther, Ana Fernández-González, Xenia Schleicher, Cathrin Dammhayn, Witchuda Kamolvit, Harald Seifert, and Paul G. Higgins. 2014. "Worldwide Dissemination of Acquired Carbapenem-Hydrolysing Class D β -Lactamases in *Acinetobacter* Spp. Other than *Acinetobacter Baumannii*." *International Journal of Antimicrobial Agents* 43 (4). Elsevier B.V.: 375–77. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.01.012>.
- Zhan, Yuhua, Haiying Yu, Yongliang Yan, Ming Chen, Wei Lu, Shuying Li, Zixin Peng, et al. 2008. "Genes Involved in the Benzoate Catabolic Pathway in *Acinetobacter Calcoaceticus* PHEA-2." *Current Microbiology* 57 (6): 609–14. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9251-4>.
- Zhang, Hua-zhong. 2013. "The *Acinetobacter Baumannii* Group: A Systemic Review." *World Journal of Emergency Medicine* 4 (3): 169. <https://doi.org/10.5847/wjem.j.issn.1920-8642.2013.03.002>.
- Zhao, Yi He, Li Yuan Chen, Zi Jing Tian, Yue Sun, Jin Biao Liu, and Lei Huang. 2016. "Characterization and Application of a Novel Bioemulsifier in Crude Oil Degradation by *Acinetobacter Beijerinckii* ZRS." *Journal of Basic Microbiology* 56 (2): 184–95. <https://doi.org/10.1002/jobm.201500487>.