



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Evaluación de la interacción microbiana entre *Vibrio cholerae* y dos especies de *Pseudomonas* de Cuatro Ciénegas, Coahuila. México.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

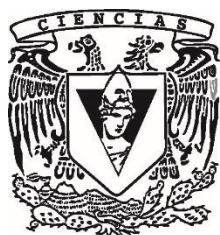
P R E S E N T A:

JAIR ANTONIO RUIZ PADILLA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. MANUEL GARCÍA-ULLOA GÁMIZ

Ciudad Universitaria, CD.MX. 2022





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 mis padres. A mi hermana. A mis abuelos, a mi tío José Luis, los recuerdo con mucho cariño y los extraño.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme ser parte de ella desde el nivel medio superior hasta culminar mi licenciatura, por darme lo necesario para formarme tanto a nivel personal, como a nivel profesional, siempre estaré orgulloso de pertenecer a la máxima casa de estudios.

A la Facultad de Ciencias por brindarme las herramientas necesarias para ejercer uno de mis mayores gustos como es el estudio de la vida.

Al Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental del Instituto de Ecología por admitirme a realizar toda esta investigación en sus espacios.

Al proyecto PAPIIT: Cómo explicar la permanencia de linajes marinos ancestrales en Cuatro Ciénegas: ¿Existe la retroalimentación eco-evolutiva en los tapetes microbianos “Domos del Arqueano”? con clave IG200319.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi tutor Dr. Manuel García Ulloa Gámiz por depositar su confianza en mí para la realización de este proyecto, por su apoyo incansable desde el inicio en el planteamiento, organización, experimentos, hasta la culminación de esta tesis. Muchas gracias por siempre hacer un espacio en su tiempo para saber cómo iba todo, por compartir todo su conocimiento, por su paciencia, por sus consejos y sobre todo por su amistad, sin duda siempre será un gran ejemplo a seguir.

A la Dra. Valeria Souza y al Dr. Luis Eguiarte por permitirme formar parte de su laboratorio, por su apoyo académico, por los comentarios en los seminarios y en mi tesis.

A mis sinodales, Dra. Gloria Soberón Chávez, Dra. Patricia Vélez Aguilar, Dra. Eria Alaide Rebollar Caudillo y Dra. Rocío Jetzabel Alcántara Hernández, por tomarse el tiempo necesario para leer mi escrito, por su paciencia, por compartir sus ideas y comentarios para que desarrollara de la mejor manera mi tesis.

A la Dra. Erika Aguirre Planter por su apoyo en cuestiones técnicas. A la Dra. Laura Espinosa Asuar por ofrecerme siempre su conocimiento en asuntos experimentales y técnicos, así como por su retroalimentación y comentarios hacia mi proyecto.

A Mariette por siempre estar al pie del cañón junto con Manuel, por sus consejos, por llevarnos de comer cuando casi no dormimos por un experimento, por siempre alentarme a seguir echándole ganas, por tus comentarios a mi proyecto, por enseñarme un poquito de lo mucho que saben de bioinformática junto con Manuel y Marisol y por su amistad.

A todos los miembros con los que tuve el gusto de compartir espacio en el Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, como son Manuel, Mariette, Helena, Yocelyn, Niza,

Memo, Fernando, Camila, Marisol, Manuel Rosas, Dulce, Liliana, Benjamín, Diego, Jazmín, por enriquecerme brindándome sus comentarios en los seminarios, por resolver mis dudas cuando se requerían, por su amistad y por hacer muy amena mi estancia en el laboratorio. A la Sra. Silvia Barrientos por proporcionarme siempre el material para mis experimentos, por su apoyo técnico y por mantener siempre el laboratorio en orden y en un ambiente muy familiar.

A mis padres, Tere y Toño, mis más sinceros agradecimientos por apoyarme siempre en mis estudios, por brindarme la orientación adecuada en toda mi vida estudiantil, por dedicar su tiempo para lograr que yo entendiera que la importancia del estudio en un futuro, por siempre apoyarme e impulsarme a perseguir mis sueños, por todo el amor que me han dado y me siguen dando, por todos los consejos que me dan para que trate de ser una mejor persona día con día, por toda su ayuda incansable siempre, sin lugar a dudas estaré en deuda toda la vida con ustedes por todo lo que me han dado, no pude tener mejores padres que ustedes, son mi ejemplo a seguir, soy muy afortunado de seguir teniéndolos conmigo, los amo con todo mi ser. Todo esto es resultado de su esfuerzo como educadores de mi vida.

A mi hermana, Vanessa, porque a pesar de ser menor que yo, me ha enseñado a ver la vida de diferentes maneras, por ser la mejor hermana del universo, por esos momentos de risas, de enojo, de ayuda, de frustración, de desvelo, por compartir conmigo una de mis más grandes pasiones como lo es el futbol, sin duda de todos esos momentos he aprendido bastante y me han ayudado a crecer como persona, todo lo que hemos vivido hasta ahorita es algo increíble que no lo cambiaría por nada. Confío plenamente en que serás una gran profesionista, eres una chica maravillosa en todos los sentidos. Siempre podrás contar conmigo en cualquier momento. Te quiero.

A mis abuelos, María y David, muchas gracias por ser mis segundos padres, por cuidarme desde que era muy pequeño, por darme todo su amor, por inculcarme los mejores valores que puede tener un ser humano, por sus consejos, por impulsarme a estudiar, por dejarme la mejor herencia como lo son sus enseñanzas y sus experiencias, siempre los recuerdo y

los llevaré conmigo en mi corazón por el resto de mi vida. Los amaré por siempre. Sé que pronto nos volveremos a reunir. Abrazos y besos hasta el cielo.

A mis abuelos, Elena y José Carmen por siempre ser buenos conmigo, por los buenos momentos que pasamos, por sus consejos, por alentarme a ser siempre buena persona, por recibirme en su casa siempre con los brazos abiertos. Nunca los olvidaré. Los amo.

A toda mi familia, mis primos/as, mis tíos, mis tías, por su apoyo incondicional siempre, por impulsarme a no darme por vencido ante cualquier adversidad, no podré nunca compensarles todo lo que han hecho por mí, y un agradecimiento especial a mi tío José Luis, por ser un ejemplo de vida, porque a pesar de tener una discapacidad logró llegar tan lejos en el ámbito académico, gracias por ser una inspiración, nunca olvidaré las charlas de motivación para no bajar la guardia en el estudio, siempre lo recordaré con una gran sonrisa. Soy bien dichoso de tener a la mejor familia. Los quiero.

A mis más grandes amigos, David, Daniel, Sergio, Erick, Juan, Emory, Dávalos, Mauricio, por todos los buenos momentos que hemos compartido. Por demostrarme su apoyo, por brindar sus ánimos y consejos. Todos hemos aprendido y aprendemos continuamente de todos.

A mis maestros por haberme proporcionado las herramientas necesarias para ser un buen estudiante y profesionalista.

A todos y cada uno de mis compañeros y amigos de la carrera, con los que tuve la fortuna de compartir grandes momentos tanto en clase como en prácticas de campo, así como por hacer muy agradable mi estancia en la Facultad.

INDICE

Resumen	9
Introducción	10
Domino Bacteria	10
Generalidades e Importancia Ecológica.....	10
Importancia económica para el humano	12
Interacciones microbianas	13
Definición e importancia.....	13
Tipos de interacciones	15
Estudio de las interacciones microbianas	17
Consecuencias del impacto humano en las interacciones sobre el ecosistema.....	19
Cuatro Ciénegas, Coahuila	21
Descripción del sitio	21
Sistema Churince.....	23
Consecuencias del problema de agua en Churince	24
Importancia del estudio en Churince	25
<i>Pseudomonas</i>	26
Generalidades.....	26
<i>Pseudomonas otitidis</i>	27
<i>Pseudomonas mosselii</i>	27
<i>Vibrio</i>	29
Generalidades.....	29
<i>Vibrio cholerae</i>	29
¿Qué se conoce de <i>Pseudomonas</i> y <i>Vibrio</i> en Churince y Cuatro Ciénegas?	31
Justificación y planteamiento del problema	33
Objetivo general	34
Objetivos particulares	35

Metodología	35
Obtención de aislados	35
Filogenia de máxima verosimilitud	35
Cinética microbiana	36
Pruebas de metabolismo en microplacas	37
Ensayos de interacción en medios sólidos	38
Resultados	40
Relación filogenética de las cepas de <i>Pseudomonas</i> (<i>P. otitidis</i> y <i>P. mosselii</i>)	40
Velocidad de crecimiento de cada cepa de <i>Pseudomonas</i> y <i>Vibrio</i>	42
Nicho potencial de cada cepa de <i>Pseudomonas</i> y <i>Vibrio</i>	45
Interacción entre <i>V. cholerae</i> con <i>P. otitidis</i> y <i>P. mosselii</i>	48
Discusión	53
Conclusión	58
Perspectiva	59
Referencias bibliográficas	60
Apéndice	78

■ RESUMEN

Los microorganismos han logrado establecerse en una gran cantidad de ambientes, en donde son responsables de distintos procesos biogeoquímicos. Gran parte de la manera en la que se encuentran distribuidos se debe a las condiciones ambientales del ecosistema, pero su presencia también es el resultado de la interacción con otros microorganismos. Asimismo, presentan una gran capacidad de resistencia y adaptación a condiciones extremas, así como a la perturbación antropogénica. En Cuatro Ciénegas Coahuila, México, la sobreexplotación del agua ha causado un gran deterioro en las pozas, lo cual seguramente tendrá efectos en todos los organismos que habitan ahí. Esta degradación ambiental progresiva nos ha llevado a estudiar el efecto de esta perturbación en las interacciones a nivel linaje. Por ello este estudio tiene como objetivo caracterizar el tipo de interacción ecológica entre *Vibrio cholerae* y dos especies de *Pseudomonas* (*P. otitidis* y *P. mosselii*) en función de la salinidad, así como determinar si la sucesión observada podría estar dada por la capacidad de consumir diversos compuestos, permitiéndoles cambiar su nicho potencial. Se realizó un tamizaje a partir de una colección que proporcionaron 17 cepas debidamente identificadas a nivel genómico como *V. cholerae*, *P. otitidis* y *P. mosselii*. Posteriormente se realizó una filogenia de máxima verosimilitud para las cepas de *Pseudomonas* (*P. otitidis* y *P. mosselii*), con marcadores moleculares concatenados (uracil 149, rpoA, trpB, gyrA, recA, lysR, mutL, aroE) y se encontró que las cepas de *P. otitidis* son genéticamente cercanas, mientras que, las cepas de *P. mosselii* son diferentes. Después se realizaron pruebas de cinética de crecimiento para cada cepa, donde se obtuvo que las cepas de *P. mosselii* tienen un crecimiento más rápido, las cepas de *P. otitidis* tienen un crecimiento lento en comparación con *P. mosselii* y *V. cholerae* tiene un crecimiento muy lento. En seguida se realizaron pruebas de metabolismo en microplacas para cada cepa, utilizando el kit de GEN III Microplate, y se encontró que *V. cholerae* y algunas cepas de *P. mosselii* tienen preferencia por compuestos como azúcares y alcoholes, mientras que el resto de las cepas de *P. mosselii* y todas las de *P. otitidis* prefieren aminoácidos, ácidos carboxílicos, ésteres. Finalmente se realizaron ensayos de interacción en medio sólido, entre las cepas de *V. cholerae* con las cepas de *Pseudomonas*, y se obtuvo que la interacción que más predominó fue el amensalismo, seguida de la depredación y el comensalismo. De esta manera, se encontró que la salinidad no fue un factor que haya propiciado la extinción de *Pseudomonas*, ya que eventualmente nunca coexistieron porque su nicho fue desplazado a raíz de la perturbación antropogénica, además de que pudo haber un intercambio de alimento entre *V. cholerae* con la comunidad microbiana sobreviviente permitiéndole de esta manera mantenerse en el ambiente.

- **Introducción**

- **Dominio Bacteria**

- **Generalidades e Importancia Ecológica**

Los microorganismos han existido en el planeta desde el origen de la vida y con el paso del tiempo han logrado diversificarse y establecerse en todos sus distintos ambientes, desde el suelo, mar, ríos, lagos y glaciares hasta ventilas hidrotermales y sitios oligotróficos e hipersalinos, donde coexisten equilibradamente (Palacios et al., 2011). Gracias a su diversidad y plasticidad metabólica, los microorganismos forman la columna vertebral de prácticamente todos los ecosistemas conocidos (Jousset, 2011), ya que son los principales responsables del funcionamiento de muchos de los ciclos biogeoquímicos esenciales para perpetuar la vida. Tal es el caso del ciclo del nitrógeno y el ciclo del carbono (Corrales et al., 2015), con lo que existieron y existen las condiciones propicias para la evolución y proliferación de organismos multicelulares (Gibbons & Gilbert, 2015). Las bacterias, son organismos procariotas unicelulares (Imagen 1-A), carecen de núcleo, sin embargo presentan un cromosoma circular que contiene su material genético (ADN). También pueden tener plásmidos que son elementos de ADN extracromosómico que se replican de manera autónoma (Loeza-Lara et al., 2004). La pared celular está compuesta por peptidoglicano, y presentan estructuras externas a la pared celular, por ejemplo, un flagelo que les permite desplazarse y/o pili como estructuras sensoriales (Madigan et al., 2015). Las bacterias se clasifican de acuerdo a distintas características como la forma (Imagen 1-B), el requerimiento de oxígeno, nutrición y composición de su pared celular (Biology Online Dictionary, 2021), entre otros; siendo así, el grupo de microorganismos con mayor diversidad de especies en el mundo. Se estima que existen 10 billones de especies (Ogunseitan, 2016), de las cuales se conocen hasta ahora aproximadamente 45 mil especies (Montaño et al., 2010). Las bacterias presentan una gran variedad de estrategias

para la conversión de energía, por ejemplo: la fermentación y la respiración aerobia-anaerobia (Varela & Grotiuz, 2008), también hacen uso de un amplio rango de sustratos y vías metabólicas especializadas para el aprovechamiento de su entorno (Horner-Devine et al. 2003). Adicionalmente las bacterias cuentan con un gran potencial para dispersarse a través de la atmósfera y el agua debido a su diminuto tamaño. Algunas especies pueden formar estructuras de resistencia como esporas y biopelículas que les permiten sobrevivir ante una amplia gama de ambientes extremos y sobrellevar el estrés ambiental en ambientes cambiantes (Jacques et al., 2010; Smith & Schuster, 2019). Además la capacidad de transferir genes de manera horizontal les permite acelerar su respuesta adaptativa, introduciendo nuevas adaptaciones en forma de genes únicos, cassettes de expresión y plásmidos a la poza génica entre las que se encuentran la resistencia a múltiples antibióticos, tolerancia a metales pesados y uso de compuestos nutritivos atípicos para la especie, entre otros (Horner-Devine et al., 2003).

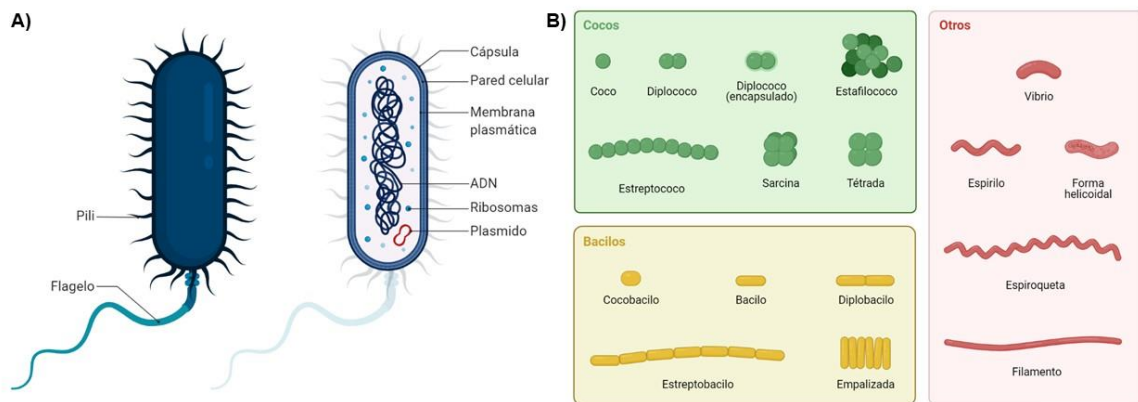


Imagen 1. A) Representación de una célula bacteriana con sus diferentes componentes. B) Diferentes morfologías de las bacterias. Modificadas en BioRender.com

□ Importancia económica para el humano

A través de los años, los científicos han logrado grandes progresos en el estudio de los microorganismos, tanto patógenos como benéficos, desarrollando múltiples aplicaciones para mejorar el bienestar humano, especialmente en el sector salud. Por ejemplo, el conocimiento de las bacterias y sus metabolitos, ha impulsado la producción de antibióticos, enzimas y productos como la insulina y otras proteínas de importancia médica (González, 2011). En contraparte, la resistencia a los antibióticos ha causado un impacto negativo en la economía global, esto debido a un deficiente control regulatorio en el consumo de los mismos (González-Mendoza et al., 2019). En el ámbito de la salud los efectos son: mayores costos de tratamiento y mayor tiempo de estancia hospitalaria, lo que conlleva un incremento significativo de gastos médicos (Ponce de León-Rosales et al., 2015). También el uso desmesurado de antibióticos de la ganadería y la agricultura, ha impactado de tal manera que grandes cantidades de antibióticos liberadas al medio ambiente, lo cual genera una presión selectiva a favor de los microorganismos resistentes (González-Mendoza et al., 2019).

Además de estudiar los microorganismos como fábricas de moléculas, la microbiología ha ampliado el entendimiento de la importante función que desempeñan los microorganismos en la agricultura y la alimentación (Madigan et al., 2015). Por ejemplo, la agricultura se beneficia del ciclaje de nutrientes que llevan a cabo microorganismos fijadores de nitrógeno, disminuyendo o inclusive eliminando la necesidad de la continua aplicación de fertilizantes costosos y contaminantes (Pedraza et al., 2010). La industria de los lácteos depende de la actividad de los microorganismos para producir ácidos fundamentales característicos de productos como quesos, yogur, mantequilla, salchichas y encurtidos (Quintero, 2018). Sin embargo los agentes patógenos presentes en los alimentos contaminados tienen un alto impacto socioeconómico por sus efectos negativos en la salud de los humanos, causando

de esta manera una gran cantidad de enfermedades infecciosas. (García-Arenal, 2012). El consumo de productos agrícolas contaminados por bacterias patógenas ocasiona severas pérdidas económicas, entre las que se incluyen, el pago de indemnizaciones a los consumidores por toxicidad bacteriana y pérdida total del producto y en el mercado internacional, el cierre de fronteras a la comercialización de estos productos (Cortés-Higareda et al., 2021). Por ejemplo, el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés) reportó que para el 2018 tuvieron una carga económica de aproximadamente \$17,600 millones de dólares debido a enfermedades transmitidas por los alimentos, a causa de diversos patógenos entre ellos *Vibrio*, *Salmonella*, *Campylobacter* y *Yersinia*, entre otros. (USDA-ERS, 2022).

Recientemente, otra aplicación de suma importancia de los microorganismos es la biorremediación, ya que muchos son capaces de biodegradar petróleo, disolventes, plaguicidas y otros contaminantes que afectan al medio ambiente (Covarrubias et al., 2015).

■ Interacciones Microbianas

□ Definición e importancia

Los patrones observables de distribución de los microorganismos son resultado de las condiciones ambientales, como la temperatura, salinidad, nutrientes, luz, humedad, pH, oxígeno, etc., que corresponden a los factores abióticos (Calixto et al., 2012) y a su respuesta adaptativa ante ellos. Sin embargo, igualmente importante es la dinámica de los factores bióticos a manera de interacciones entre los miembros de las comunidades microbianas (Widder et al., 2016). Las interacciones microbianas son medios esenciales para alcanzar un establecimiento y una permanencia exitosa en una comunidad microbiana estable (Mesquita et al., 2016). Esto se logra mediante la comunicación molecular basada

en el censo poblacional, es decir con quienes y con cuantos coexisten y diversos aspectos de la competencia inter e intra-específica, como son, ataque, la defensa y la cooperación, jugando todo en conjunto un papel importante en la evolución de las especies más allá de sólo las condiciones ambientales (Freilich et al., 2010). La exposición a moléculas de la percepción del cuórum (quorum sensing), como la acil-homoserina lactona (AHL) en bacterias Gram-negativas y péptidos autoinductores (AIP) en bacterias Gram-positivas (Waters & Bassler, 2005) promueve la comunicación entre bacterias. Este fenómeno de comunicación se ilustra en la bacteria *Allivibrio fischeri* simbiote del calamar *Euprymna scolopes*, donde *A. fischeri* produce bioluminiscencia pero, únicamente al alcanzar un determinado tamaño poblacional, el cual está en función de la concentración de AHL percibida en el ambiente. La bioluminiscencia es útil para diversos aspectos del estilo de vida del calamar (Leyton et al, 2008).

Adicionalmente las interacciones mediadas por la percepción del cuórum juegan un papel en la patogenicidad de bacterias como *Vibrio cholerae* (Hammer & Bassler, 2003), así como la adquisición de resistencia mediante la transferencia horizontal de información genética (Wintersdorff et al., 2016), esto resalta la importancia de su estudio para el tratamiento y control de enfermedades (Mesquita et al., 2016). Por otro lado el ataque y la defensa se pueden incluir en el término de competencia, el cual corresponde a una batalla constante por recursos. Ésta también tienen mecanismos específicos; entre los que destacan, la producción de antimicrobianos, la depredación, tasa de crecimiento rápido, colonización de nuevos nichos, afectación a la motilidad y la interrupción de la percepción del cuórum (Hibbing et al., 2010).

□ Tipos de interacciones

El número y tipo de interacciones en determinado ambiente dependen de la composición (especies presentes) y estructura (abundancias relativas de la especies) de las comunidades, así como de la disponibilidad de nutrientes en el ecosistema, su estabilidad y otras condiciones ambientales (Madigan et al., 2015), tales como la temperatura, salinidad (Cruz-Leyva et al. 2015), y pH (Gutierrez, 2018).

A grandes rasgos las interacciones microbianas se dividen en tres tipos; positivas, negativas y neutras (Faust & Raes, 2012). Esta categorización se realiza con base en la amplia cantidad de interacciones que se llevan a cabo en las comunidades microbianas, ya que al coexistir una gran diversidad de géneros y especies de bacterias. Las interacciones tienen un efecto sobre los interactores produciendo así fenotipos de distinta índole (Aguilar, 2018); aunque a veces no podemos fácilmente clasificar las interacciones como positivas, negativas y neutras, debido a la complejidad del estudio de los microorganismos y sus comunidades. Los fenotipos que produce cada interacción van desde un impacto positivo, donde resaltan ejemplos de mutualismo, a un impacto negativo, como el que se da cuando existe competencia, o pueden incluso no tener impacto sobre alguna de las bacterias involucradas (Lidicker, 1979).

Las interacciones positivas también conocidas como mutualismo son aquellas donde ambos microorganismos son beneficiados, es decir la coexistencia de las dos partes resulta en una adecuación mayor para ambas de la que presentarían por separado (Zabrodski, 2019). Un ejemplo de interacción positiva es el mutualismo entre el hongo *Rhizopus microsporus* y la bacteria del género *Burkholderia* como endosimbionte, que provee la capacidad de esporulación y toxinas necesarias para la infección vegetal a *Rhizopus* y a

cambio *Rhizopus* provee refugio, protección y nutrientes a *Burkholderia*, asegurando el ciclo de vida de ambos (Partida et al. 2007).

Las interacciones negativas se dividen en dos: parasitismo y antagonismo. En una interacción parasítica un microorganismo huésped, sobrevive a expensas de su hospedero sin proveer un beneficio a cambio, donde cabe resaltar que no es necesario causarle la muerte al hospedero (Zabrodskii, 2019). Como ejemplo tenemos a diversas especies patógenas de humanos del género *Salmonella* que generan diferentes infecciones sin necesidad de ocasionar la muerte, las cuales van desde problemas gastrointestinales hasta fiebre tifoidea por consumir alimentos contaminados (Hensel, 2004). Por su parte el antagonismo, es una competencia activa que puede dar como resultado un retraso o supresión completa del desarrollo de microorganismos de una especie en favor de otra o inclusive su opresión mutua (Zabrodskii, 2019). Un ejemplo de antagonismo es el observado por Pérez et al. (2013), entre cepas de *Bacillus*, de *Staphylococcus* y actinobacterias que se encontraban en cinco sitios diferentes de la Laguna Intermedia de Churince en Cuatro Ciénegas, Coahuila, México, donde cepas de *Bacillus* producían una bacteriocina inhibitoria del crecimiento de los otros grupos bacterianos en un determinado espacio.

Finalmente las interacciones neutras se dividen en dos tipos: neutralismo y comensalismo. El neutralismo ocurre cuando microorganismos que coexisten no se afectan entre sí (Begon et al., 2006). Como ejemplo tenemos especies anaerobias de los géneros *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, etcétera, en la microbiota del sistema digestivo humano, las cuales cohabitan el intestino sin competir, ni favorecerse (Guarner & Malagelada, 2003). Por otro lado en el comensalismo un microorganismo se alimenta o sobrevive gracias a algún aspecto de la biología de otro pero sin causarle un daño (Zabrodskii, 2019). Un ejemplo notable es la dinámica de uso consecutivo y aprovechamiento de residuos

metabólicos en tapetes microbianos, donde los miembros metanógenos de estas comunidades producen metano, el cual es posteriormente oxidado por metanótrofos, así como los reductores de sulfato producen sulfuro, que a su vez es oxidado por una gran variedad de organismos (Canfield et al., 2005).

□ Estudio de las interacciones microbianas

Las interacciones microbianas se pueden estudiar de manera directa e indirecta. La manera indirecta comprende el uso de modelos matemáticos como redes, co-ocurrencias y modelos dinámicos (Faust & Raes, 2012). Por ejemplo está el artículo de Berry y Widder, (2014), donde los autores utilizaron modelos de redes de co-ocurrencia y simulación de la dinámica de comunidades microbianas mediante la función Lotka-Volterra. Con ello encontraron que sí es posible hallar diversas interacciones positivas y negativas, bajo ciertas condiciones, como filtrando especies poco frecuentes, secuenciando las comunidades microbianas a gran profundidad, incluyendo una gran cantidad de muestras, etcétera. Sin embargo, los autores añaden que algunos parámetros ecológicos como muestras de ambientes diferentes, baja riqueza de especies y parámetros no ecológicos como los primers que se eligen para secuenciar. Esto representa un sesgo posiblemente por, la presencia de genes ARNr en los microorganismos cuyos genomas contienen varias copias de genes que pueden tener copias no idénticas, lo que puede modificar la interpretación e inferencia de las redes; por lo que este tipo de modelos sigue siendo una aproximación que intenta lidiar con la complejidad de las dinámicas comunitarias. Aun cuando estos métodos indirectos de redes y modelamiento de comunidades son sumamente nuevos, debido a que hace aproximadamente 15 años salieron las nuevas tecnologías de secuenciación (Raes et al., 2007 & Rubio et al., 2020), son útiles para el estudio de comunidades microbianas.

Algunas de sus limitaciones de estos modelos moleculares se deben a que sus resultados se basan en inferencias, presentando desventajas, ya que sólo revelan interacciones mutualistas (positivas) y competitivas (negativas). También presentan sesgos en las medidas de similitud y en cuanto a la elección de modelos nulos apropiados. Su interpretación no es sencilla, y las conclusiones deben extraerse con mucho cuidado para evitar errores en la información. Por ejemplo, se pueden confundir las interacciones ecológicas con otros procesos como la alimentación cruzada o la superposición de nicho, por lo que se tendrían que considerar análisis metabólicos, para explicar dichos procesos (Faust & Raes, 2012). En general, el estudio indirecto de las interacciones microbianas, sacrifica precisión y detalle, en favor del manejo y procesamiento de grandes volúmenes de información.

La manera directa de estudiar las interacciones microbianas es con ensayos experimentales, que aunque restringe su estudio a pocas cepas de organismos cultivables, provee una mayor precisión que los métodos indirectos. En estos ensayos es posible no sólo catalogar el tipo de interacción, sino también medir su magnitud en términos de área o velocidad de crecimiento. Ésta metodología se basa principalmente en ensayos de interacción en medio sólido, pudiendo suplementarlos con curvas de crecimiento y determinación de potencial metabólico para conocer mejor la ecología y preferencias de los competidores. Estos estudios pueden explicar la ecología de los microorganismos. Por ejemplo en el estudio de Vélez y colaboradores (2018), utilizaron estos ensayos con pruebas metabólicas para esclarecer que las variaciones de nutrientes en un ambiente oligotrófico suelen ser perjudiciales para las interacciones entre hongos y bacterias. También estas pruebas apoyan al sector de la medicina para la creación de antibióticos; tal es el caso del estudio de Netzker et al., (2018), donde se menciona que los ensayos de interacción han ayudado con éxito al aislamiento de metabolitos secundarios de interés para

la industria farmacéutica generando así nuevos compuestos bioactivos como los antibióticos. También existen implicaciones bioquímicas porque proporcionan información sobre la función natural de las moléculas producidas y la regulación de su formación. Por otro lado, en el estudio de Moreno y colaboradores (2017) se realizaron experimentos de interacción entre cepas del género *Aeromonas* y *Vibrio* en cajas petri y medio marino sólido, donde midieron el área de ambas cuando se encontraban en co-cultivo, así como cuando se encontraban en su respectivo control, y observaron diferencias de crecimiento entre las que competían y sus controles.

Esta metodología de interacción en cultivo, es actualmente un procedimiento estándar para investigar de manera experimental las interacciones microbianas (Moreno, 2017; Hernández, 2019). Con ello se tiene la ventaja a diferencia de los métodos indirectos, que los experimentos de cocultivo crean una comunidad artificial en un entorno controlado y, por lo tanto, se pueden manipular para que proporcionen las condiciones ambientales similares e ideales para falsear conceptos ecológicos relacionados con la estabilidad y la dinámica de la comunidad a un mayor detalle (Faust & Raes, 2012). El desarrollo y adaptación de herramientas y métodos que incluyen los ensayos *in vitro* e *in situ* siguen siendo muy necesarios para lograr una mejor comprensión de las interacciones microbianas, particularmente para ecosistemas únicos en peligro de extinción (Mesquita, et al., 2016).

□ Consecuencias del impacto humano en las interacciones sobre el ecosistema

Actualmente las actividades humanas están impactando el clima de la Tierra a un ritmo sin precedentes. El calentamiento global, la contaminación y la sobreexplotación de recursos naturales están aumentando con una gran intensidad, alterando los ambientes y con ello la

frecuencia, la periodicidad, la dirección y la magnitud de las interacciones bióticas, propiciando el colapso de comunidades enteras (Romero et al., 2018). Debido a sus cortos tiempos de generación y alta diversidad, las comunidades microbianas se encuentran entre los primeros en responder a los cambios ambientales, entre ellos están las perturbaciones antropogénicas (Hunt & Ward, 2015). Por ejemplo, esto afecta a los microorganismos de tal manera que sufren una reducción en la diversidad de especies, presentan una mayor heterotrofia y aumenta el número de microorganismos potencialmente virulentos y tóxicos en la comunidad (Labbate et al., 2016).

Uno de los principales problemas de origen antropogénico a nivel mundial es la sobreexplotación del agua, que hoy en día está llevando al agotamiento de las reservas subterráneas (García-Ulloa, 2020). Esto ocurre ya que el agua subterránea se explota extensivamente, cada vez más a tasas que exceden la recarga de los ríos durante períodos de tiempo más largos y en áreas más grandes, lo que lleva a caídas sustanciales y persistentes en los niveles de agua subterránea y bajas en su almacenamiento (De Graaf et al., 2019). El agotamiento excesivo de las aguas subterráneas afecta a las principales regiones del norte de África, Oriente Medio, Asia meridional y central, el norte de China, América del Norte y Australia, así como áreas particulares en todo el mundo (Konikow & Kendy, 2005). Entre los ecosistemas más afectados están los encontrados en las regiones áridas ya que son especialmente susceptibles a esta perturbación debido a la alta tasa de evaporación y baja precipitación anual naturales. Aunado a esto las actividades agrícolas generan desertificación y el aumento de salinización de la tierra, desequilibrando a comunidades y poblaciones de microorganismos presentes en las zonas áridas (Cui & Shao, 2005). En México uno de los lugares más interesantes en términos de diversidad microbiana así como uno de los afectados por la sobreexplotación del agua es el valle de Cuatro Ciénegas en el estado de Coahuila (Souza et al. 2018).

■ Cuatro Ciénegas, Coahuila.

□ Descripción del sitio

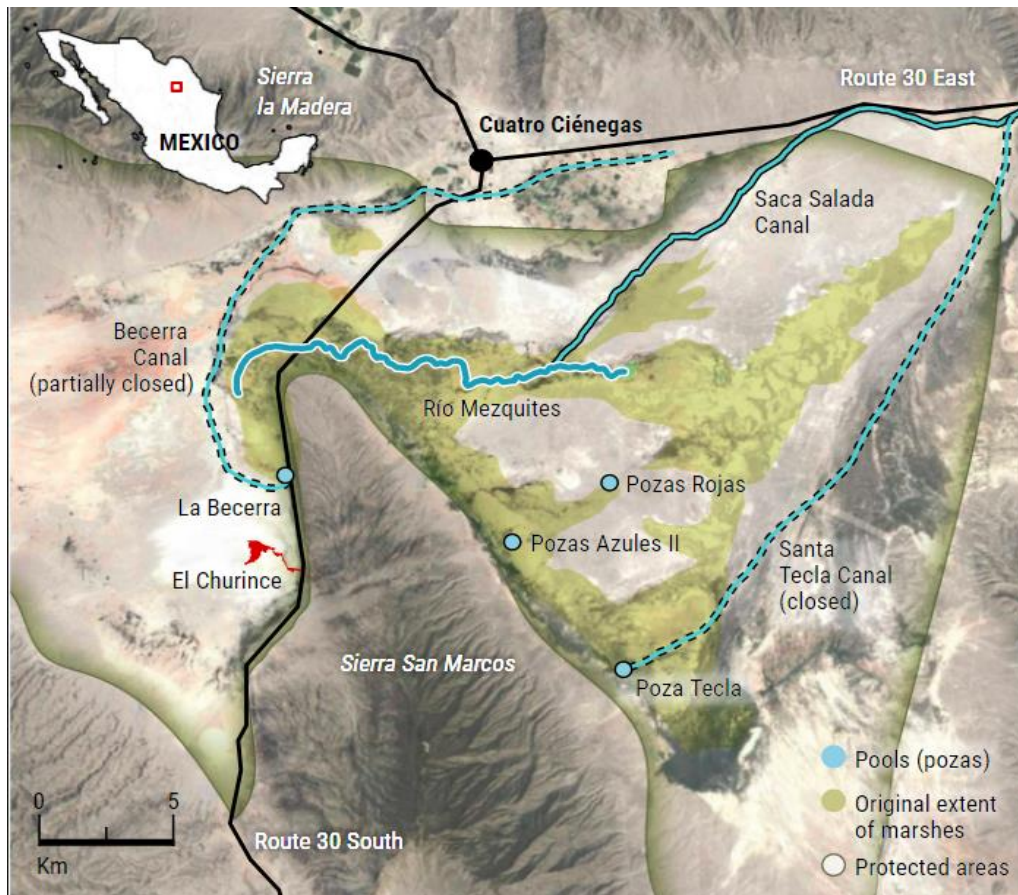


Imagen 2. Mapa de la Área de Protección de Flora y Fauna Cuatro Ciénegas (Pérez-Ortega, 2020).

La cuenca de Cuatro Ciénegas (Imagen 2) está localizada en el norte de México, en el estado de Coahuila, con una extensión de aproximadamente 84 mil hectáreas (SEMAR, 2018), a una altitud promedio de 735 m.s.n.m. El clima, según la clasificación de Köppen-Geiger es (BSh), corresponde a un clima seco, semicálido, con lluvias escasas todo el año con mayor abundancia en verano (CONABIO, 2017), la precipitación media anual es de 221 mm (García y López, 2017). Este sitio se caracteriza por sus diversos ambientes acuáticos como humedales, manantiales, canales, ríos, lagos, estanques y corrientes subterráneas. Éstos generalmente poseen aguas duras, denominadas así porque presentan una gran cantidad de sales de calcio y magnesio con sodio, potasio, sulfatos, carbonatos y cloruros

(Souza et al., 2004). Esta cuenca está rodeada de montañas que se elevan a más de 2500 metros de altura (Souza et al., 2012), las cuales forman parte de un conjunto de cinco sierras: Sierra de la Madera, Sierra Menchaca, Sierra de la Purísima, Sierra de San Marcos y Sierra de la Fragua (Johannesson, 2004). En sus sistemas acuáticos, habita una gran diversidad de microorganismos principalmente bacterias, arqueas, virus y hongos (Souza, et.al., 2006; Escalante et al., 2008; Villedas, 2018), haciéndolo un sitio de alto interés científico ya que además conserva condiciones similares a las del Cámbrico temprano (Souza, et al., 2004). Dentro de esta localidad se han realizado una gran cantidad de estudios sobre ecología y evolución microbiana, incluyendo la caracterización de especies bacterianas nuevas, presentes en las pozas de agua (Cerritos et al., 2008; Escalante et al., 2009; García-Ulloa et al., 2019), hasta análisis taxonómicos y funcionales de comunidades mediante técnicas metagenómicas, (Breitbart et al. 2008; Peimbert et al., 2012; De Anda et al., 2018).

□ Sistema Churince



Imagen 3. Reconstrucción del Sistema Churince que se encontraba al poniente de la cuenca de Cuatro Ciénegas (Pisanty et al., 2019).

Dentro de la cuenca de Cuatro Ciénegas, hay siete principales sistemas hidrográficos Becerra, Río Mesquites, Río Puente Chiquito, Tío Cándido, Santa Tecla, Río Salado de los Nadadores y Churince (Minckley, 1969 citado por Hernández et al., 2017), siendo este último el más estudiado a la fecha. El sistema Churince (Imagen 3) está compuesto por cuatro cuerpos de agua interconectados: Poza Churince y Poza Bonita como manantiales, Laguna intermedia, como un lago intermedio y Laguna Grande como el lago terminal o laguna salada de desecación, siendo todos estos cuerpos de agua muy diferentes entre sí a nivel fisicoquímico (Escalante, 2008). El inventario de este sitio fue tan extenso y exitoso que se logró reconocer al Churince como uno de los sitios más intensamente estudiados desde una perspectiva de historia natural documentando en un lapso de más de una década sus condiciones ambientales anuales así como su enorme diversidad microbiana (Souza et al., 2018).

En 2002 comenzó una gran problemática en el uso del agua como consecuencia de los recientes desarrollos asociados con compañías lecheras en los valles cercanos. Estas compañías sobreexplotaron el acuífero para irrigar miles de hectáreas de cultivo de alfalfa en el desierto, impactando gravemente los humedales (Souza et al., 2018). A pesar de los esfuerzos políticos y de conservación, en la actualidad Cuatro Ciénegas sigue estando gravemente perturbado, producto de la actividad humana, haciendo que la combinación del cambio climático, mal uso de la tierra y la sobreexplotación del agua para el riego de cosechas insostenibles en el desierto generen la extinción de comunidades que evolucionaron en un ambiente libre de estas presiones ambientales antropogénicas por millones de años (Blois et al., 2013).

❑ **Consecuencias del problema de agua en Churince.**

Churince es uno de los lugares mejor estudiados del sistema Cuatro Ciénegas, con una gran riqueza de especies primordialmente bacterias muy antiguas, a excepción de sus manantiales, Churince se secó por completo en 2017 (García-Ulloa et al., 2020). A pesar de que se prometieron diversas restauraciones y se instauraron vedas del acuífero profundo, éstas nunca se cumplieron de manera precisa y, asociado a esto, comenzaron a ocurrir eventos de desecación cada vez más severos, cambiando así, los muestreos a lo largo del tiempo (Ponce-Soto et al., 2015; De Anda et al., 2018; García-Ulloa et al., 2020). La disminución del nivel de agua generó un aumento y concentración de nutrientes y por ende, la diversidad de bacterias previamente adaptadas a un ambiente hiperoligotrófico fue disminuyendo (Ponce-Soto et al., 2015). Similarmente, el aumento progresivo en la salinidad y el fraccionamiento de Laguna Intermedia hasta 2015, alteró la trayectoria evolutiva de un linaje de *Pseudomonas otitidis* nativa de Churince, llevándola hasta su extinción local en 2016 (García-Ulloa et al., 2020). Además la perturbación afectó no sólo a nivel de linajes bacterianos, sino que también lo hizo a un nivel de comunidad. Tal es el

caso de los tapetes microbianos, cuya dinámica metabólica se vio alterada y sus interacciones negativas aumentaron considerablemente (De Anda et al., 2018).

En un estudio de caso realizado por Ponce-Soto et al., (2015) se muestra un ejemplo de cómo la actividad humana ha impactado la biodiversidad y la dinámica de la comunidad de bacterias en Cuatro Ciénegas. Diversas bacterias que suelen ser resistentes a antibióticos en entornos marinos y terrestres bajos en nutrientes, cuando el medio sufre eutrofización como consecuencia de la extracción de agua, estas bacterias pierden esa capacidad de resistencia. En este caso, los autores concluyen que las interacciones interespecíficas negativas en forma de antagonismo eran importantes en el estado oligotrófico de Churince, mientras que cuando existe eutrofización, éstas pierden relevancia. Por otro lado, De Anda et al., (2018) estudiaron cómo se pueden ver afectados los tapetes microbianos en consecuencia de la perturbación, hallando que la estructura general de la comunidad microbiana cambió, surgiendo un aumento en las interacciones negativas.

□ Importancia del estudio en Churince

Dentro de la gran diversidad de bacterias encontradas en el sistema Churince, recurrentemente se reportan Gammaproteobacterias, las cuales suelen ser fácilmente cultivables y comprenden algunos de los grupos más estudiados a nivel genético y genómico (Gomez, et.al., 2018). Dentro de las Gammaproteobacterias, dos de los linajes más importantes y conocidos debido a su importancia clínica y económica son *Pseudomonas* y *Vibrio*.

En particular de este grupo de microorganismos, han interesado las especies *Pseudomonas mosselii*, *P. otitidis* y *Vibrio cholerae*, debido a que *V. cholerae* sólo fue aislada en condiciones de perturbación severa en el año 2016. Mientras que ambas *Pseudomonas* fueron recuperadas en mayor abundancia en prácticamente todos los muestreos de estados

no perturbados de Churince desde el año 2003 (Rodríguez-Verdugo et al., 2012) y no fueron encontradas en 2016, lo cual sugiere un posible desplazamiento entre estos linajes. A su vez, este estudio es importante también para conocer la dinámica de las especies en ambientes oligotróficos como Cuatro Ciénegas en donde los efectos antagónicos y sinérgicos pueden influir significativamente en la estructura y diversidad de la comunidad de microorganismos (Moreno 2017).

■ *Pseudomonas*

□ Generalidades.

El género *Pseudomonas* se ubica dentro de la familia Pseudomonaceae. Fue descrito por primera vez en 1894 por Migula y es uno de los géneros bacterianos más diversos con especies, de las cuales algunas son patógenas de plantas, animales y humanos (Özen & Ussery, 2012). Existen aproximadamente 297 especies reconocidas y válidamente publicadas en la Lista de nombres de procariotas (Parte et al., 2020). Numerosas especies de *Pseudomonas* han sido aisladas de suelo, compuestos orgánicos, vegetación, agua y aire de todo el mundo desde la Antártida hasta los trópicos, por lo que este género altamente flexible es catalogado como cosmopolita (Peix et al., 2009). Estas bacterias se caracterizan por ser aeróbicas, Gram negativas, tienen forma de bacilo y son móviles ya que presentan un flagelo. Son mesófilas capaces de sobrevivir entre 4 a 42 °C utilizando más de 100 compuestos distintos como fuente de carbono (Guzmán, 2017).

□ *Pseudomonas otitidis*

P. otitidis es una especie de bacterias Gram-negativas descrita por primera vez en 2006 por Clark en un aislado clínico en Corea. Esta especie se ha asociado a infecciones óticas en humanos, y generalmente está muy relacionada tanto genotípicamente, como fenotípicamente con *P. aeruginosa*. (Clark et al., 2006 & Thaller et al., 2010).

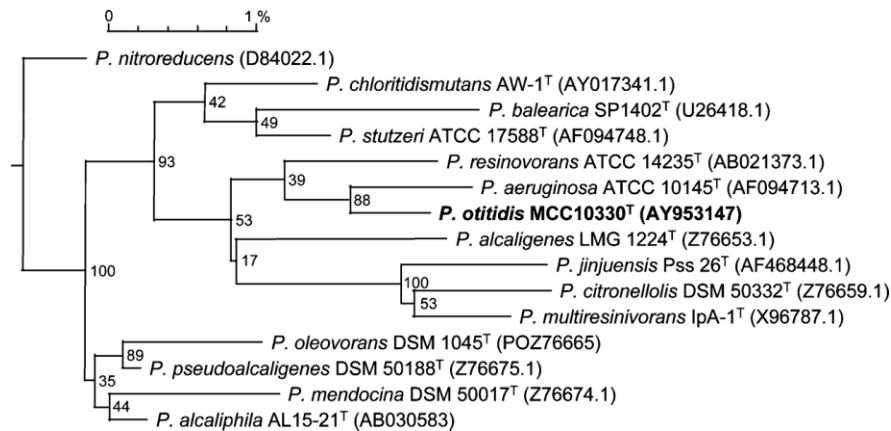


Imagen 4. Árbol que muestra la relación filogenética de *Pseudomonas otitidis* con otros miembros estrechamente relacionados del género *Pseudomonas* (Clark et al., 2006).

□ *Pseudomonas mosselii*

P. mosselii es una bacteria Gram-negativa descrita por primera vez en 2002 por Dabboussi, siendo aislada de muestras clínicas, relacionada con la bacteria ambiental *P. putida* mediante análisis del gen 16S rRNA (Dabboussi, et.al., 2002). Ambos géneros de *Pseudomonas*, al ser cepas que se han encontrado en muestras clínicas asociadas al humano y a pesar de no tener el mismo grado de patogenicidad que *P. aeruginosa*, son de importancia económica. Por ejemplo, para la industria farmacéutica pueden producir melanina como metabolito de *P. mosselii*, un compuesto con funciones importantes como agente quelante, anti proliferativa en crecimiento y desarrollo de cáncer (Trisha Mary, et.al, 2021). Además *P. mosselii*, tiene la capacidad de producir polihidroxicanoatos (PHA),

compuestos que se utilizan ampliamente en la industria, la agricultura y la acuicultura en los revestimientos de embalaje y papel, como biocombustibles, inhibidores del crecimiento de patógenos, vehículos para la liberación controlada de herbicidas, también son biocompatibles y se utilizan ampliamente en biomedicina y farmacoterapia, incluido el tratamiento de heridas, el reemplazo de válvulas cardíacas, el andamiaje de injertos vasculares, la cirugía ortopédica y la administración de fármacos (Liu et al, 2018).

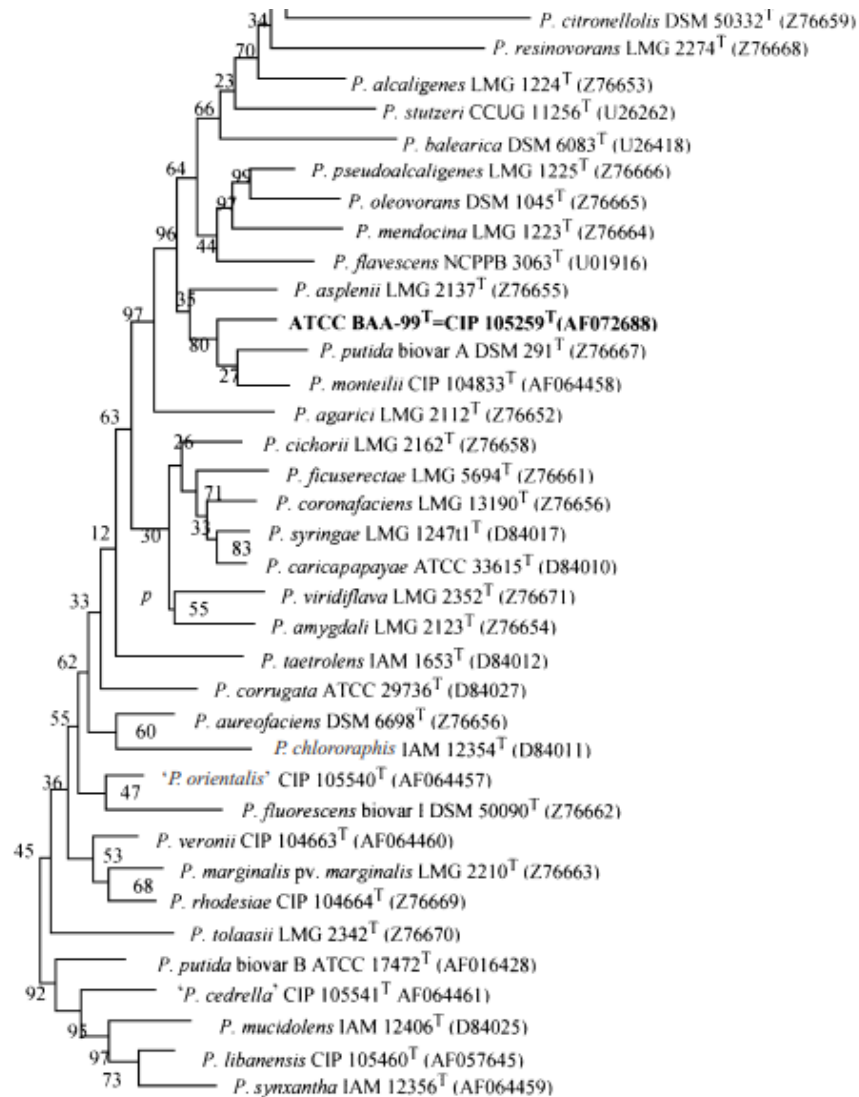


Imagen 5. Árbol que muestra la relación filogenética de *Pseudomonas mosselii* (ATCC BAA-99=CIP 105259) con otros miembros estrechamente relacionados del género *Pseudomonas* (Dabboussi et al., 2002).

■ *Vibrio*

□ Generalidades

El género *Vibrio* está compuesto por bacilos Gram-negativos aerobios y anaerobios facultativos, con una forma curva y presentan un flagelo que les permite tener movilidad. Habitan ambientes marinos y fluviales, sin embargo, su abundancia depende de la temperatura y de la salinidad del hábitat, prefiriendo condiciones entre 5 y 35 °C de temperatura y 1.0-1.5 % de salinidad (Hood & Winter, 1997). Este género cuenta con aproximadamente 84 especies de las cuales 12 son patógenas para el humano o han sido aisladas de muestras clínicas, siendo *V. cholerae* la más relevante (Álvarez et al., 2008).

□ *Vibrio cholerae*

Vibrio cholerae es una especie de bacterias Gram-negativas cuyo hábitat natural son los ecosistemas acuáticos aunque algunas cepas de esta especie están asociadas con infecciones entéricas graves en humanos como el cólera (Faruque et al., 2004). Esta especie fue descrita por primera vez por Filippo Paccini en 1854 en Italia y en ese mismo año John Snow demostró que el agua era el principal medio de diseminación del cólera (Luna, 2006 citado por Castañeda, 2009). *V. cholerae* suele encontrarse en aguas salobres y sistemas estuarios principalmente. (Chakraborty et al., 2000). En el ambiente acuático *V. cholerae* ocupa el rol ecológico de una bacteria heterotrófica típica siendo responsable en gran parte de la mineralización de la materia orgánica y el ciclaje de nutrientes (Cole 1999 ; Cotner y Biddanda 2002 citado por Cottingham, 2003). Se asocia a una amplia gama de sustratos bióticos y abióticos donde puede existir en gran abundancia (Almagro y Taylor, 2013).

Gracias a su capacidad de formar biopelículas, *V. cholerae* puede sobrevivir largos periodos de estrés, y cuando las condiciones son idóneas puede causar infecciones en humanos

(Vezzulli et al., 2010). Dentro de las 200 cepas o serogrupos que existen aproximadamente los O1 y O139 son de gran importancia médica debido a que son los causantes de la enfermedad de cólera. Sin embargo la mayoría de las otras cepas aisladas de *V. cholerae* han resultado no ser patogénicas (Lutz et al., 2013). La enfermedad de cólera es causada por la expresión de dos factores: i) una enterotoxina, la toxina colérica (CT) la cual es la responsable de producir la diarrea característica de la enfermedad (Karaolis et al., 1998), y ii) factor conocido como pilus corregulado por toxinas (TCP) que son orgánulos superficiales necesarios para la colonización intestinal (Waldor & Mekalanos, 1996). Ambos factores patogénicos están codificados por distintos genes. Para el caso del TCP, los genes son parte de un factor de colonización accesorio (TCP-ACF), también conocido como isla de patogenicidad de *Vibrio* (VPI) (Faruque & Mekalanos, 2003), para el caso de la enterotoxina CT, los genes *ctxAB* provienen del elemento genético CTX que forma parte de un bacteriófago filamentoso lisogénico denominado (CTX Φ) (Faruque et al., 1998).

Los continuos brotes de cólera a nivel global desde 1817 así como la mortalidad que genera no sólo en humanos sino en la industria acuícola donde es responsable de pérdidas de hasta el 100% en estanques de camaronicultura han vuelto a *V. cholerae* un organismo ampliamente estudiado (Lutz et al., 2013; Choi et al., citado por Gomez et al., 2018).

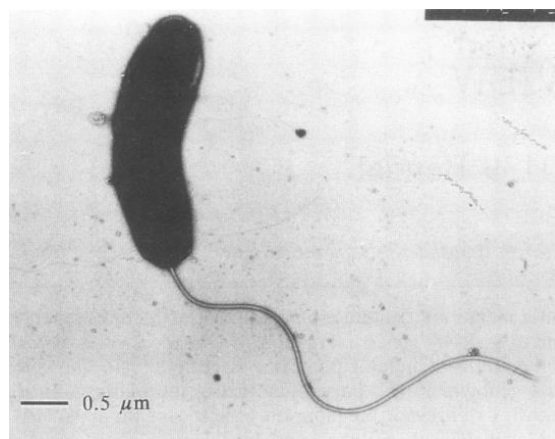


Imagen 6. Microscopia electrónica que muestra la morfología de *Vibrio cholerae* (Albert M.J., 1994).

■ ¿Qué se conoce de *Pseudomonas* y *Vibrio* en Churince y Cuatro Ciénegas?

En la cuenca de Cuatro Ciénegas se conocen aproximadamente \pm 24 tipos de especies de *Pseudomonas* (Souza et al., 2012), siendo este género uno de los más abundantes en el sitio, mientras de *Vibrio* se conocen aproximadamente \pm 6 especies ya que éstas eran muy raras o incluso ausentes en el sitio (Vázquez-Rosas-Landa et al., 2020).

A la fecha, *P. otitidis* y *P. mosselii* de Churince han sido objeto de estudio de tres publicaciones. La primera, de Rodríguez et al., (2012), en la cual describieron la diversidad microbiana que había a lo largo de las diversas estaciones, encontrando a *P. otitidis* como el linaje más predominante en verano y a *P. cuatrociengasensis*, linaje nativo de Cuatro Ciénegas descrito por Escalante et al. (2009), en invierno. Por otra parte, *P. mosselii* fue aislado por primera vez en este estudio durante el muestreo de 2004, aunque a la fecha no ha habido una publicación centrada en esta especie. La segunda publicación fue de Avitia et al., (2014) donde se describe la diversidad genética de *P. otitidis* y se infirió su historia demográfica, hallando que este linaje se encontraba en expansión desde 40,000 generaciones antes de su muestreo en 2003, durante el estado natural de Churince previo a la desecación antropogénica. El tercer reporte de García-Ulloa et al. (2020), estudió la historia evolutiva de *P. otitidis* pasando del estado normal de Laguna Intermedia al estado perturbado por la desecación antropogénica, observando una tendencia a la pérdida de diversidad genética y fuertes fluctuaciones demográficas hasta su desaparición en 2016, durante el 4to y final evento de desecación antes de la desaparición total de Laguna Intermedia en 2017.

Similarmente en Churince, *V. cholerae* fue encontrado por primera y única vez durante el 4to evento de desecación de octubre 2016, a pesar del constante esfuerzo de muestreo 2

veces al año desde hace más de una década. El hallazgo fue mencionado por García-Ulloa et al. (2020) por primera vez, pero a la fecha no se han realizado estudios sobre este linaje.

Se han realizado estudios indirectos de Churince, sobre interacciones de proteobacterias entre ellas *Pseudomonas*, esto con la finalidad de crear redes de interacción para estudiar la relación entre la oligotrofia y el antagonismo (Aguirre-von-Wobeser et al., 2013). El estudio halló que casi todas cepas de *Pseudomonas* eran antagonistas hacia las demás cepas estrechamente relacionadas y estas interacciones generalmente no son mutuas.

En otro estudio de la cuenca de Cuatro Ciénegas, se compararon genes de virulencia, en gammaproteobacterias de vida libre, entre ellas, cepas de los clados *P. aeruginosa* y *P. fluorescens* pertenecientes al género *Pseudomonas*, (Vázquez-Rosas-Landa et al., 2017). En este reporte se encontró que cepas del clado de *P. aeruginosa* no presentaban los genes de generación de la toxina exoSTUY, la cual está relacionada con las infecciones. También se encontraron en ambos clados sistemas de secreción como; el sistema de secreción tipo VI, que provoca la muerte celular entre cepas, generando así competencia entre ellas (Diggle & Whiteley, 2019) y también el tipo III, pero incompleto, el cual es común encontrarlo en cepas patógenas y controla la inyección de proteínas tóxicas al huésped (Diggle & Whiteley, 2019). Además localizaron que las cepas de los clados de *Pseudomonas* en general mostraron una gran abundancia de sistemas para la resistencia a antibióticos. A si mismo también encontraron que las cepas de *Vibrio* no cuentan con los genes *ctx*, *trh* y *tdh*, los cuales son factores de virulencia, aunque otras cepas si contaban con el gen *trx* que codifica para la toxina RTX y el sistema de secreción T3SS presente en cepas patógenas. Además se observó que esta cepa de *Vibrio* carecía de genes de resistencia a algunos antibióticos.

Recientemente se describieron 2 grupos clonales nuevos de *P. aeruginosa* que no presentan genes de pioverdina, siendo estos sideróforos importantes factores de virulencia de este linaje (García-Ulloa et al., 2019). Aunque la diversidad de *Pseudomonas* aisladas de Churince es grande (Rodríguez-Verdugo et al., 2012; Avitia et al., 2014), dos de las especies más frecuentemente aisladas son *P. otitidis* y *P. mosselii*.

Otro estudio reciente de Vázquez-Rosas-Landa et al., (2020) encontró que debido a una perturbación natural, algunas cepas de la familia Vibrionaceae pertenecientes a la biosfera rara en el estado normal del sistema, pueden sobrellevar ciclos de hambruna y expandirse cuando la disponibilidad de fósforo aumenta, lo cual sugiere una preferencia de *Vibrio* por ambientes perturbados en Cuatro Ciénegas.

■ **Justificación y planteamiento del problema**

En el sistema Churince, una gran diversidad de integrantes del género *Pseudomonas* fueron aisladas de manera regular desde 2003 hasta 2015 (Rodríguez-Verdugo et al., 2012, Avitia et al., 2014, Ponce-Soto et al., 2015, García-Ulloa et al., 2019; 2020). Mientras que *V. cholerae* fue aislado por primera vez, por casualidad, en la Laguna Intermedia durante el muestreo de octubre 2016, luego de cuatro eventos de desecación progresivamente más severos, utilizando el mismo medio de cultivo selectivo para *Pseudomonas* (PIA: *Pseudomonas* Isolation Agar). Interesantemente, el hallazgo de *V. cholerae* coincide con la desaparición de *Pseudomonas*, la cual se vio gravemente afectada luego de las primeras 3 desecaciones (García-Ulloa et al., 2020).

El hecho de que ambos linajes son generalistas que contienen especies que son patógenas, son indicadores de perturbación ambiental (Hernández, 2006; Nogales et al., 2011), y crecieron abundantemente en el mismo medio selectivo bajo la misma temperatura de cultivo, junto con la aparente sucesión de linajes, sugiere que ocupan nichos similares. Ante

la desaparición de *Pseudomonas*, esta investigación se propone como pregunta ¿Puede existir una relación de antagonismo entre ellos la cual pudo haber favorecido la desaparición de *Pseudomonas* y la proliferación de *V. cholerae*?

De esta manera, en este trabajo se estudió de manera directa la interacción ecológica entre *V. cholerae* y 2 especies de *Pseudomonas* *P. otitidis* y *P. mosselii* aisladas en Laguna Intermedia, mediante ensayos de crecimiento e inhibición en co-cultivo, bajo condiciones de salinidad normales (1.4ppt) y de perturbación (7.1ppt) (García-Ulloa et al., 2019; 2020). Adicionalmente, se realizaron ensayos de crecimiento en microplacas con distintos nutrientes así como curvas de crecimiento para describir y comparar el nicho potencial, dado por el metabolismo, de cada una de estas especies. Los resultados se evaluaron dentro de un contexto filogenético. Este estudio es importante para conocer la dinámica de las especies en ambientes oligotróficos y, particularmente en este caso, el impacto de la desecación antropogénica en Cuatro Ciénegas, donde los efectos antagónicos y sinérgicos pueden influir significativamente en la estructura y diversidad de las comunidades microbianas (Pérez-Gutiérrez et al., 2013; Aguirre-von-Wobeser et al., 2014; Ponce-Soto et al., 2015; Long et al., 2013, citado por Moreno 2017).

■ **Objetivo general**

-Caracterizar el tipo de interacción ecológica en función de la salinidad entre *Vibrio cholerae* y dos especies de *Pseudomonas* (*P. otitidis* y *P. mosselii*), aisladas de Laguna Intermedia del sistema Churince, así como determinar si la sucesión observada podría estar dada por la capacidad de consumir diversos compuestos, permitiéndoles cambiar su nicho potencial.

■ Objetivos particulares

-Conocer la relación filogenética de las cepas de *Pseudomonas* (*P. otitidis* y *P. mosselii*) antes y después de la perturbación, mediante marcadores moleculares.

-Evaluar la velocidad de crecimiento de cada cepa de *Pseudomonas* y *Vibrio*.

-Describir el nicho potencial de cada cepa de *Pseudomonas* y *Vibrio* dada su capacidad de degradación de fuentes de carbono y nitrógeno.

-Describir la interacción entre *V. cholerae* con *P. otitidis* y *P. mosselii* bajo distintas condiciones de salinidad.

■ Metodología

□ Obtención de aislados

Los 16 aislados utilizados en este trabajo fueron colectados e identificados a nivel genómico por la Dra. Ana Elena Escalante Hernández (*P. otitidis* de agosto 2003 y *P. mosselii* de enero 2004), el Biól. Manuel García Ulloa Gámiz (*P. otitidis* y *P. mosselii* de octubre 2015) y la Biól. Liliana Rodríguez García (*V. cholerae* de octubre 2016). Los aislados se crecieron en medio PIA sólido (Apéndice) durante 24 horas a 32°C, se almacenaron en glicerol al 50% y posteriormente fueron congelados. Me fueron proporcionados los aislados por la Dra. Valeria Souza, para llevar a cabo todos los análisis de este proyecto.

□ Filogenia de máxima verosimilitud

La filogenia de máxima verosimilitud se llevó a cabo utilizando los marcadores moleculares concatenados (uracil 149, *rpoA*, *trpB*, *gyrA*, *recA*, *lysR*, *mutL*, *aroE*) proporcionados por el Biól. Manuel García Ulloa Gámiz, dando una secuencia de 10,051 pb de longitud. Las secuencias son propiedad del Laboratorio de Ecología Molecular y Experimental, del

Instituto de Ecología, UNAM y se obtuvieron de los genomas de cada una de las cepas de *P. otitidis*, *P. mosselii* y *V. cholerae*. Sólo las secuencias de *P. otitidis* son públicas en NCBI con número de acceso: GCF_011319865.1, mientras que las de *P. mosselii* y *V. cholerae* aún no son públicas. Se alinearon las secuencias por separado, con el programa ClustalW y fueron concatenadas con un script en Phtyon. Posteriormente se obtuvo el mejor modelo evolutivo de los marcadores concatenados con jModelTest2. Finalmente se construyó una filogenia de máxima verosimilitud con el programa PHYML (Guindon et al., 2009). Para obtener el soporte estadístico, se realizaron 1000 bootstraps. La visualización de la filogenia se hizo con FigTree (Rambaut, 2012).

□ Cinética microbiana

Para evaluar la cinética de crecimiento de cada cepa de *Vibrio* y *Pseudomonas*, primeramente las cepas fueron sembradas en medio sólido LB e incubadas a 30 °C por 24 h. De igual manera fue preparado medio marino (apéndice) líquido con las condiciones ya establecidas anteriormente, donde la salinidad fue la variable que se modificó; uno se ajustó a una concentración de 1.4 ppt (partes por mil) y otro a 7.1 ppt (partes por mil), significando que por cada mil partes de agua, están presentes respectivamente 1.4 y 7.1 partes de soluto (sal), esto es de acuerdo a las condiciones de Churince reportadas por García-Ulloa et al. (2020). Se utilizaron tubos de vidrio estériles con 6 ml de medio marino. En cada tubo de vidrio se colocó una asada de cada cepa y su densidad óptica (DO) a 600 nm (DO600) se ajustó a 0.7. Se realizaron mediciones consecutivas de DO600 en el espectrofotómetro durante cada hora, hasta completar un total de 26 horas. Cada curva de crecimiento se realizó por triplicado. Las mediciones fueron analizadas con el software Excel para obtener unas graficas de cinética donde se comparan dos variables, la concentración con el tiempo y así poder observar las diferentes fases de crecimiento de cada una de las cepas.

Para el análisis estadístico se realizaron pruebas de permutación CGGC (Compare Groups of Growth Curves) y con el software CGGC (Elsó et al. 2004; Baldwin et al. 2007), utilizando un soporte de 1000 permutaciones. Este análisis se llevó a cabo para evaluar las diferencias entre grupos de las curvas de crecimiento.

□ Pruebas de metabolismo en microplacas

Para describir el metabolismo de cada cepa de *Vibrio* y *Pseudomonas* se utilizó el kit de Gen III MicroPlate (Biolog, 2016). El kit consta de una microplaca de 96 pozos de pruebas fenotípicas que contienen: i) 71 ensayos de utilización de carbono, como azúcares, hexosas, aminoácidos, ácidos hexosas, ácidos carboxílicos, ésteres, ácidos grasos y ii) 23 ensayos de sensibilidad química, como distintos pH, diferentes concentraciones de sales (NaCl), ácido láctico, colorantes redox, ácidos y antibióticos (Apéndice). Para inocular el microorganismo así como, el mismo kit tiene una solución IF-A para la gran mayoría de las bacterias y una solución IF-B para bacterias fuertemente reductoras y encapsuladas (Biolog, 2016). Cada una de las cepas fue sembrada en medio Luria Broth (LB (apéndice)) sólido e incubado 30°C durante 72 hrs. Los inóculos se prepararon con la solución IF-A para las cepas (9OT, 10OT, 12OT, 13OT, 15OT, 34OT, 35OT, 36OT, 41OT, 25M, 24M, 22M) y la solución IF-B para las cepas (3M, 4M Y 7V). Posteriormente la densidad óptica de los inóculos fue ajustada a una DO600 de 0.02 para todos los inóculos. Finalmente se realizó la siembra de cada inóculo en cada placa, para esto fueron colocados 100 µL en cada pozo de la microplaca hasta completar todos los 96 pozos. Ya terminadas las 15 microplacas se incubaron a 33°C durante 24 horas. Seguido del tiempo de incubación fueron revisadas para ver si los pozos habían cambiado de color, significando esto la degradación de cada compuesto, después fueron comparadas y fotografiadas.

Para los análisis estadísticos se realizó una matriz de distancia UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages) calculada con base en el crecimiento (o ausencia del mismo) de las cepas en las microplacas con el software DendroUPGMA utilizando el método de correlación de Pearson y un soporte estadístico de 100 Bootstraps, esto con el propósito de relacionar las cepas que son más cercanas entre sí de acuerdo a su perfil metabólico. Posteriormente, se realizó un análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) con el software R-Studio para observar la distribución de las cepas de acuerdo a su metabolismo. Finalmente se realizó una gráfica de barras con el software Excel, para visualizar el desglose del tipo de compuestos preferidos por cada una de las cepas.

□ **Ensayos de interacción en medios sólidos**

Se cultivaron los aislados de todas las especies en medio LB sólido a 30°C por 24 horas para obtener la biomasa para los inóculos iniciales para los ensayos de interacciones. Se tomó una asada para cada cepa de las bacterias y cada muestra fue colocada dentro de un tubo eppendorf con 1000 µL de solución salina estéril (10%), las cuales se llevaron al vórtex para homogeneizar y se midieron sus DO600nm. Cada tubo se ajustó a una DO600 inicial de 0.7 (Moreno, 2017).

Para asemejar las condiciones ambientales de Churince, se prepararon cajas petri con medio marino sólido con dos distintas salinidades que corresponden al estado normal (1.4 ppt) y perturbado (7.1 ppt) de Laguna Intermedia (García-Ulloa et al., 2020). Posteriormente, se realizaron los ensayos de interacción. Para esto en cada caja petri de medio marino sólido tanto de salinidad baja, como de salinidad alta, se colocó una gota de 5 µL de cada inóculo inicial, dejando una distancia de 3 mm entre competidores (Moreno, 2017; Hernández, 2019). En este caso entre una cepa de *Vibrio* y *Pseudomonas*, realizando

también controles, inoculando las cepas por si solas en una caja. Los ensayos y controles se llevaron a cabo por triplicado. Se esperó a que se secaran el excedente de los inóculos, para evitar escurrimiento, lo cual generaría error en los resultados. Los inóculos secos se incubaron a 30 °C durante 8 días. Se realizó un registro fotográfico durante los días 1, 2, 4, 6 y 8 para cada caja de interacción y de control incubados. Posterior al registro cada interacción, así como sus controles fueron analizados con el software ImageJ, con el objetivo de medir el área de crecimiento de cada una de las cepas y controles durante los 8 días que se llevó a cabo el experimento.

Para los datos obtenidos se analizó la normalidad con la prueba de Shapiro-Wilk. Sin embargo se obtuvieron pocos datos normales, por lo que se hicieron transformaciones a logaritmo base 2 y logaritmo base 10, obteniendo de igual manera los mismos datos no normales (Apéndice). Se determinó correr pruebas de medias tanto paramétricas, como no paramétricas en las comparaciones que implicaron esos datos vs datos normales y hubo coincidencia entre las pruebas, por lo que los resultados son válidos. Posteriormente con el software IBM SPSS statistics 19, se probó la homocedasticidad, es decir que tanta varianza poseen los datos, esto se realizó con la prueba de Lavene's. Dependiendo si el resultado tenía un valor mayor a 0.05 se realizaban las pruebas paramétricas de T-Student, mientras que si el valor era menor a 0.05 se realizaba la prueba de Welch. Por su parte la prueba no paramétrica se realizó con el test de U-Mann-Whitney. (Apéndice).

Dichas pruebas de diferencias de medias, nos arrojarían si había o no diferencias significativas entre el crecimiento promedio de las cepas controles y las cepas en cocultivo, es decir en las interacciones. Finalmente se generaron boxplots en el programa R-Studio para observar y comparar las diferencias obtenidas.

■ Resultados

□ Relación filogenética de las cepas de *Pseudomonas* (*P. otitidis* y *P. mosselii*)

Con el objetivo de conocer la relación filogenética entre las especies de *Pseudomonas* (*P. otitidis* y *P. mosselii*) antes y después de la perturbación, se obtuvo una filogenia (**Figura 1**) en donde se pueden observar las 16 diferentes cepas. Éstas están separadas por especie, teniendo que las cepas que terminan en (OT) pertenecen a la especie *P. otitidis*, mientras que las que terminan en (M) corresponden a *P. mosselii*. Todas las cepas de *P. otitidis* son genéticamente cercanas, y no existe una separación a nivel filogenético entre las cepas muestreadas en 2003 (9OT, 10OT, 12OT, 13OT, 15OT) representadas en color verde claro y las de 2015 (34OT, 35OT, 36OT, 41OT) representadas en color verde intenso. En tanto, en *P. mosselii* sí se observan diferencias entre las cepas de 2004 (1M, 3M, 4M, 5M) representadas en color naranja y 2015 (25M, 24M, 22M) representadas en color rojo y mostraron una marcada separación en dos clados, por un lado se agrupan las cepas de 2004 y por otro lado las de 2015, revelando que no son genéticamente semejantes. Además, las cepas de 2004 se agrupan en dos clados más pequeños (1M, 3M, 4M Y 5M), evidenciando también que hay entre ellas diferencias genéticas.

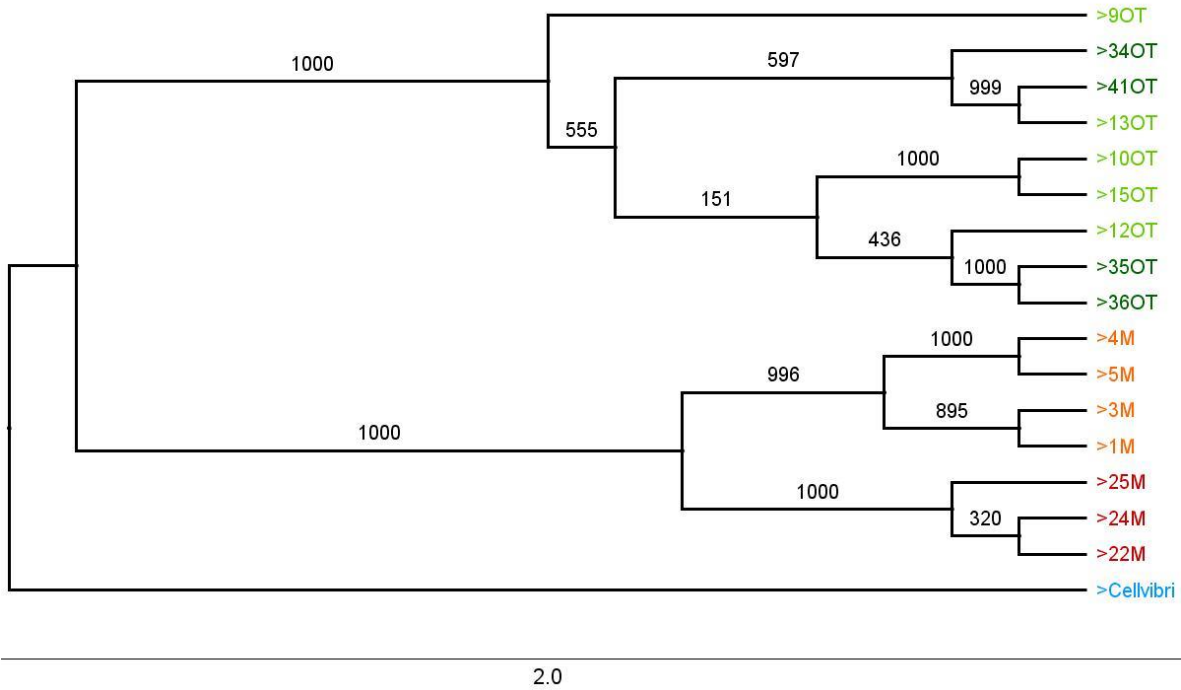


Figura 1. Filogenia de máxima verosimilitud construida con marcadores moleculares (16S, uracil 149, *rpoA*, *trpB*, *gyrA*, *recA*, *lysR*, *mutL*, *aroE*). Arriba de las ramas se muestra el soporte estadístico obtenido mediante 1000 bootstraps. Debajo de la filogenia se muestra la escala según el número de sustituciones por longitud dada. Las cepas que terminan con el sufijo (OT) señalan a *P. otitidis* y las que terminan con el sufijo (M) a *P. mosselii*. Las cepas (OT) de color verde claro corresponden al muestreo de 2003 y las de color verde intenso al muestreo de 2015. Las cepas (M) de color naranja corresponden al muestreo de 2004 y las de color rojo al muestreo de 2015. La barra debajo del árbol representa la longitud de las ramas. Las cepas ya habían sido identificadas en trabajos previos con sus cepas de referencia en figura 8 y 9 (Apéndice).

□ Velocidad de crecimiento de cada cepa de *Pseudomonas* y *Vibrio*

Con el objetivo de evaluar la velocidad de crecimiento de cada cepa de *Pseudomonas* y *Vibrio* analizamos la cinética de crecimiento. En la **Figura 2** se observan las distintas cinéticas microbianas correspondientes a cada cepa de las especies *P. mosselii*, *P. otitidis* y *V. cholerae*, en ellas se pueden observar las diferentes fases del crecimiento microbiano. La fase de latencia, que corresponde a la etapa donde los microorganismos comienzan la actividad metabólica para poder iniciar la multiplicación celular, tiene una duración de dos horas para *P. otitidis* y *V. cholerae* (**Figura 2-A y C**) y es variable, y para *P. mosselii* fue entre menos de una hora y dos horas (**Figura 2-B**). Posteriormente, se encuentra la fase exponencial (también llamada logarítmica), caracterizada por la división celular de los microorganismos a una velocidad constante, generando así un gran aumento del número total de células viables. En esta fase las tres especies difieren en el tiempo; *P. mosselii* (**Figura 2-B**) presenta la fase exponencial más corta, sin embargo las cepas 3M, 4M y 5M, aisladas antes, en el estado normal de Churince, tienen una fase exponencial de 4 horas, mientras que la de las cepas 22M, 24M y 25M es de seis horas. Entre las *P. mosselii*, la cepa 5M es la que alcanzó una notablemente mayor concentración de células en la muestra. Por otra parte *P. otitidis* (**Figura 2-A**) cuenta con una duración de la fase exponencial de 12 horas, todas sus cepas con un crecimiento semejante, es decir no se logra diferenciar entre las cepas del estado normal y el estado perturbado. Por su parte, para *V. cholerae* (**Figura 2-C**) solamente se obtuvieron 24 horas de duración de su fase exponencial, la cual está incompleta, debido a que su crecimiento fue considerablemente más lento que *P. mosselii* y *P. otitidis*. Finalmente se encuentra la fase estacionaria, donde los microorganismos suspenden su crecimiento, a consecuencia del agotamiento de nutrientes y por la acumulación de productos tóxicos, y la tasa de mortalidad alcanza un grado similar a la tasa de duplicación, por lo que la población se mantiene constante (Varela & Grotiuz, 2006). En

esta fase, *P. mosselii* alcanzó su fase estacionaria más rápido como resultado de su crecimiento acelerado permaneciendo las últimas 18 horas de registro en dicha fase (**Figura 2-B**), seguida de *P. otitidis* que tuvo un crecimiento medianamente rápido alcanzando a reportar 12 horas de dicha fase (**Figura 2-A**). Finalmente *V. cholerae* no logró alcanzar esa fase estacionaria, ya que su crecimiento fue muy lento (**Figura 2-C**).

Al comparar si existen diferencias en las curvas de crecimiento dentro de cada grupo (*P. mosselii*, *P. otitidis* y *V. cholerae*) y entre grupos, se obtuvo que no existen diferencias significativas dentro de cada grupo, ya que todos los valores de *p* son mayores a 0.05, mientras que al comparar entre grupos si existen diferencias significativas, ya que los valores de *p* fueron menores a 0.05 (**Figura 3**)

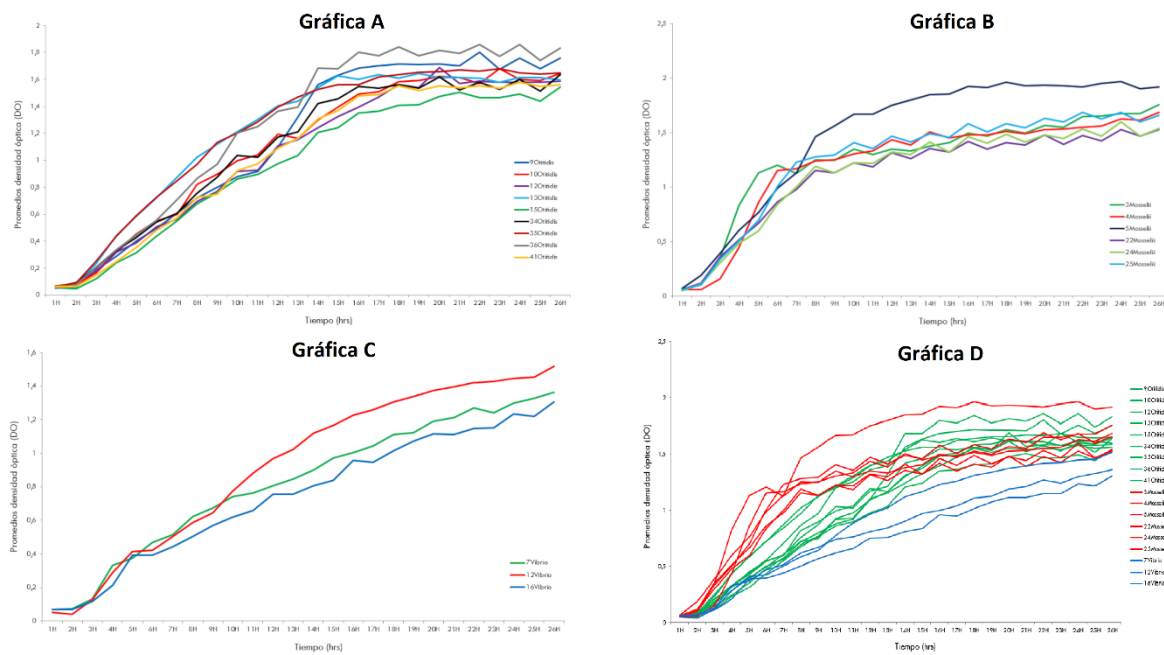


Figura 2. Este conjunto de gráficas representa las cinéticas de crecimiento en medio marino líquido, de las cepas de este estudio. Cinética de crecimiento de *P. otitidis* (A). Cinética de crecimiento de *P. mosselii* (B). Cinética de crecimiento de *V. cholerae* (C). Cinéticas agrupadas (D (rojo-*P.mosselii*; verde-*P.otitidis*; azul-*V. cholerae*)).

V. cholerae

The number of lines of data processed (excluding the heading line) = 9
 The number of unique groups entered = 3
 The number of time points entered = 26
 The number of permutations selected = 1000

Group1	Group2	Stat	P.Value	adj.P.Value
1	V12 V16	1.505	0.094	0.282
2	V12 V7	-0.876	0.404	0.786
3	V16 V7	1.003	0.393	0.786

P. otitidis, P. mosselii y V. cholerae

The number of lines of data processed (excluding the heading line) = 66
 The number of unique groups entered = 3
 The number of time points entered = 26
 The number of permutations selected = 1000

Group1	Group2	Stat	P.Value	adj.P.Value
1	H OT	-2.78	0	0
2	H V	8.39	0	0
3	OT V	7.18	0	0

P. otitidis

The number of lines of data processed (excluding the heading line) = 27
 The number of unique groups entered = 9
 The number of time points entered = 26
 The number of permutations selected = 1000

Group1	Group2	Stat	P.Value	adj.P.Value
1	100T 120T	0.7075	0.402	1
2	100T 130T	-2.2556	0.097	1
3	100T 150T	2.1639	0.103	1
4	100T 340T	-0.1559	1.000	1
5	100T 350T	-2.8531	0.102	1
6	100T 360T	-1.7440	0.204	1
7	100T 410T	1.0470	0.214	1
8	100T 90T	0.5318	0.522	1
9	120T 130T	-2.8458	0.091	1
10	120T 150T	1.6661	0.282	1
11	120T 340T	-0.7271	0.422	1
12	120T 350T	-3.4074	0.099	1
13	120T 360T	-2.6931	0.106	1
14	120T 410T	0.6026	0.594	1
15	120T 90T	1.5842	0.200	1
16	130T 150T	5.4787	0.103	1
17	130T 340T	3.0965	0.099	1
18	130T 350T	-0.6120	0.319	1
19	130T 360T	-0.1166	0.703	1
20	130T 410T	4.3707	0.102	1
21	130T 90T	-1.4809	0.103	1
22	150T 340T	-2.7021	0.093	1
23	150T 350T	-6.2546	0.095	1
24	150T 360T	-4.3616	0.114	1
25	150T 410T	-1.3460	0.190	1
26	150T 90T	3.0624	0.097	1
27	340T 350T	-3.6738	0.094	1
28	340T 360T	-2.2882	0.103	1
29	340T 410T	1.3234	0.297	1
30	340T 90T	0.7234	0.326	1
31	350T 360T	0.9925	0.890	1
32	350T 410T	5.2808	0.090	1
33	350T 90T	-2.2439	0.103	1
34	360T 410T	3.2689	0.106	1
35	360T 90T	-1.7995	0.207	1
36	410T 90T	1.5153	0.204	1

P. mosselii

The number of lines of data processed (excluding the heading line) = 24
 The number of unique groups entered = 8
 The number of time points entered = 26
 The number of permutations selected = 1000

Group1	Group2	Stat	P.Value	adj.P.Value
1	1H 22H	-0.272	0.507	1
2	1H 24H	0.254	0.591	1
3	1H 25H	-2.566	0.104	1
4	1H 2H	-0.502	0.511	1
5	1H 3H	-1.594	0.114	1
6	1H 4H	-1.315	0.107	1
7	1H 5H	-4.520	0.080	1
8	22H 24H	-0.132	1.000	1
9	22H 25H	-2.913	0.100	1
10	22H 2H	1.970	0.095	1
11	22H 3H	2.803	0.109	1
12	22H 4H	0.830	0.209	1
13	22H 5H	4.428	0.078	1
14	24H 25H	-2.337	0.102	1
15	24H 2H	1.563	0.081	1
16	24H 3H	2.158	0.091	1
17	24H 4H	0.970	0.199	1
18	24H 5H	4.093	0.097	1
19	25H 2H	-0.628	0.299	1
20	25H 3H	-0.186	0.783	1
21	25H 4H	-0.845	0.408	1
22	25H 5H	2.774	0.110	1
23	2H 3H	-0.499	0.414	1
24	2H 4H	-0.137	0.795	1
25	2H 5H	-3.633	0.112	1
26	3H 4H	1.214	0.090	1
27	3H 5H	-2.905	0.105	1
28	4H 5H	-3.152	0.103	1

Figura 3. Se muestran las tablas con los valores de p obtenidos con la prueba estadística de permutación CGGC. La tabla con bordes azules corresponde a los valores dentro del grupo de *V. cholerae*. La tabla con bordes verdes corresponde a los valores dentro del grupo de *P. otitidis*. La tabla con bordes rojos corresponde a los valores dentro del grupo de *P. mosselii*. La tabla con bordes negros corresponde a los valores entre los grupos (*P. otitidis*, *P. mosselii* y *V. cholerae*).

□ Nicho potencial de cada cepa de *Pseudomonas* y *Vibrio*

Con el objetivo de describir el nicho potencial de cada cepa de *Pseudomonas* y *Vibrio* dada su capacidad de degradación de fuentes de carbono y nitrógeno, analizamos el metabolismo de cada una de las cepas de *P. mosselii*, *P. otitidis* y *V. cholerae*. En la **Figura 4-A**, correspondiente al árbol de UPGMA, se muestra la relación entre los metabolismos y las cepas de *P. mosselii*, *P. otitidis* y *V. cholerae*. Se observa que la cepa 7V de *V. cholerae* se agrupa con las *P. mosselii* de antes, las cuales corresponden a las cepas 3M, 4M y 5M, presentando un metabolismo generalista, muy similar, y que comprende la gran mayoría de los compuestos de las microplacas (**Figura 5**). Mientras que las cepas 22M, 25M y 24M se agrupan aparte siendo éstas las que se encontraron en el ambiente perturbado de 2015. Por otra parte al igual que en la filogenia las cepas de *P. otitidis* (9OT, 12OT, 36OT, 35OT, 15OT, 34OT, 41OT, 10OT y 13OT) forman un mismo grupo sin importar el tiempo de muestreo, presentando un metabolismo similar. Contrastantemente las cepas 12V y 16V de *V. cholerae* tuvieron metabolismos muy diferentes a todas las demás, pero similares entre si colocándose cercanas en la matriz.

En el PCA (**Figura 4-B**) se puede apreciar la correlación que hay entre las cepas y el tipo de compuestos que éstas consumen. El componente principal 2 (PC2) separa a *V. cholerae* que se encuentra arriba, de *P. mosselii* y *P. otitidis* que se encuentran abajo, mientras que el componente principal (PC1) separa a las que tienen un metabolismo más enfocado en el uso de azúcares y algunos alcoholes (7V, 3M, 4M, 5M), de las cuales su metabolismo es más variado, exceptuando las cepas de vibrio 12V y 16V, cuyo metabolismo es el menos diverso de todos, consumiendo una mayor cantidad de aminoácidos por 16V y ácidos hexosas por 12V, además de que ambas consumen la gran parte de los antibióticos presentes en la microplaca. Este resultado coincide la información obtenida con la matriz UPGMA (**Figura 4-A**), donde la cepa 7 de *Vibrio cholerae* (7V en el PCA), se encuentra

agrupada junto con las cepas 3M, 4M, 5M de *P. mosselii*, siendo éstas cuatro cepas las más generalistas basando su dieta en el consumo de una mayor cantidad de azúcares como se muestra en la **Figura 5**. Por su parte, las cepas 22M, 24M, 25M de *P. mosselii* y todas las cepas de *P. otitidis* son de igual manera generalistas consumiendo porciones pequeñas de azúcares y una mayor cantidad de aminoácidos, ácidos carboxílicos, ésteres y ácidos grasos tal como se muestra en la **Figura 5**.

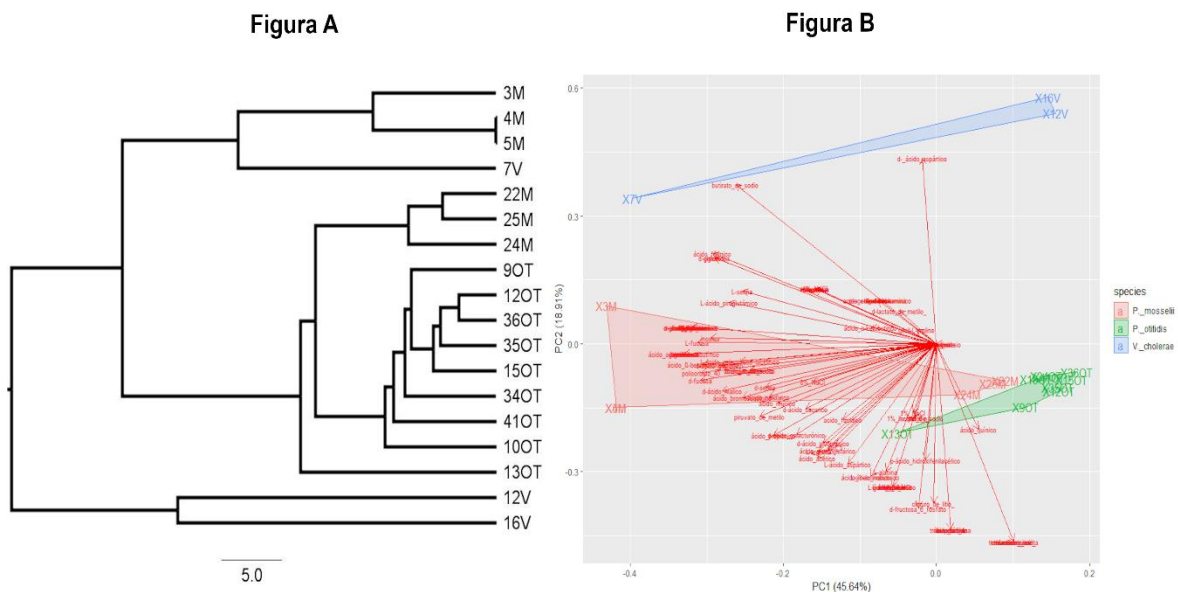


Figura 4. En el panel A se muestra el árbol de UPGMA construido a partir del perfil metabólico obtenido de las microplacas con el programa DendroUPGMA, obtenido a partir de correlaciones de Pearson y un soporte de 100 bootstraps. El sufijo OT corresponde a *P. otitidis*, M a *P. mosselii* y V a *V. cholerae*. En el panel B se observa el análisis de componentes principales (PCA) entre cada una de las cepas de *Pseudomonas* y *Vibrio* con respecto a su metabolismo tomando en cuenta la prueba con microplacas Biolog. Las cepas de color azul corresponden a *Vibrio cholerae*, las cepas de color rojo corresponden a *Pseudomonas mosselii* y las cepas de color verde corresponden a *Pseudomonas otitidis*.

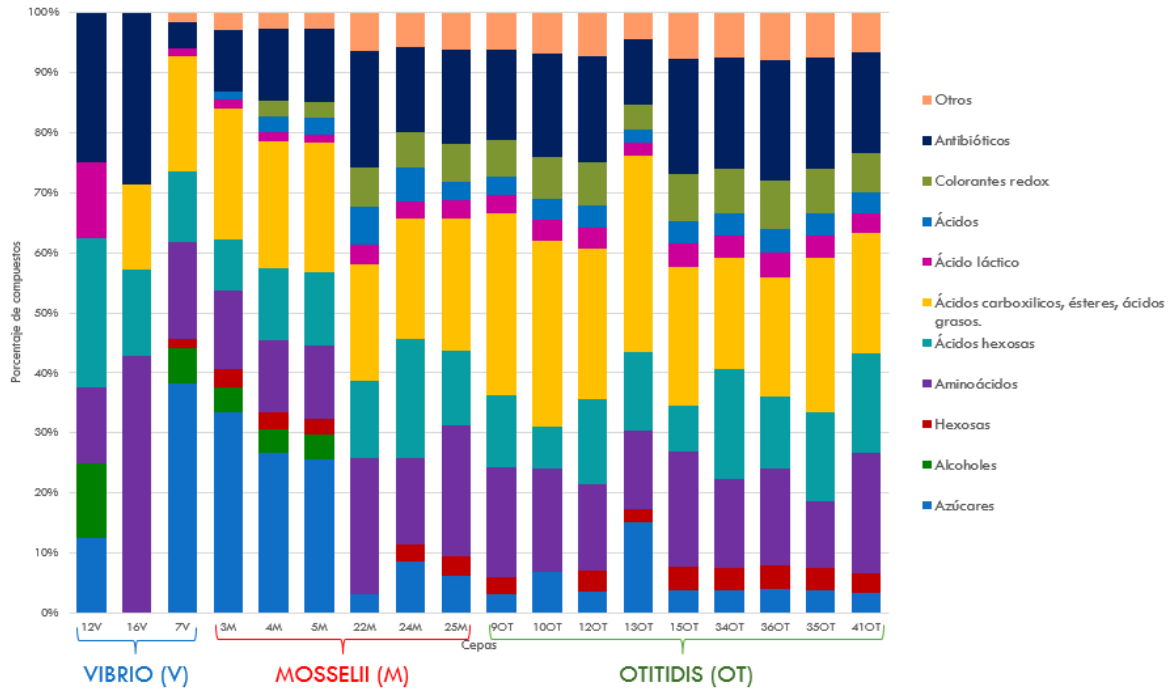


Figura 5. Gráfica de barras que representan el porcentaje de compuestos que consume cada cepa microbiana. Las cepas dentro del cuadro rojo corresponden a *P. mosselii*, las cepas dentro del cuadro verde corresponden a *P. otitidis* y las cepas dentro del cuadro azul corresponden a *V. cholerae*.

□ Interacción entre *V. cholerae* con *P. otitidis* y *P. mosselii*

Con el objetivo de describir la interacción entre *V. cholerae* con *P. otitidis* y *P. mosselii* bajo distintas condiciones de salinidad, analizamos todas las interacciones posibles, así como los cultivos controles, para determinar cómo se comportan esas especies conviviendo juntas. Al comparar todos los controles en medio marino de baja salinidad y en medio marino de alta salinidad, se encontró que *P. otitidis* (34OT) y *P. mosselii* (1M, 3M, 4M) mostraron valores diferencias significativas, es decir, se encontraron diferencias debido a que tuvieron un mejor crecimiento en el medio marino de baja salinidad que en el medio marino de alta salinidad. Por su parte, *V. cholerae* (7V), *P. otitidis* (10OT), *P. mosselii* (5M, 22M, 24M, 25M) no presentaron diferencias significativas, es decir que no tuvieron preferencia por algún medio en especial, tal como se observa en la **Figura 6**. La tabla de valores donde se encuentran si las diferencias son significativas o no, se encuentran en la **Tabla 6** en el **apéndice**.

Por otra parte en la **Tabla 1** se muestran todos los tipos de interacción que se encontraron en este estudio. Para determinar el tipo de interacción que les corresponde, se analizaron las pruebas estadísticas y los gráficos de caja-bigote de las **Figuras 10, 11 y 12** del **apéndice** para cada cepa de *P. otitidis*, *P. mosselii* y *V. cholerae*. Por ejemplo, en el caso de 10OT vs 7V, primero se observó en el gráfico de *P. otitidis* (10OT) para ver si existía una diferencia significativa ya sea negativa o positiva, en el caso de que se presentara, con respecto a su control. Sin embargo como no existió diferencia se le colocó el valor de (0), por otra parte, para el caso de *V. cholerae* (7V) se utilizó el mismo procedimiento y se encontró que si existe diferencia significativa positiva con respecto a su control, por lo que se le colocó el valor de (+), obteniendo de así el tipo de interacción: (+)(0) que corresponde al comensalismo. En el caso donde las cepas se encontraron diferencias significativas

negativas, es decir que su área disminuyó con respecto a su control, se les colocó el valor de (-).

De esta manera, se puede observar en la **Tabla 1** que los co-cultivos entre *V. cholerae* (7V) y *P. otitidis* (OT) tuvieron una mayor variedad de interacciones, obteniendo así, una interacción de tipo positivo, como comensalismo, dos interacciones de tipo negativas, como parasitismo/depredación y competencia, y una interacción de neutralismo. Mientras que en los co-cultivos entre *V. cholerae* (7V) y *P. mosselii* (M) sólo se obtuvieron dos interacciones, una de neutralismo y dos de tipo negativas como el amensalismo y competencia. Por otra parte se observa de una manera general de los co-cultivos que en el estado normal (baja sal) se encontraron más diversidad de interacciones que en el estado perturbado (alta sal). Cabe destacar que las interacciones negativas de competencia y parasitismo/depredación, a simple vista no son evidentes la presencia de halos de inhibición, ni el consumo de una bacteria hacia otra, tal y como se observa en las **Imágenes 7, 8 y 9**.

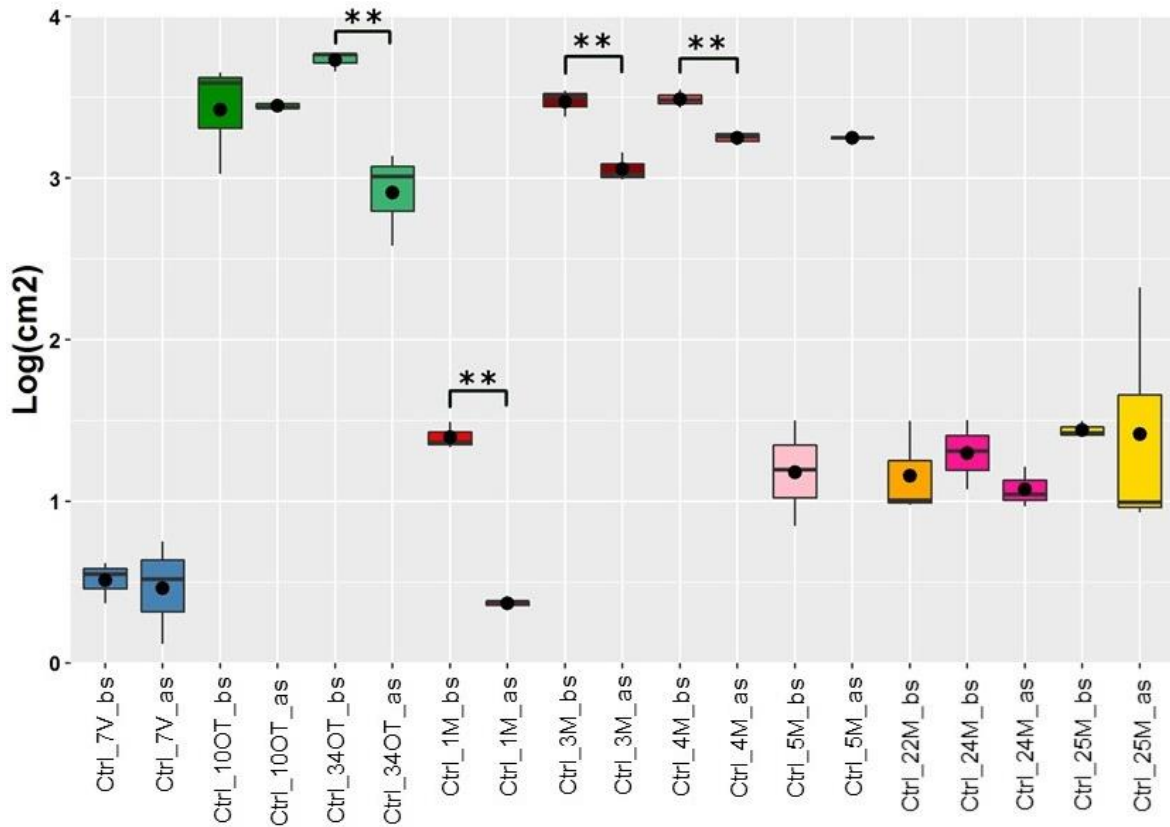


Figura 6. Diagrama de caja y bigotes que representan las diferencias significativas, obtenidas con la prueba estadística no paramétrica de U-Mann Whitney, entre el crecimiento de las cepas, únicamente controles en baja salinidad (bs) y alta salinidad (as) de *V. cholerae* (7V), *P. mosselii* (M) y *P. otitidis* (OT). ** corresponde a que hubo diferencias significativas entre baja sal y alta sal.

Competencia	Estado normal (baja sal)	Estado perturbado (alta sal)
10OT vs 7V	(V) (+)(0)	(-)(-)
34OT vs 7V	(V) (+)(-)	(0)(0)
1M vs 7V	(V) (-)(0)	(M) (-)(0)
3M vs 7V	(-)(-)	(M) (-)(0)
4M vs 7V	(M) (-)(0)	(M) (-)(0)
5M vs 7V	(0)(0)	-
22M vs 7V	(M) (-)(0)	-
24M vs 7V	(M) (-)(0)	(M) (-)(0)
25M vs 7V	(M) (-)(0)	(M) (-)(0)

Tabla 1. Tipos de interacciones obtenidas mediante las pruebas estadísticas (apéndice) entre *V. cholerae* (7V) con las cepas de *P. otitidis* (OT) y *P. mosselii* (M) en medio marino sólido de baja salinidad y de alta salinidad. Amarillo = comensalismo, azul = competencia, verde = parasitismo/depredación, rojo = neutralismo, gris = amensalismo. (V-M) La letra en las competencias significa que es la cepa que sufrió cambio alguno, ya sea que se benefició (+) o se afectó (-), para el caso del color verde corresponde a (+).

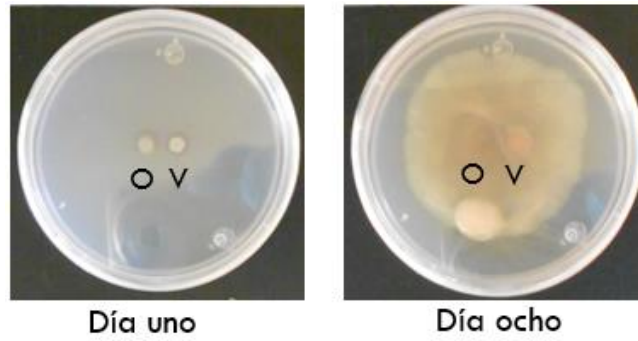


Imagen 7. Se muestra la interacción negativa de competencia en medio de alta sal, entre *P. otitidis* 100ti (O) y *V. cholerae* 7V (V), desde el primer día de co-cultivo, hasta el último día de co-cultivo.

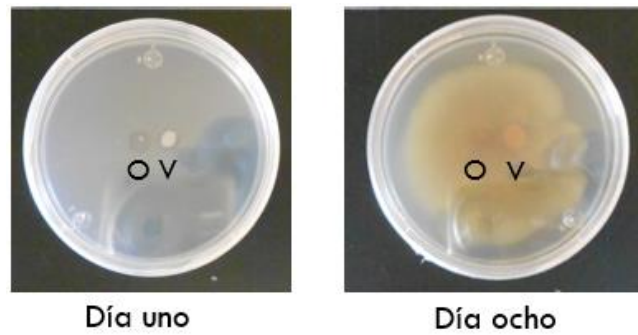


Imagen 8. Se muestra la interacción negativa de parasitismo/depredación en medio de baja sal, entre *P. otitidis*-340ti (O) y *V. cholerae* 7V (V), desde el primer día de co-cultivo, hasta el último día de co-cultivo.

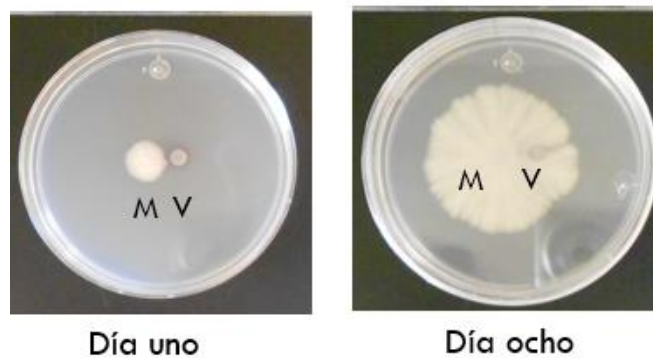


Imagen 9. Se muestra la interacción negativa de competencia en medio de baja sal, entre *P. mosselii* 3M (M) y *V. cholerae* 7V (V), desde el primer día de co-cultivo, hasta el último día de co-cultivo.

■ Discusión

La mayoría del desarrollo humano e industrial ha aumentado constantemente cerca de los cuerpos de agua (Nogales et al., 2011), afectando profundamente los ecosistemas acuáticos, tanto dulce como marino, provocando la extinción generalizada de diversas especies entre ellas las bacterias y ocasionando un desequilibrio ecológico y funcional en las comunidades microbianas (Labbate et al., 2016). En estos ambientes acuáticos, las bacterias son los organismos más abundantes y, a menudo, los que dominan la biomasa, por lo que la forma en que responden a los impactos antropogénicos determina la salud del ecosistema (Vitousek et al., 1997; Hunt & Ward, 2015). En este trabajo se buscó caracterizar el tipo de interacción ecológica en función de la salinidad entre *Vibrio cholerae* y dos especies de *Pseudomonas* (*P. otitidis* y *P. mosselii*), así como determinar si la sucesión observada podría estar dada por la capacidad de consumir diversos compuestos, permitiéndoles cambiar su nicho potencial, con el propósito de estudiar los efectos de la sobreexplotación del agua en la comunidad microbiana del sistema Churince.

Con la finalidad de conocer que tan parecidas eran *P. otitidis* y *P. mosselii* de antes y después de la perturbación, se halló todas las cepas de *P. otitidis* son muy cercanas filogenéticamente entre las cepas de antes y después de la perturbación, esto coincide con el estudio de García-Ulloa et al. (2021), donde encuentra que esta especie *P. otitidis* de Churince, es clonal. Mientras que, por el otro lado *P. mosselii* no fue una especie clonal, esto puede deberse a que es una especie que presenta una gran recombinación genética (Shapiro, 2016).

En este estudio también se observó una gran diferencia con respecto a la cinética de crecimiento entre *V. cholerae* y *Pseudomonas*. Notablemente, todas las cepas de *V. cholerae* en medio marino tienen un crecimiento muy lento en comparación con

Pseudomonas. Esto pudo deberse a que ese medio de cultivo es pobre en fuentes de nitrógeno y fuentes de energía (Moreno, 2017) por lo que el crecimiento de estas cepas altamente especialistas de *V. cholerae* pudo verse limitado, además de que la presencia de *Vibrio* no es común en condiciones bajas de nutrientes (Vázquez-Rosas-Landa et al., 2020). Por otro lado *P. mosselii* (Moss 3, Moss 4, Moss 5) son las cepas que tienen el crecimiento más acelerado de todas, y *P. otitidis* (Oti 34 y Oti 10), junto con *P. mosselii* (Moss 22, Moss 24, Moss 25), tienen un crecimiento intermedio. Esto pudo deberse a que, *Pseudomonas* es un género de bacterias generalista. Así, estas cepas, indistintamente de su especie aprovecharon de una mejor manera las pocas cantidades de fuentes de energía disponibles en el medio de cultivo, tales como la triptona y el extracto de levadura (Moreno, 2017).

Por otra parte, se encontró heterogeneidad metabólica dentro de *Vibrio*, ya que las cepas de 12V y 16V de *V. cholerae* presentes en este estudio son especialistas, es decir que se alimentan de pocos compuestos muy específicos (Blanco et al., 2018). Sin embargo la cepa 7V tuvo capacidades metabólicas generalistas, similares a las cepas de *P. mosselii*, coincidiendo con lo reportado en la literatura sobre *V. cholerae*, que son organismos heterótrofos y generalistas (Escobar et al., 2015). Por lo que principalmente éstas mineralizan la materia orgánica (Cottingham et al., 2003), y también suelen tener la capacidad de aprovechar la quitina como fuente de carbono y nitrógeno, de organismos como crustáceos (Lutz et al., 2013). Es posible que gracias estas capacidades metabólicas, hayan sobrevivido en Churince luego de los eventos de desecación, ya que la gran diversidad de peces y crustáceos (Hernández et al., 2017), pasaron a ser materia orgánica biodisponible. Por su parte, tanto *P. mosselii* y *P. otitidis*, presentaron un metabolismo generalista muy parecido entre sí, observado en la capacidad que tienen de consumir una gran cantidad de compuestos, que van de azúcares, aminoácidos, ésteres, hasta hexosas, ácidos carboxílicos y ácidos grasos. Este tipo de metabolismo es típico de *Pseudomonas*

ya que al estar presentes en una gran variedad de ambientes pueden llevar a cabo varias conversiones bioquímicas desde mineralizar materia orgánica hasta metabolizar compuestos orgánicos naturales como hidrocarburos aromáticos y sus derivados (Zago & Chugani, 2009). Tal es la versatilidad metabólica de *Pseudomonas*, que han sido aprovechadas en el campo de la biotecnología, por ejemplo se han utilizado para la formación de compuestos anti fúngicos para la enfermedad del añublo del arroz (Zago & Chugani, 2009), para la producción de agroquímicos, en la farmacéutica (Poblete-Castro et al., 2012), y como control biológico (Mark et al., 2006). Además en otras investigaciones se ha reportado que, estas especies han fungido como gran apoyo para la degradación de polímeros hidroxiacidos (PHA) (Ward y Connor, 2005; Chen et al., 2014), funcionando así para la biorremediación en sitios contaminados (Singh et al., 2017).

De acuerdo a los análisis metabólicos realizados, *Pseudomonas* y *Vibrio* no traslapan sus nichos en términos de aprovechamiento de nutrientes. Por lo que es de esperarse que no haya interacciones de competencia entre ellas, como se observó en los ensayos de interacciones. Lo anterior coincide con lo mencionado por Hardin, (1960), quien señala que entre más características del nicho compartan dos especies, más competencia entre ellas habrá dado que tendrán necesidades similares en función de los mismos recursos y será entonces más probable que la mejor competidora extinga a la peor competidora.

Posteriormente, en los ensayos de interacción se observó que cuando las cepas se cultivaron como controles, es decir individualmente, *V. cholerae* no presentó afinidad particular por algún medio, independientemente de la concentración de sal. Esto puede ser debido a que la mayoría de los miembros de la familia Vibrionaceae tienen una gran versatilidad de colonizar una gran cantidad de ambientes (Vázquez-Rosas-Landa et al., 2020); por lo que, su crecimiento está dado por las alteraciones ambientales en términos de nutrientes más que la salinidad. Contrastantemente *P. moselii* (Moss 1, Moss 3, Moss 4,

Moss 5) (aisladas antes de la perturbación) y *P. otitidis* (Oti 34) (aislada después de la perturbación) presentaron un mejor crecimiento en el medio de baja salinidad. Esto es esperado en las cepas aisladas antes de la perturbación ya que el medio de baja sal simula su ambiente natural, por lo cual no debería representar una presión ambiental adicional. Sin embargo la cepa aislada después de la perturbación probablemente mantuvo algunas funciones genéticas de las cepas de antes de la perturbación (García-Ulloa et al., 2020), lo cual se ve reflejado en su alto crecimiento en el medio de baja salinidad. Esto pudo ser debido a que estas especies de *Pseudomonas*, pasaron por diversos cuellos de botella que pudieron haberles impedido adaptarse a las condiciones ambientales posteriores a la perturbación (García-Ulloa et al. 2021).

Ponce-Soto y colaboradores (2015), mencionan que generalmente las gammaproteobacterias entre las que se encuentran el género *Pseudomonas* y *Vibrio* suelen ser estrategias-R, es decir son organismos que explotan rápido sus recursos y una vez que los agotan pueden entrar en un estado de latencia o mueren, opuesto a los estrategias-K que dependen de la supervivencia a largo plazo con recursos limitados (Ponce-Soto, 2015). Este estudio coincide con lo ya mencionado, ya que *Pseudomonas otitidis* y *Pseudomonas mosselii* desaparecieron de su ambiente mucho antes que *V. cholerae*. Esto pudo deberse a dos puntos, el primero es que al haber aumento de la salinidad, los nutrientes en el medio se hicieron más escasos. El segundo punto es que, al ser *Pseudomonas*, un estratega-R (Ponce-Soto, 2015) las cepas agotaron de una manera acelerada los pocos nutrientes que existían en el medio, lo que las orilló a la desaparición. Por otro lado *V. cholerae* de Laguna Intermedia de Churince parece operar como un estratega K, lo cual pudo haberle otorgado una ventaja adaptativa en un ambiente que se tornó impredecible en términos de nutrientes y condiciones ambientales una vez que la desecación se presentó en el sistema.

Cuando se evaluaron las interacciones en co-cultivo entre *V. cholerae* y *Pseudomonas* en las distintas concentraciones de salinidad, se observaron cinco tipos de interacciones diferentes, donde el amensalismo fue la más predominante, seguido por el neutralismo y la competencia, también se observó comensalismo y competencia/depredación. En comparación con lo reportado por Moreno (2017), quien encuentra que hay menor diversidad de interacciones (comensalismo y amensalismo) en medio marino, mientras que, en este estudio fueron diversas. Sin embargo se ha documentado que la mayoría de las interacciones entre bacterias suelen ser de antagonismo o competencia (Foster & Bell, 2012), es decir casi no hay cooperación, inverso a esto, en este estudio no se observó una predominancia de ese tipo de interacciones negativas, siendo la interacción más recurrente fue el amensalismo, donde *P. mosselii* se vio afectada su crecimiento, mientras que, *V. cholerae* no sufrió ningún cambio. Además este trabajo, se reportó un ejemplo muy raro en la naturaleza, del neutralismo entre microorganismos; los nichos y estrategias de crecimiento de *V. cholerae* y *Pseudomonas* parecen ser tan diferentes entre sí que en algunos casos son capaces de coexistir sin interactuar, incluso encontrándose en un co-cultivo de laboratorio en el cual son forzadas a ocupar un mismo espacio.

Se encontró que la salinidad no fue un factor que haya propiciado la extinción de *Pseudomonas*, ya que probablemente nunca coexistieron o pudo haber un intercambio de alimento (cross-feeding) entre *V. cholerae* con la comunidad microbiana (Pfeiffer & Bonhoeffer, 2014).

Los resultados obtenidos nos permiten plantear lo siguiente: ya que todo fue mediado por los nutrientes, *Vibrio cholerae* resultó ser más competitiva que *Pseudomonas*, ya que *V. cholerae* crece lento como se observa en la cinética de crecimiento, *V. cholerae* tiene un metabolismo diferente al de todas las *Pseudomonas* estudiadas, como se observa en las pruebas de nicho potencial, ya que al consumir ciertos compuestos, y es más probable que

ésta haya sobrevivido gracias a la cooperación metabólica entre la comunidad microbiana sobreviviente (Seth & Taga, 2014). Finalmente se encontró que la salinidad no fue un factor que haya propiciado la extinción de *Pseudomonas*, ya que probablemente nunca coexistieron como se observa en los ensayos de interacción, si no que desapareció porque su nicho fue destruido a consecuencia de la influencia antropogénica.

■ Conclusión

En esta investigación se caracterizó el tipo de interacción ecológica en función de la salinidad entre *Vibrio cholerae* y dos especies de *Pseudomonas* (*P. otitidis* y *P. mosselii*), así como se determinó si la sucesión observada podría estar dada por la capacidad de consumir diversos compuestos, permitiéndoles cambiar su nicho potencial. Primeramente se halló que las cepas de *P. otitidis* de antes y después de la perturbación son muy cercanas filogenéticamente, mientras que las cepas de antes y después de la perturbación de *P. mosselii* son diferentes. Posteriormente se encontraron los perfiles metabólicos de cada cepa, observando cepas especialistas y generalistas dentro de *V. cholerae* y generalistas para *Pseudomonas*. La cinética de crecimiento para cada cepa, reveló que *V. cholerae* es de crecimiento más lento, mientras que *Pseudomonas* tienen un crecimiento muy acelerado. Por último se encontró una variedad de interacciones, entre ellas comensalismo, competencia, parasitismo/depredación, neutralismo y amensalismo, siendo ésta última la más predominante debido a que probablemente nunca coexistieron en el sitio. Concluyendo de esta manera que la salinidad no fue el factor que hizo que *Pseudomonas* desapareciera, si no que más probablemente su nicho fue desplazado a raíz de la perturbación antropogénica. Este estudio ha sido trascendente ya que es la primera vez que se realiza esta interacción experimental entre estas especies, y provee información importante sobre su ecología en un ambiente oligotrófico (bajo en nutrientes). Además se da a conocer cómo la perturbación antropogénica ha desplazado distintos nichos microbianos teniendo como

resultado la desaparición de dos especies en esta investigación, pero probablemente miles o millones a nivel global.

■ **Perspectiva**

A partir de los estudios presentados en esta investigación la perspectiva de un trabajo futuro se puede orientar hacia un estudio de manera indirecta de estas interacciones, pero a un nivel más amplio, de comunidad, ya que al no ser todos los organismos cultivables en una comunidad, sería lo más conveniente que hacer un estudio directo, de esta manera estos estudios podrían ser de mucha utilidad para poder conocer la dinámica de las especies, poblaciones, comunidades y de esta manera, ayudarnos a poder preservar especies, sitios naturales.

■ Referencias bibliográficas

-Aguilar, B. (2018). Propiedades emergentes de las interacciones bacterianas en una comunidad sintética. Tesis de Maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

-Aguirre-von-Wobeser, E., Soberón, G., Eguiarte, L., Ponce, Y., Rosas, M. & Souza, V. (2013). Two-role model of an interaction network of free-living γ -proteobacteria from an oligotrophic environment. *Environmental Microbiology*. Vol 16. DOI: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12305>

-Albert, M.J. (1994). *Vibrio cholerae* 0139 Bengal. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol 32. No. 10. DOI: <https://doi.org/10.1128/Jcm.32.10.2345-2349.1994>

-Almagro-Moreno, S. & Taylor, R. K. (2013). Cholera: Environmental Reservoirs and Impact on Disease Transmission. *Microbiology spectrum*. Vol 1. No. 2. DOI: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.oh-0003-2012>

-Álvarez, M., Buesa, J., Castillo, J. & Vila, J. (2008). Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales En *Procedimientos en Microbiología Clínica*. España. EIMC. ISBN-978-84-612-7852-7.

-Avitia, M., Escalante, A. E., Rebollar, E. A., Moreno-Letelier, A., Eguiarte, L. E., and Souza, V. (2014). Population expansions shared among coexisting bacterial lineages are revealed by genetic evidence. *PeerJ* 2:e696. DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.696>

-Baldwin, T., Sakthianandeswaren, A., Curtis, J., Kumar, B., Smyth, G. K., Foote, S., & Handman, E. (2007). Wound healing response is a major contributor to the severity of cutaneous leishmaniasis in the ear model of infection. *Parasite Immunology*. Vol. 29, 501-513 pp. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2007.00969.x>

-Begon, M., Townsend, C. & Harper, J. (2006). Ecology. From Individuals to Ecosystems. (4a ed). Reino Unido. Blackwell.

-Berry, D. & Widder, S. (2014). Deciphering microbial interactions and detecting keystone species with co-occurrence networks. *Frontiers Microbiology*. Vol. 5. No. 219. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00219>

-Bonilla, G., Souza, V. & Eguiarte, L. (2008). Metageómica, Genómica y Ecología Molecular: La Nueva Ecología en el Bicentenario de Darwin. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 11(1). 41-51.

-Biology, 2016. GEN III MicroPlate. Instructions for use. California, EUA.

-Biology Online Dictionary. (2021). Eubacteria. Definition and Examples. *Biology Articles, Tutorials & Dictionary Online*. <https://www.biologyonline.com/dictionary/eubacteria>

-Blois, J., Zartneske, P., Fitzpatrick, M. & Finnegan, S. (2013). Climate Change and the Past, Present, and Future of Biotic Interactions. *Science*. Vol. 341. No. 6145. 499-504 pp. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1237184>

-Breitbart, M., Hore, A., Nitti, A., Siefert, J., Haynes, M., Dinsdale, M., Edwards, R., Souza, V., Rohwer, F. & Hollander, D. (2008). Metagenomic and stable isotopic analyses of modern freshwater microbialites in Cuatro Ciénegas, Mexico. *Environmental Microbiology*. Vol 1. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01725.x>

-Camacho, A. & Fernández, E. (2005). Un mundo dominado por los microorganismos. *Ecología microbiana de los lagos antárticos*. España. *Ecosistemas* 14 (2). 66-78 pp.

-Calixto, R., Herrera, L. & Hernández, V. (2012) *Ecología y medio ambiente*. Cengage Learning. México. 20-31 pp.

- Canfield, D., Kristensen, E. & Thamdrup, B. (2005). Structure and Growth of Microbial Populations. En *Advances in Marine Biology* (pp. 23-64). USA. Academic Press.
- Castañeda, M. 2009. Caracterización por métodos moleculares de *Vibrio Cholerae* aislados en México. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Cerritos, R., Vinuesa, P., Eguiarte, L., Herrera, L., Alcaraz, L., Arvizu-Gómez, J., Olmedo, G., Ramírez, E., Siefert, J. & Souza, V. (2008). *Bacillus coahuilensis* sp. nov., a moderately halophilic species from a desiccation lagoon in the Cuatro Ciénegas Valley in Coahuila, Mexico. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol. 58. Núm. 4. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64959-0>
- Chakraborty, S., Mukhopadhyay, A., Kumar, R., Nath, A., Mitra, R., Shimada, T., Yamasaki, S., Faruque, S., Takeda, Y., Colwell, R. & Balakrish, G. (2000). Virulence Genes in Environmental Strains of *Vibrio Cholerae*. *American Society for Microbiology Journals*. Vol. 66, No. 9. 4022-4028 pp. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.66.9.4022-4028.2000>
- Clark, L., Dajcs, J., McLean, C., Bartell, J. & Stroman, D. (2006). *Pseudomonas otitidis* sp. nov., isolated from patients with otic infections. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol 56. No 4. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63753-0>
- Cottingham, K., Chiavelli, D. & Taylor, R. (2003). Environmental microbe and human pathogen: the ecology and Microbiology of *Vibrio Cholerae*. *Frontiers in Ecology and the Environment*. Vol 1. No. 2. 80-86 pp. DOI: [https://doi.org/10.1890/1540-9295\(2003\)001\[0080:EMAHPT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1540-9295(2003)001[0080:EMAHPT]2.0.CO;2)
- CONABIO. (2017). La biodiversidad del estado de Coahuila. Estudio de Estado. Volumen 1. Gobierno de Coahuila. Recuperado el día 01 de Febrero de 2022 de <https://www.cbd.int/doc/nbsap/study/mx-study-coahuila-p1-es.pdf>

- Corrales, L., Antolínez Romero, D. M., Bohórquez Macías, J. A., & Corredor Vargas, A. M. (2015). Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *NOVA*, 13(24), 55-82.
- Cortés-Higareda, M., Bautista-Baños, S., Ventura-Aguilar, R., Landa-Salgado, P. & Hernández-López, M. (2021). Bacterias patógenas de los alimentos agrícolas frescos y mínimamente procesados. Estado actual en el control del género *Salmonella*. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*. Vol. 22. No. 1.
- Covarrubias, S., García-Berumen, J. & Peña-Cabriales, J. (2015). El papel de los microorganismos en la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados. *Acta Universitaria*. Vol. 25. No. 3. 40-45 pp. DOI: <https://doi.org/10.15174/au.2015.907>
- Cruz-Leyva, M., Zamudio-Maya, M., Corona-Cruz, A. I., González-de la Cruz, J. U., & Rojas-Herrera, R. A. (2015). Importancia y estudios de las comunidades microbianas en los recursos y productos pesqueros. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 2(4), pp 99-115.
- Cui, Y. & Shao, J. (2005). The role of ground water in arid/semiarid ecosystems, Northwest China. *Groundwater*. Vol. 43. No. 4. 471-477 pp. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1745-6584.2005.0063.x>
- Dabboussi, F., Hamze, M., Singer, E., Geoffroy, V., Meyer, J. & Izard, D. (2002). *Pseudomonas mosselii* sp. nov., a novel species isolated from clinical specimens. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol 52. 363-376 pp. DOI: <https://doi.org/10.1099/00207713-52-2-363>
- De Anda, V., Zapata, I., Blaz, J., Poot, A., Contreras, B., González, M., Gámez, N., Hernández, M., Eguiarte, L. & Souza, V. (2018). Understanding the Mechanisms Behind the

Response to Environmental Perturbation in Microbial Mats: A Metagenomic-Network Based Approach. *Frontiers in Microbiology*. Vol 9. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02606>

-De Graaf, I., Gleeson, T., Van Beek, LPH., Sutanudjaja, E., & Bierkens, M. (2019). Environmental flow limits to global groundwater pumping. *Nature*. Vol. 574. 90-94 pp. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1594-4>

-Elsø, C. M., Roberts, L. J., Smyth, G. K., Thomson, R. J., Baldwin, T. M., Foote, S. J., & Handman, E. (2004). Leishmaniasis host response loci (Imr13) modify disease severity through a Th1/Th2-independent pathway. *Genes and Immunity*. Vol 5. 93-100 pp. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364042>

-Escalante, A. (2008). *Ecología Evolutiva de Procariontes en Cuatro Ciénegas Coahuila, México*. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.

-Escalante, A., Eguiarte, L., Espinosa-Asuar, L., Forney, L., Noguez, A. & Souza, V. (2008). Diversity of aquatic prokaryotic communities in the Cuatro Ciénegas basin. *FEMS Microbiology Ecology*. Vol. 65. No. 1. 50-60 pp. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00496.x>

-Escalante, A., Caballero, J., Martínez, L., Rodríguez, A., González, A., Toribio, J. & Souza, V. (2009). *Pseudomonas cuatrociénegasensis* sp. nov., isolated from an evaporating lagoon in the Cuatro Ciénegas valley in Coahuila, Mexico. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol. 59. Núm. 6. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.006189-0>

-Escobar, L., Ryan, S., Stewart-Ibarra, A., Finkelstein, J., King, C., Qiao, H. & Polhemus, M. (2017). A global map of suitability for coastal *Vibrio cholerae* under current and future climate conditions. *Acta Trópica*. Vol. 149. 202-211 pp. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.05.028>

-Faust, K & Raes, J. (2012). Microbial interactions: from networks to models. Nature Reviews Microbiology. Vol. 10. 538-550 pp. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2832>

-Faruque, S., Jhon Albert, M. & Mekalanos, J.J. (1998). Epidemiology, Genetics and Ecology of Toxigenic *Vibrio cholerae*. ASM Journals. Microbiology and Molecular Biology Reviews. Vol. 62. No. 4. DOI: <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.4.1301-1314.1998>

-Faruque, S. & Mekalanos, J.J. (2003). Pathogenicity islands and phages in *Vibrio cholerae* evolution. Trends in Microbiology. Vol 11. No. 11. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2003.09.003>

-Faruque, S., Chowdhury, N., Kamruzzaman, M., Dziejman, M., Rahman, M., Sack, D., Balakrish, G. & Mekalanos, J. (2004). Genetic diversity and virulence potential of environmental *Vibrio Cholerae* population in a cholera endemic area. Proceedings of the National Academy of Sciences. Vol. 101. No.7. 2123-2128 pp. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0308485100>

-Foster, K. & Bell, T. (2012). Competition, not cooperation, dominates interaction among culturable microbial species. Current Biology. Vol. 22. No. 19. 1845-1850 pp. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.08.005>

-Freilich, S., Kreimer, A., Meilijson, I., Gophna, U., Sharan R., & Ruppin E. (2010). The large scale organization of the bacterial network of ecological co-occurrence interactions. Nucleic Acids Research. Vol. 38. No. 12. 3857-3868 pp. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/nqk118>

-García-Arenal F. (2012). Impacto económico y social de las enfermedades emergentes en plantas. Fundación Ramón Areces. Recuperado el día 08 de Abril de 2022 de

<https://www.fundacionareces.es/fundacionareces/es/comunicacion/blog/impacto-economico-y-social-de-las-enfermedades-emergentes-en-plantas.html>

-García Gutiérrez, I. & López López, A. (2017). Cuatro Ciénegas: Conflictos asociados al turismo en un área natural protegida. Cuadernos de Turismo. Universidad de Murcia. España. No. 40. 295-314 pp.

-García-Ulloa, M. II, Ponce, G., González, A., González, B., Díaz, M., Souza, V. & Soberón, G. (2020). Two *Pseudomonas aeruginosa* clonal groups belonging to the PA14 clade are indigenous to the Churince system in Cuatro Ciénegas Coahuila, México. Environmental Microbiology. Vol. 21. Núm. 8. 2964-2976 pp. DOI: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14692>

- García-Ulloa, M. II, Escalante, A.E., Moreno-Letelier, A., Eguiarte, L.E. and Souza, V. (2021) Evolutionary Rescue of an Environmental *Pseudomonas otitidis* in Response to Anthropogenic Perturbation. Frontiers in Microbiology. Vol. 11. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.563885>

-Gibbons, S. & Gilbert, J. (2015). Microbial Diversity: exploration of natural ecosystems and microbiomes. Current Opinion in Genetics & Development. Vol. 35. 66-72 pp. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gde.2015.10.003>

-Gomez, Z., Rosas, M., Ponce, G., Moreno, A., Olmedo, G., Eguiarte, L. & Souza, V. (2018). How Divergent Is The Cuatro Ciénegas Oasis? Genomic Studies of Microbial Populations and Niche Differentiation. En Souza, V., Olmedo-Álvarez, G. & Eguiarte, L. (Eds). Cuatro Ciénegas Ecology, Natural History and Microbiology. Cuatro Ciénegas Basin: An Endangered Hyperdiverse Oasis. Springer, Cham.

- González, J. (2011). La nueva biología y el bienestar de la sociedad. Ciencia UANL. Vol. 14. No. 1. 5-6 pp.
- González-Mendoza, J., Maguiña-Vargas, C. & González-Ponce, F. M. (2019). La resistencia a los antibióticos: un problema muy serio. Acta Medica Peruana. Vol. 36. No. 2. 145-151 pp.
- Guarner, F. & Malagelada, J.R. (2003). La flora bacteriana del tracto digestivo. Gastroenterología y Hepatología. Vol. 26. Núm. S1
- Guerrero, M., López, A. & Antón, J. (2005). Ecología microbiana. Ecosistemas, Vol. 14, No. 2.
- Guindon, S., Delsuc, F., Dufayard, J.F. & Gascuel, O. (2009). Estimating maximum likelihood phylogenies with PhyML. En: Posada D. (eds) Bioinformatics for DNA Sequence Analysis. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols). Vol 537. Humana Press.
- Gutierrez R. (2018). Influencia de factores ambientales de crecimiento microbiano en la degradación de polietileno de baja densidad por la bacteria *Pseudomona Aeruginosa* en Huancayo. Tesis de Licenciatura. Escuela Académico Profesional de Ingeniería Ambiental.
- Guzmán, S. (2017). Aislamiento de bacteriocinas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente. Tesis de Licenciatura. Universidad de las Américas Puebla.
- Hammer, B. & Bassler, B. (2003). Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. Molecular biology. Vol. 50. No. 1. 101-104 pp. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03688.x>
- Hardin, G. (1960). The Competitive Exclusion Principle.

-Hernández, S. (2006). Estudio de los géneros bacterianos *Escherichia* y *Pseudomonas* como indicadores de la calidad del agua residual tratada en una depuradora. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

-Hernández, A., Espinosa, H. & Souza, V. (2017). Trophic analysis of the fish community in the Ciénega Churince, Cuatro Ciénegas, Coahuila. PeerJ. Vol 5. DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.3637>

-Hernández, A. (2019). Diversidad microbiana cultivable e interacciones ecológicas entre bacterias y hongos de ventilas hidrotermales y fondo marino del Sur del Golfo de California, México. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.

-Hensel, M. (2004). Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. International Journal of Medical Microbiology. Vol. 294. 95-102 pp. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2004.06.025>

-Hibbing, M., Fuqua, C., Parsek, M. & Peterson, S. (2010). Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. Nature reviews. Microbiology. Vol. 8. No. 1. 15-25 pp. DOI: [10.1038/nrmicro2259](https://doi.org/10.1038/nrmicro2259)

-Hood, MA & Winter, PA. (1997). Attachment of *Vibrio cholerae* under various environmental conditions and to selected substrates. FEMS Microbiology Ecology. Vol. 2. No. 3. 215-223 pp. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1997.tb00373.x>

-Horner-Devine, M., Carney, K. & Bohannan, M. (2003). An ecological perspective on bacterial biodiversity. Royal Society. Vol. 271, 113–122 pp. DOI: <https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2549>

- Hunt, D. & Ward, C. (2015). A network-based approach to disturbance transmission through microbial interactions. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 6. 1182 pp. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01182>
- Jacques, M., Aragon, V., & Tremblay, Y. D. (2010). Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance. *Animal health research reviews*. Vol 11. No. 2. 97–121 pp. DOI: <https://doi.org/10.1017/s1466252310000149>
- Johannssen, K., Cortés, A. & Kilroy, K. (2004). Reconnaissance isotopic and hydrochemical study of Cuatro Ciénegas groundwater, Coahuila, México. *Journal of South American Earth Sciences*. Vol. 17. No. 2. 171-180 pp. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsames.2004.01.002>
- Jousset, A. (2011). Ecological and evolutive implications of bacterial defences against predators. *Environmental Microbiology*. Vol 14. No. 8. 1830-1843 pp. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02627.x>
- Karaolis, D. Johnson, J., Bailey, C., Boedeker, E., Kaper, J. & Reeves, P. (1998). A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains. *PNAS*. Vol. 95. No. 6. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.3134>
- Konikow, L. & Kendy, E. (2005). Groundwater depletion: A global problem. *Hydrogeology Journal*. Vol. 13. 317-320 pp. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10040-004-0411-8>
- Labbate, M., Seymour, J., Lauro, F. & Brown, M. (2016). Editorial: Anthropogenic Impacts on the Microbial Ecology and Function of Aquatic Environments. *Frontiers in Microbiology*. 7:1044. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01044>
- Leneveu, C., Madi, A., Bouffartigues, E., Biaggini, K., Feuilloley, M., Chevalier, S. & Connil, N. (2013). Cytotoxicity and inflammatory potential of two *Pseudomonas mosselii* strains

isolated from clinical samples of hospitalized patients. BMC Microbiology. Vol 13. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-123>

-Leyton, Y. & Riquelme, C. (2008). Vibrio en los sistemas marinos costeros. Revista de Biología Marina y Oceanografía. Vol. 43. No. 3. 441-456 pp. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572008000300004>.

-Lidicker, W. Z. (1979). A Clarification of Interactions in Ecological Systems. BioScience, 29(8), 475–477 pp. DOI: <https://doi.org/10.2307/1307540>

-Liu. M.H., Chen, Y.J. & Lee, C.Y. (2018). Characterization of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Pseudomonas mosselii* TO7 using crude glycerol. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. Vol. 82. No. 3. 532–539 pp. DOI: <https://doi.org/10.1080/09168451.2017.1422386>

-Loeza-Lara, P., Valdez-Alarcón, J., Baizabal-Aguirre, V. & López-Meza, J. (2004). Mecanismos de replicación de los plásmidos bacterianos. Revista de Educación Bioquímica. 23 (2), 79-86 pp.

-Lutz, C., Erken, M., Noorian, P., Sun, S. & McDougald, D. (2013). Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio Cholerae*. Frontiers in Microbiology. Vol.4. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00375>

-Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D., Stahl, D. (2015). Brock. Biología de los microorganismos (14^a ed.). Madrid. Pearson Educación.

-Marx, C. (2009). Getting in touch with your friends. Science. Vol. 324. No. 5931. 1150-1151 pp. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1173088>

- Mesquita, R., Nóbrega, M. & Luiz, W. (2016). Microbial interactions: ecology in a molecular perspective. *Brazilian Journal of Microbiology*. Vol 47. 86-98 pp. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.005>
- Montaño, N., Sandoval, A., Camargo, S. & Sánchez, J. (2010). Los microorganismos: pequeños gigantes. *Elementos: Ciencia y cultura*, Vol. 17, No. 77, pp. 15-23.
- Moreno, C. (2017). Ecología de las interacciones entre bacterias en Cuatro Ciénegas Coahuila, México. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Nogales, B., Lanfranconi, M., Piña-Villalonga, J. & Bosch, R. (2011). Anthropogenic perturbations in marine microbial communities. *FEMS Microbiology Reviews*. Vol. 35. No. 2. 275–298 pp. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00248.x>
- Ogunseitan, O.A. (2016). Bacterial Diversity, Introduction to. En Kliman, R.M. (ed.), *Encyclopedia of Evolutionary Biology*. Vol. 1, pp. 114-118. Oxford Academic Press.
- Özen, A. & Ussery, D. (2012). Defining the *Pseudomonas* genus: Where do we draw the line with *Azotobacter*? *Microbial Ecology*. Vol. 63. No. 2. 239-248 pp. DOI: [10.1007/s00248-011-9914-8](https://doi.org/10.1007/s00248-011-9914-8)
- Partida, L., Monajembashi, S., Greulich, O. & Hertweck, C. (2007). Endosymbiont Dependent Host Reproduction Maintains Bacterial-Fungal Mutualism. *Current Biology*. Vol. 17. No. 9. 773-777 pp. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.03.039>
- Palacios, O., González, O., Rivera, B. & Nevárez G. (2011). El papel de los antimicrobianos en la estructura de las comunidades microbianas en la naturaleza. *Tecnociencia Chihuahua*. México. Vol. 5 No.1.

-Parte, A.C., Sardà Carbasse, J., Meier-Kolthoff, J.P., Reimer, L.C. & Göker, M. (2020). List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70, 5607-5612; DOI: [10.1099/ijsem.0.004332](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004332)

-Pedraza, R., Teixeira, K., Fernandez-Scavino, A., Garcia de Salamone, I., Baca, B., Azcón, R., Baldani, V. & Bonilla, R. (2010). Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. *Corpoica. Ciencia y Tecnología*. Vol.11. No. 2. 155-164 pp. DOI: https://doi.org/10.21930/rcta.vol11_num2_art:206

-Peix, A., Ramírez, M. & Velázquez, E. (2009). Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infection, Genetics and Evolution*. Vol. 9. No. 6. 1132-1147 pp. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.08.001>

-Peimbert, M., Alcaraz, L., Bonilla-Rosso, G., Olmedo, G., García, F., Segovia, L., Eguiarte, L. & Souza, V. (2012). Comparative Metagenomics of Two Microbial Mats at Cuatro Ciénegas Basin I: Ancient Lessons on How to Cope with an Environment Under Severe Nutrient Stress. *Astrobiology*. Vol. 12. No. 7. 648-658 pp. DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/ast.2011.0694>

-Perez-Ortega, R. (2020). Improbable oasis. Pools in the Mexican desert are a hot spot of microbial diversity and a window into early life. *Science*. DOI: [10.1126/science.abd5785](https://doi.org/10.1126/science.abd5785) .

-Pisanty, I., Rodríguez, M., Peralta, C. & Mandujano, M. (2019). CUANDO EL DISTURBIO NOS ALCANCE: AGUA Y CAMBIOS AMBIENTALES EN EL VALLE DE CUATROCIÉNEGAS. *Oikos*. Instituto de Ecología. UNAM.

-Pfeiffer, T. & Bonhoeffer, S. (2004). Evolution of Cross-Feeding in Microbial Populations. *The American Naturalist*. Vol 163. No. 6. 126-135 pp. DOI: <https://doi.org/10.1086/383593>

- Ponce de León-Rosales, S., Arredondo-Hernández, R. & López-Vidal, Y. (2015). La resistencia a los antibióticos: Un grave problema global. *Gaceta Médica de México*. 151:681-9.
- Ponce-Soto, G. (2017). Coexistencia de diferentes linajes de *Pseudomonas* en Cuatro Ciénegas, Coahuila ¿Carrera armamentista o cooperación? Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Ponce-Soto, G., Aguirre, E., Eguiarte, L., Elser, J., Lee, Z. & Souza, V. (2015). Enrichment experiment changes microbial interactions in an ultra-oligotrophic environment. *Frontiers in Microbiology*. Vol 6. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00246>
- Quintero, M. J. (2018). Bacterias del Ácido Láctico un Potencial para la Producción de Alimentos Probióticos Fermentados en la Industria Láctea de Panamá. *KnE. Engineering*. Vol. 3. No. 2. 38-47 pp.
- Raes, J., Ulrich, K. & Boork, P. (2007). Get the most out of your metagenome: computational analysis of environmental sequence data. *Current Opinion in Microbiology*. Vol. 10. No. 5. 490-498 pp. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.09.001>
- Rambaut, A. (2012) FigTree v1.4. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh. Disponible en <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Rodríguez-Verdugo, A., Souza, V., Eguiarte, L. & Escalante, A. (2012). Diversity across Seasons of Culturable *Pseudomonas* from a Desiccation Lagoon in Cuatro Ciénegas, Mexico. *International Journal of Microbiology*. DOI: <https://doi.org/10.1155/2012/201389>

- Romero, G., Goncalves, T., Kratina, P., Marino, N., Petry, W., Sobral, T. & Roslin, T. (2018). Global predation pressure redistribution under future climate change. *Nature Climate Change*. Vol. 8. 1087-1091 pp. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41558-018-0347-y>
- Rubio, S., Pacheco-Orozco, R., Gómez, A.M., Perdomo, S. & García-Robles, R. (2020). Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica. *Universitas Medica*. Vol. 61. No. 2.
- Santillán, G. (2006). Apuntes de Apoyo para el Curso de Microbiología General. Programa Educativo: Químico Farmacobiólogo. Universidad Autónoma de Coahuila. Facultad de Ciencias Químicas.
- SEMAR. (2018). Área de Protección de Flora y Fauna Cuatro Ciénegas. Recuperado el día 2 de Febrero de 2022 de <https://www.gob.mx/semarnat/es/articulos/area-de-proteccion-de-flora-y-fauna-cuatrocienegas?idiom=es>
- Seth, E., & Taga, M. (2014). Nutrient cross-feeding in the microbial world. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 5. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00350>
- Shapiro, B.J. (2016). How clonal are bacteria over time? *Current Opinion in Microbiology*. Vol. 31. 116-123 pp. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.03.013>
- Shimane, T., Wajid, M., He, H. & Yang, W. (2018). Current Trends and Potential Applications of Microbial Interactions for Human Welfare. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 9. No. 1156. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01156>

- Smith, P., Schuster, M. (2019). Public goods and cheating in microbes. *Current biology*, Vol. 29. No. 11. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.03.001>
- Souza, V., Escalante, A., Espinoza, L. & Valera, A. (2004). Cuatro Ciénegas, un laboratorio natural de astrobiología. *Ciencias. UNAM*. No. 75. 4-12 pp.
- Souza, V., Espinosa-Asuar, L., Escalante, A., Eguiarte, L., Farmer, J., Forney, L., Lloret, L., Rodríguez-Martínez, J., Soberón, X., Dirzo, R. & Elser, J. (2006). An endangered oasis of aquatic microbial biodiversity in the Chihuahuan desert. *PNAS*. Vol. 103. No. 17. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0601434103>
- Souza, V. (2011). En Cuatro Ciénegas Coahuila, el agua lo es todo. [en línea]. Recuperado el día 23 de Septiembre de 2019 de <https://souzacuatrocienegas.blogspot.com/>
- Souza, V., Siefert, J., Escalante, A., Elser, J. & Eguiarte, L. (2012). The Cuatro Ciénegas Basin in Coahuila, México: An Astrobiological Precambrian Park. *Astrobiology*. Vol. 12. No. 7. DOI: <https://doi.org/10.1089%2Fast.2011.0675>
- Souza, V., Eguiarte, L., Elser, J., Travisano, M. & Olmedo-Álvarez, G. (2018). A Microbial Saga: How to Study an Unexpected Hot Spot of Microbial Biodiversity from Scratch? En Souza, V., Olmedo-Álvarez, G. & Eguiarte, L. (Eds). *Cuatro Ciénegas Ecology, Natural History and Microbiology. Cuatro Ciénegas Basin: An Endangered Hyperdiverse Oasis*. Springer, Cham.
- Trisha Mary P. A., Srimathi S. D., A. R. Krishna, Jayaprabha. C, Krishna S. J., & Ramasamy S. (2021). Characterization, metal chelation and anti-cancerous activity of extracellular melanin pigments produced by *Pseudomonas mosselii* STSGRDS1. *Songklanakarin J. Sci. Technol*. Vol 43. No. 4. 1041-1048 pp. DOI: <http://dx.doi.org/10.14456/sjst-psu.2021.137>

-Thaller, M., Borgianni, L., Di Lallo, G., Chong, Y., Lee, K., Dajcs, J., Stroman, D. & Rossolini, G. (2010). Metallo- β -Lactamase Production by *Pseudomonas otitidis*: a Species-Related Trait. American Society for Microbiology Journals. Antimicrobial agents and Chemotherapy. Vol 55. No 1. 118-123 pp. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.01062-10>

-USDA-ERS. (2022). Cost Estimates of Foodborne Illnesses. Recuperado el día 08 de Abril de 2022 de <https://www.ers.usda.gov/data-products/cost-estimates-of-foodborne-illnesses/cost-estimates-of-foodborne-illnesses/#Current%20Pathogen%20Files>

-Varela, G. & Grotiuz, G. (2008). Fisiología y metabolismo bacteriano. En Temas de Bacteriología y Virología Médica. Uruguay. Editorial Cefa. pp. 43-57.

-Vázquez-Rosas-Landa, M., Ponce, G., Eguiarte, L. & Souza, V. (2017). Comparative genomics of free-living Gammaproteobacteria: pathogenesis related genes or interaction related genes?. Pathogens and Disease. Vol 75. No 5. DOI: <https://doi.org/10.1093/femspd/ftx059>

- Vázquez-Rosas-Landa, M., Ponce-Soto, G. Y., Aguirre-Liguori, J. A., Thakur, S., Scheinvar, E., Barrera-Redondo, J., Ibarra-Laclette, E., Guttman, D. S., Eguiarte, L. E., & Souza, V. (2020). Population genomics of Vibrionaceae isolated from an endangered oasis reveals local adaptation after an environmental perturbation. BMC Genomics, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-020-06829-y>

-Vélez P., Espinosa-Asuar L., Travisano M., Eguiarte L.E., Souza V. (2018) The Niche at the Edge of Life or the Microbial Ecology (Including Microfungi) of Cuatro Ciénegas: Mutualisms with Locals, Antagonisms Against Foreigners. In: Souza V., Olmedo-Álvarez G., Eguiarte L. (eds) Cuatro Ciénegas Ecology, Natural History and Microbiology. Cuatro Ciénegas Basin: An Endangered Hyperdiverse Oasis. Springer, Cham.

-Vezzulli, L., Pruzzo, C., Huq, A. & Colwell R. (2010). Environmental reservoirs of *Vibrio Cholerae* and their role in cholera. Environmental Microbiology Reports. Vol. 2, No.1. 27-33 pp. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00128.x>

-Villedas, O. (2018). Bioprospección de hongos de Cuatro Ciénegas Coahuila, para el descubrimiento de nuevos productos naturales bioactivos. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.

-Waldor, M. & Mekalanos, J. (1996). Lysogenic Conversion by a Filamentous Phage Encoding Cholera Toxin. Science. Vol. 272. No. 5270. 1910- 1914 pp. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.272.5270.1910>

-Waters, C. & Bassler, B. (2005). Quorum sensing: Cell to Cell Communication in Bacteria. Annual Review of Cell and Developmental Biology. Vol. 21. 319-346 pp. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001>

-Widder, S., Allen, R., Pfeiffer, T. et al. (2016). Challenges in microbial ecology: building predictive understanding of community function and dynamics. ISME J 10, pp. 2557–2568. DOI: <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.45>

-Wintersdorff, C., Penders, J., Van Nierkenk, J., Mills, N., Majumder, S., Van Alphen, L., Savelkoul, P. & Wolffs, P. (2016). Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. Frontiers in Microbiology. Vol. 7. No. 173. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00173>

-Zabrodskii, P. (2019). The Main Directions and Tasks of Ecological Microbiology. Act Scientific Microbiology. Vol. 2. No. 6. 30-33 pp.

■ Apéndice

GEN III MicroPlate

A1 Negative Control	A2 Dextrin	A3 D-Maltose	A4 D-Trehalose	A5 D-Cellobiose	A6 Gentibiose	A7 Sucrose	A8 D-Turanose	A9 Stachyose	A10 Positive Control	A11 pH 6	A12 pH 5
B1 D-Raffinose	B2 α -D-Lactose	B3 D-Melibiose	B4 β -Methyl-D-Glucoside	B5 D-Salicin	B6 N-Acetyl-D-Glucosamine	B7 N-Acetyl- β -D-Mannosamine	B8 N-Acetyl-D-Galactosamine	B9 N-Acetyl Neuraminic Acid	B10 1% NaCl	B11 4% NaCl	B12 8% NaCl
C1 α -D-Glucose	C2 D-Mannose	C3 D-Fructose	C4 D-Galactose	C5 3-Methyl Glucose	C6 D-Fucose	C7 L-Fucose	C8 L-Rhamnose	C9 Inosine	C10 1% Sodium Lactate	C11 Fusidic Acid	C12 D-Serine
D1 D-Sorbitol	D2 D-Mannitol	D3 D-Arabitol	D4 myo-Inositol	D5 Glycerol	D6 D-Glucose-6-PQ4	D7 D-Fructose-6-PQ4	D8 D-Aspartic Acid	D9 D-Serine	D10 Troleandomycin	D11 Rifamycin SV	D12 Minocycline
E1 Gelatin	E2 Glycyl-L-Proline	E3 L-Alanine	E4 L-Arginine	E5 L-Aspartic Acid	E6 L-Glutamic Acid	E7 L-Histidine	E8 L-Pyrogutamic Acid	E9 L-Serine	E10 Lincomycin	E11 Guanidine HCl	E12 Niaproof 4
F1 Pectin	F2 D-Galacturonic Acid	F3 L-Galactonic Acid Lactone	F4 D-Gluconic Acid	F5 D-Glucuronic Acid	F6 Glucuronamide	F7 Mucic Acid	F8 Quinic Acid	F9 D-Saccharic Acid	F10 Vancomycin	F11 Tetrazolium Violet	F12 Tetrazolium Blue
G1 p-Hydroxy-Phenylacetic Acid	G2 Methyl Pyruvate	G3 D-Lactic Acid Methyl Ester	G4 L-Lactic Acid	G5 Citric Acid	G6 α -Keto-Glutaric Acid	G7 D-Malic Acid	G8 L-Malic Acid	G9 Bromo-Succinic Acid	G10 Nalidixic Acid	G11 Lithium Chloride	G12 Potassium Tellurite
H1 Tween 40	H2 γ -Amino-Butyric Acid	H3 α -Hydroxy-Butyric Acid	H4 β -Hydroxy-D,L-Butyric Acid	H5 α -Keto-Butyric Acid	H6 Acetoacetic Acid	H7 Propionic Acid	H8 Acetic Acid	H9 Formic Acid	H10 Aztreonam	H11 Sodium Butyrate	H12 Sodium Bromate

Figura 7. Representación de la microplaca, con sus 94 pruebas fenotípicas y los compuestos presentes en cada pozo. Tomada de Biolog, 2016.

Medio PIA	
Medio	45 gramos
Glicerol	20 mililitros (ml)
Agua destilada	1 litro

Tabla 2. Lista de compuestos para preparar 1 litro de medio de cultivo PIA.

Medio Luria Broth (LB)	
Triptona	10 gramos
Extracto de levadura	5 gramos
Cloruro de sodio	10 gramos
*Si se requiere hacer sólido, agregar agar	15 gramos

Tabla 3. Lista de compuestos para preparar 1 litro de medio de cultivo LB.

Medio Marino	
Triptona	5 gramos
Extracto de levadura	1 gramo
Bromuro de potasio	0.08 gramos
Cloruro de estroncio	0.034 gramos
Ácido bórico	0.022 gramos
Fluoruro de sodio	0.024 gramos
Nitrato de amonio	0.016 gramos
Fosfato de sodio básico	0.08 gramos
Salicilato de sodio	10 microlitros (ul)
Cloruro de sodio	5 gramos
Cloruro de magnesio	2.2 gramos
Sulfato de sodio	1 gramo
Cloruro de calcio	0.4 gramos
Cloruro de potasio	0.2 gramos
Carbonato de sodio	0.1 gramos
Agua destilada	970 mililitros (ml)
30 ml de agua destilada + Citrato férrico	0.1 gramos
*Si se requiere hacer sólido, agregar agar	15 gramos

Tabla 4. Lista de compuestos para preparar 1 litro de medio marino.

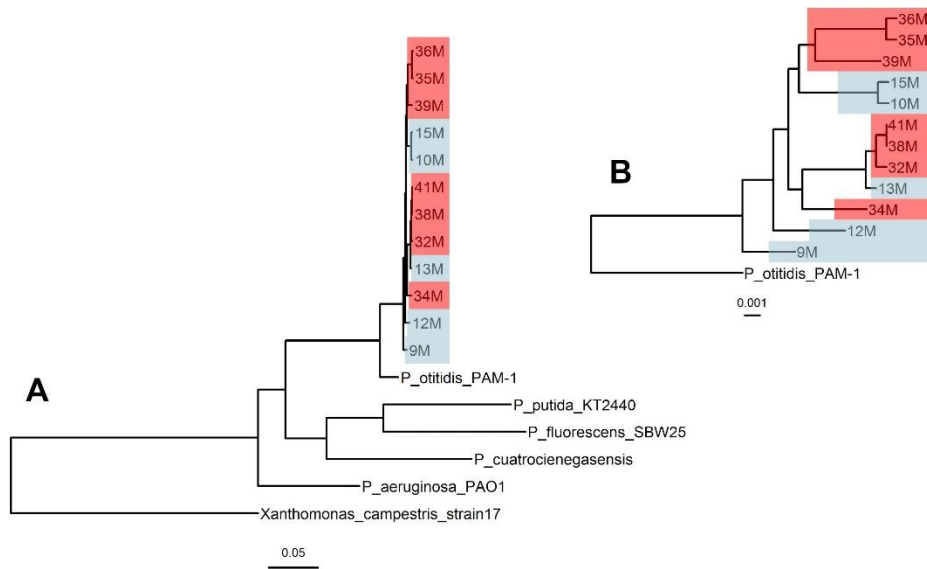


Figura 8. Genealogía de genomas centrales de *Pseudomonas otitidis* recolectados de Laguna Intermedia en el sistema Churince. Genealogía del género *Pseudomonas* que incluye múltiples grupos externos (**A**) y zoom en el clado que comprende los aislamientos de Churince de este estudio (**B**). Los aislamientos de agosto de 2003 (estado original) están en azul y los de octubre de 2015 (estado perturbado) en rojo. La barra debajo de los árboles representa la longitud de las ramas (García-Ulloa et al. 2021).

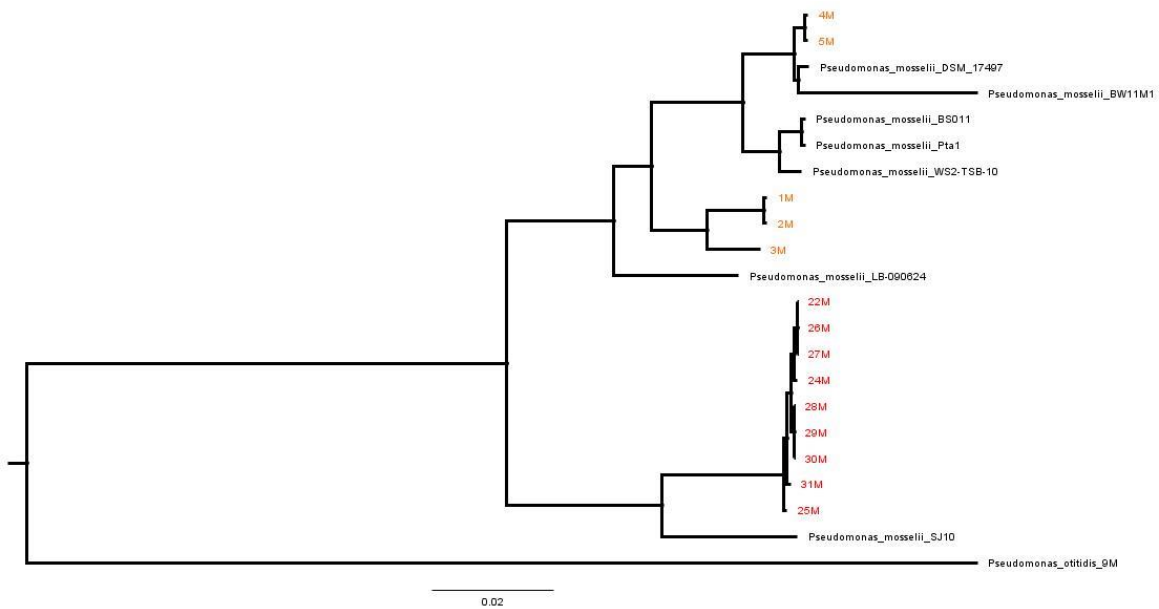


Figura 9. Filogenia de máxima verosimilitud de genomas completos de *P. mosselii*, las cepas de color naranja corresponden a las de antes de la perturbación, mientras que las cepas de color rojo representan a las de después de la perturbación. La barra debajo del árbol representa la longitud de las ramas.

Pruebas de normalidad^{b,c}

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Ctrl_Vib7_bs	,355	3	.	,820	3	,163
7-10_bs_V7_	,350	3	.	,829	3	,186
7-34_bs_V7	,232	3	.	,980	3	,727
7-1_l_bs_V7	,288	3	.	,928	3	,482
7-3_l_bs_V7	,193	3	.	,997	3	,890
7-4_l_bs_V7	,280	3	.	,937	3	,516
7-5_l_bs_V7	,359	3	.	,810	3	,138
7-22_l_bs_V7	,340	3	.	,848	3	,235
7-24_l_bs_V7	,253	3	.	,964	3	,637
7-25_l_bs_V7	,301	3	.	,911	3	,422
Ctrl_Vib7_as	,355	3	.	,820	3	,162
7-10_as_V7_	,279	3	.	,938	3	,521
7-34_as_V7	,340	3	.	,848	3	,235
7-1_l_as_V7	,216	3	.	,988	3	,793
7-3_l_as_V7	,279	3	.	,939	3	,524
7-4_l_as_V7	,300	3	.	,913	3	,428
7-5_l_as_V7	,353	3	.	,823	3	,170
7-22_l_as_V7	,366	3	.	,795	3	,102
7-24_l_as_V7	,344	3	.	,841	3	,217
7-25_l_as_V7	,219	3	.	,987	3	,780
Ctrl_Oti10_bs	,339	3	.	,851	3	,244
7-10_as_O10	,235	3	.	,978	3	,714
Ctrl_Oti34_bs	,356	3	.	,817	3	,156
7-10_bs_O10	,220	3	.	,986	3	,777
Ctrl_Oti10_as	,331	3	.	,865	3	,282
7-34_bs_O34	,337	3	.	,854	3	,252
Ctrl_Oti34_as	,278	3	.	,940	3	,527
7-34_as_O34	,349	3	.	,831	3	,191
Ctrl_Moss1_bs	,321	3	.	,881	3	,327
7-1_l_bs_M1	,303	3	.	,909	3	,414
Ctrl_Moss3_bs	,290	3	.	,926	3	,474
7-3_l_bs_M3	,181	3	.	,999	3	,939
Ctrl_Moss4_bs	,224	3	.	,985	3	,763
7-4_l_bs_M4	,220	3	.	,987	3	,779
Ctrl_Moss5_bs	,192	3	.	,997	3	,895
7-5_l_bs_M5	,215	3	.	,989	3	,798
Ctrl_Moss22_bs	,372	3	.	,781	3	,070
7-22_l_bs_M22	,379	3	.	,765	3	,032
Ctrl_Moss24_bs	,175	3	.	1,000	3	,994
7-24_l_bs_M24	,175	3	.	1,000	3	,997
Ctrl_Moss25_bs	,303	3	.	,909	3	,415
7-25_l_bs_M25	,184	3	.	,999	3	,930
Ctrl_Moss1_as	,313	3	.	,895	3	,369
7-1_l_as_M1	,296	3	.	,919	3	,448
Ctrl_Moss3_as	,335	3	.	,858	3	,263
7-3_l_as_M3	,343	3	.	,843	3	,221
Ctrl_Moss4_as	,193	3	.	,997	3	,890
7-4_l_as_M4	,182	3	.	,999	3	,936
Ctrl_Moss5_as	,385	3	.	,750	3	,000
7-22_l_as_M22	,385	3	.	,750	3	,000
Ctrl_Moss24_as	,277	3	.	,941	3	,531
7-24_l_as_M24	,382	3	.	,757	3	,014
Ctrl_Moss25_as	,379	3	.	,766	3	,035
7-25_l_as_M25	,356	3	.	,816	3	,154

a. Corrección de la significación de Lilliefors
b. 7-5_l_as_M5 es una constante y se ha desestimado.
c. Ctrl_Moss22_as es una constante y se ha desestimado.

Tabla 5. Pruebas de normalidad de cada cepa con el programa IBM SPSS statistics 19.

Cepas	Prueba de Levene	Prueba de T-Student	Prueba de Welch	Prueba de U-Mann Whitney
ctrlv7 vs 7-10_bs_v7	0,068	0	-	0,050
ctrlv7 vs 7-34_bs_v7	0,156	0	-	0,050
ctrlv7 vs 7-10_as_v7	0,124	0,022	-	0,050
ctrlv7 vs 7-34_as_v7	0,442	0,249	-	0,275
ctrlv7 vs 7-1_bs_v7	0,097	0,067	-	0,050
ctrlv7 vs 7-3_bs_v7	0,057	0	-	0,050
ctrlv7 vs 7-4_bs_v7	0,088	0	-	0,050
ctrlv7 vs 7-5_bs_v7	0,879	0,190	-	0,050
ctrlv7 vs 7-22_bs_v7	0,072	0	-	0,050
ctrlv7 vs 7-24_bs_v7	0,117	0	-	0,050
ctrlv7 vs 7-25_bs_v7	0,071	0	-	0,050
ctrlv7 vs 7-1_as_v7	0,118	0,012	-	0,050
ctrlv7 vs 7-3_as_v7	0,270	0,017	-	0,050
ctrlv7 vs 7-4_as_v7	0,125	0,007	-	0,050
ctrlv7 vs 7-5_as_v7	0,583	0,630	-	0,275
ctrlv7 vs 7-22_as_v7	0,115	0,997	-	0,513
ctrlv7 vs 7-24_as_v7	0,199	0,013	-	0,050
ctrlv7 vs 7-25_as_v7	0,156	0,012	-	0,050
ctrlO10 vs 7-10_bs_O10	0,028	-	0,08	0,050
ctrlO34 vs 7-34_bs_O34	0,531	0,001	-	0,050
ctrlO10 vs 7-10_as_O10	0,737	0	-	0,050
ctrlO34 vs 7-34_as_O34	0,059	0,798	-	0,513
ctrlM1 vs 7-1_bs_M1	0,21	0,001	-	0,050

ctrlM3 vs 7-3_bs_M3	0,971	0,049	-	0,050
ctrlM4 vs 7-4_bs_M4	0,644	0,094	-	0,127
ctrlM5 vs 7-5_bs_M5	0,247	0,339	-	0,275
ctrlM22 vs 7-22_bs_M22	0,02	-	0,863	0,513
ctrlM24 vs 7-24_bs_M24	0,404	0,854	-	0,827
ctrlM25 vs 7-25_bs_M25	0,611	0,151	-	0,127
ctrlM1 vs 7-1_as_M1	0,118	0,156	-	0,127
ctrlM3 vs 7-3_as_M3	0,834	0,621	-	0,275
ctrlM4 vs 7-4_as_M4	0,244	0,686	-	0,827
ctrlM5 vs 7-5_as_M5	0,016	-	0,423	0,317
ctrlM22 vs 7-22_as_M22	0,016	-	0,423	0,317
ctrlM24 vs 7-24_as_M24	0,02	-	0,522	0,513
ctrlM25 vs 7-25_as_M25	0,708	0,535	-	0,513
ctrlv7_bs vs ctrlv7_as	0,305	0,913	-	0,827
ctrlO10_bs vs ctrlO10_as	0,029	-	0,958	0,513
ctrlO34_bs vs ctrlO34_as	0,262	0,002	-	0,050
ctrlM1_bs vs ctrlM1_as	0,035	-	0,005	0,050
ctrlM3_bs vs ctrlM3_as	0,538	0,005	-	0,050

ctrIM4_bs vs				
ctrIM4_as	0,466	0,005		0,050
ctrIM24_bs vs				
ctrIM24_as	0,434	0,203	-	0,127
ctrIM25_bs vs				
ctrIM25_as	0,019	-	0,750	0,513

Tabla 6. Resultados de las pruebas estadísticas. Prueba de homocedasticidad (Levene), prueba paramétrica de varianzas iguales (T-student), prueba paramétrica de varianzas desiguales (Welch), prueba no paramétrica (U-Mann Whitney).

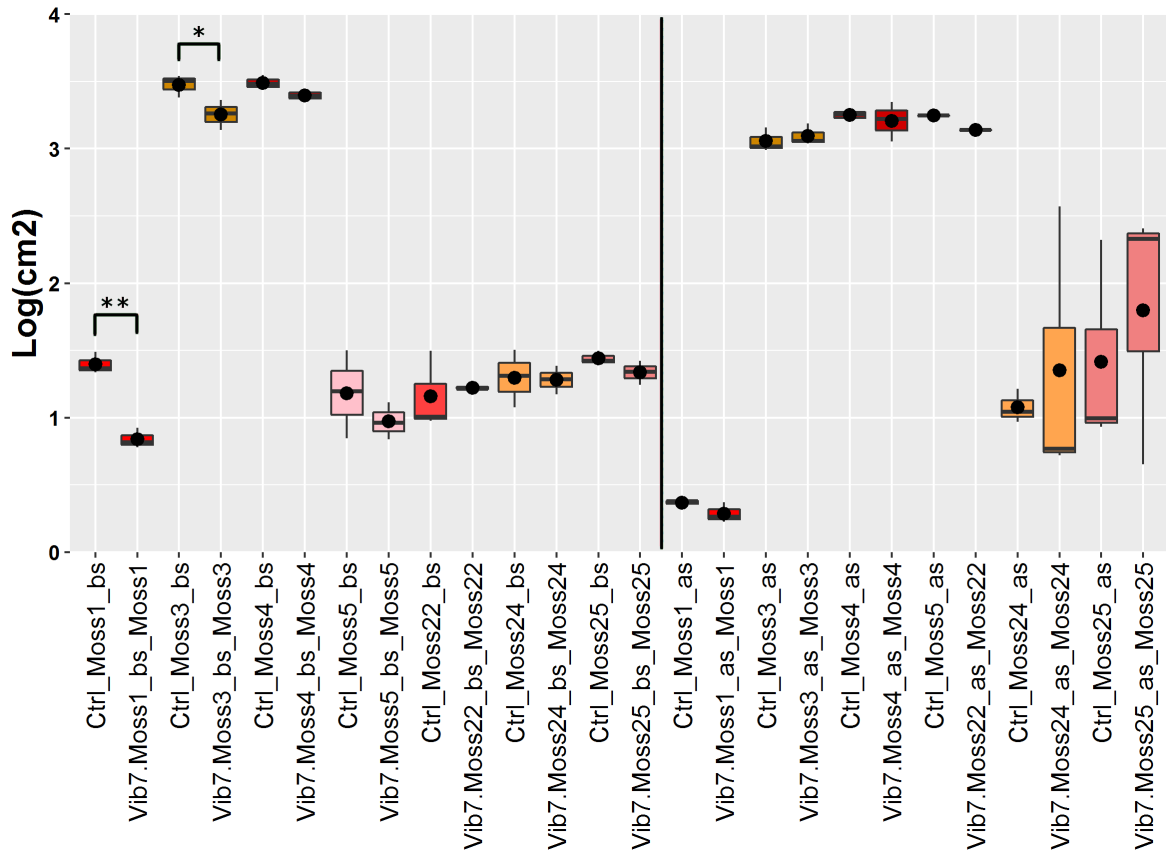


Figura 10. Diagrama de caja y bigotes que representan las diferencias significativas de las cepas de *P. mosselii* (Moss), entre su crecimiento de la cepa control y cuando está en cocultivo con *V. cholerae* (Vib7) en medio marino. La línea recta divide las diferencias de salinidad, del lado izquierdo se encuentran las comparaciones de baja sal y del lado derecho las comparaciones de alta sal. *=significante; **=muy significativo.

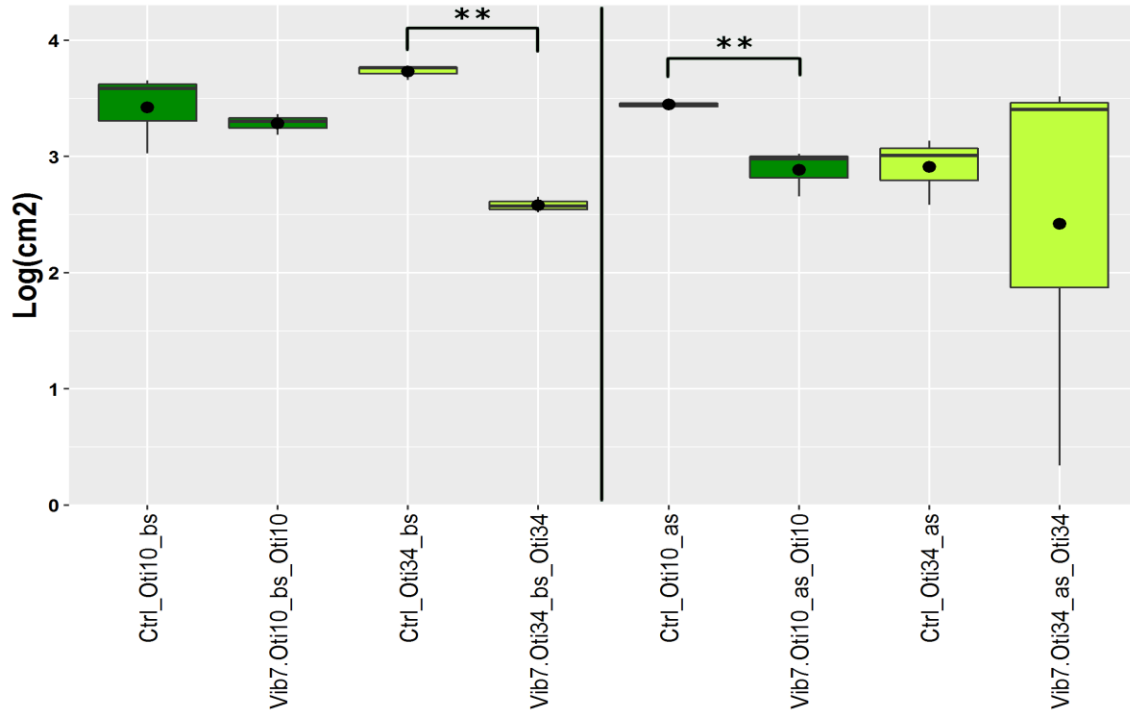


Figura 11. Diagrama de caja y bigotes que representan las diferencias significativas de las cepas de *P. otitidis* (Oti), entre su crecimiento de la cepa control y cuando está en cocultivo con *V. cholerae* (Vib7) en medio marino. La línea recta divide las diferencias de salinidad, del lado izquierdo se encuentran las comparaciones de baja sal y del lado derecho las comparaciones de alta sal. **=muy significativa.

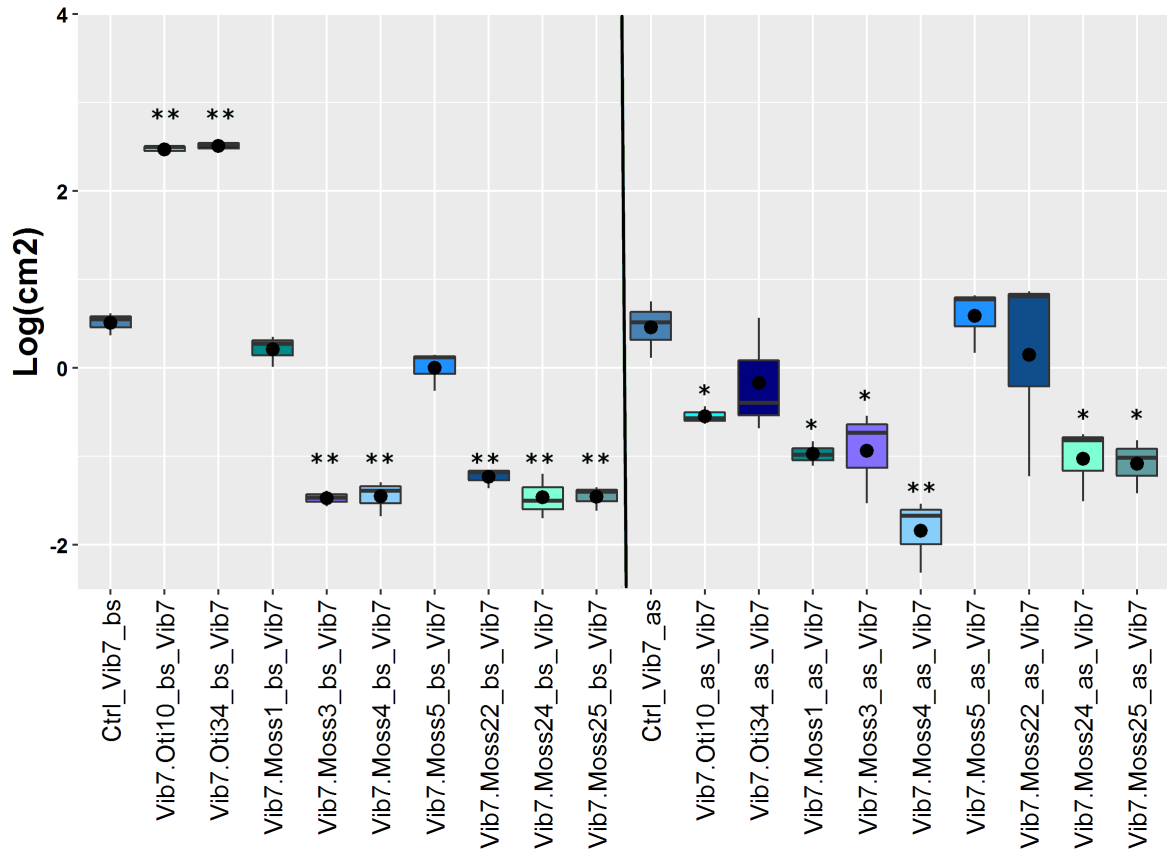


Figura 12. Diagrama de caja y bigotes que representan las diferencias significativas de la cepa de *V.cholerae* (Vib7), entre su crecimiento de la cepa control y cuando está en cocultivo con *P. otitidis* (Oti) y *P.mosselii* (Moss) en medio marino. La línea recta divide las diferencias de salinidad, del lado izquierdo se encuentran las comparaciones de baja sal y del lado derecho las comparaciones de alta sal. *=significante, **=muy significativo.