



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Ecología Experimental: Diversidad, densidad bacteriana y  
heterogeneidad ambiental en microcosmos de  
*Pseudomonas***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A :**

**María Rebolleda Gómez**



**DIRECTOR DE TESIS:  
Dra. Valeria Francisca Eugenia Leopoldina de  
María de Guadalupe Souza Saldívar**

**2011**



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.

## Hoja de Datos del Jurado

### 1. Datos del alumno

Rebolleda

Gómez

María

41 71 82 84

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

30450170-4

### 2. Datos del tutor

Dra

Valeria Francisca Eugenia Leopoldina de María de Guadalupe

Souza

Saldívar

### 3. Datos del sinodal 1

Dr.

Daniel

Piñero

Dalmau

### 4. Datos del sinodal 2

Dra.

Gloria

Soberón

Chávez

### 5. Datos del sinodal 3

Dr.

Luis Enrique

Eguiarte

Fruns

### 6. Datos del sinodal 4

Dr.

Zenón

Cano

Santana

### 7. Datos del trabajo escrito

Ecología Experimental

Diversidad, densidad bacteriana y heterogeneidad ambiental en microcosmos de *Pseudomonas*

90 p

2011

**A Mario Rebolleda Gené**



---

La presente investigación se realizó bajo la dirección de la Dra. Valeria Souza Saldívar en el Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, con apoyo del proyecto CONACyT 23459 *Cuatro Ciénegas Coahuila como sistema modelo para determinar el efecto del cambio climático global en los ciclos de nitrógeno carbono.*

---



**Me gustaría agradecerle al Dr. Michael Trivisano por su ayuda, sin él este trabajo no hubiera sido posible.**

**A mi asesora, la Dra. Valeria Souza, que me ayudo a desanudar los complicados enredos de mi cabeza.**

**A Ana Escalante por su apoyo, por darme alojamiento en su casa, por sus discusiones y sugerencias, por aquellas largas cenas discutiendo temas de ecología microbiana y comiendo galletas de gengibre.**

**A Daniel Piñero, Gloria Soberón, Luis Eguiarte, Zenón Cano y Eria Rebollar por sus comentarios y las correcciones que hicieron a este trabajo con tan poco tiempo de notificación.**

**A Manuel Miranda por su asesoría metodológica y por permitirme el uso de un micromanipulador.**

**A Ricardo Chelen (mejor conocido como Lord Richard) por sus correcciones de estilo y porque, aunque no lo admita, hay un paralelismo importante entre la economía y la ecología. Es central para ambas ciencias el manejo de los recursos y las dinámicas generadas a partir de las relaciones costo-beneficio.**

**A Eria Rebollar y Morena Avitia por su ayuda y enseñanza no sólo en el laboratorio, en la vida en general. Hicieron, sin duda alguna, mucho más amena la realización de este proyecto.**

**A Santiago Ramírez y Germán Bonilla por sus discusiones sobre ecología y evolución, pero sobretodo por su exigencia y sugerencias. Ambos fueron, se podría decir, los asesores estadísticos de esta tesis.**

**A Daniel Piñero, en especial quisiera agradecerle el interés en mi trabajo y a que junto con Vladimir Cachón son, en parte responsables de mi pasión por la evolución.**

**A Zenón quiero agradecerle, también, por enseñarme ecología y sobretodo por enseñarme a presentar un trabajo así.**

**A Laura y Erica, pues saben que sin ustedes el trabajo en el laboratorio no sería posible.**

**A Doña Silvia, que como a nadie, le debo el haber podido realizar los experimentos.**

**A todo el Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental que tanto me ayudaron con su apoyo, discusiones y en los seminarios.**

**A mis amigos biólogos que siempre mantuvieron altos los estándares, que en diversas pláticas me enseñaron tanto o más que lo aprendido en las clases, que me motivaron y sobre todo que jugaron un papel fundamental en hacer de la biología una pasión.**

**A todos mis amigos en Minnesota. Aprendí mucho estando ahí. Ustedes me hicieron disfrutar la vida en el *Midwest* y creo que esta tesis está inspirada, en gran parte, por las pláticas y seminarios a los que atendí cuando viví ahí.**

**A Julia, Ximena, Piña, Sofo, Nora, Eria, Morena y Laura, que me enseñaron que hay mucho más en la vida y que a veces uno aprende más de las vivencias que de todas las clases.**

**A Sofía Casasa Velez, a quien en este espacio no alcanza para agradecerle.**

**A mis amigas de toda la vida, a las chocochicas (aunque el nombre me parezca espantoso, como a todas ustedes) por su apoyo incondicional, pero sobre todo por hacer llevaderos los momentos difíciles.**

**A mi hermano que es también mi mejor amigo.**

**A mi mamá que me tiene un amor incondicional y que sé es probablemente la que más orgullo siente al ver esta tesis.**

**A mi tía Edu que también es mi hermana.**

**“A la meva iaia” Aurora que “és tot un exemple de vida”.**

**A mi “iaia” Paz que es una de las personas más buenas que conozco, que tiene un corazón ejemplar.**

**A mis abuelos Orencio e Isaías, que más que nadie me enseñaron que antes que cualquier cosa uno debe ser buena persona.**

**A toda mi familia, la biológica y la escogida. A mi nuevo hermano El Ale; a Ricardo, a la Luci, al David y, por qué no, a Sandrita y Marianita por adoptarme e incluirme en su gran familia.**

# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>4</b>
1.1. Diversidad: competencia por recursos, coexistencia y estructura de las comunidades.....	4
1. 2. Heterogeneidad espacial: la importancia de la estructura espacial en el mantenimiento de la diversidad.....	12
1. 3. Productividad y densidad de bacterias: disponibilidad y flujo de materia y energía.....	15
1.4. Relación entre productividad y diversidad .....	18
1.3.1. Equilibrio dinámico .....	22
1.3.2. Intensidad total de la competencia .....	22
1.3.3. Heterogeneidad espacial .....	23
1.4. Bacterias como modelo .....	25
1.4.1. Versatilidad ecológica del género <i>Pseudomonas</i> .....	26
1.4.2. Biología contrastante de las dos especies usadas en este estudio ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Pseudomonas</i> sp. RM051) .....	27
1.4.2.1. <i>Pseudomonas</i> sp. RM051 .....	27
1.4.2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	28
1.4.3. Comunidades de ecotipos de <i>Pseudomonas fluorescens</i> (introducción al modelo).....	30
<b>III. METODOLOGÍA .....</b>	<b>34</b>
3.1. Cepas utilizadas.....	34
3.1.1. <i>Pseudomonas</i> sp. RM051 .....	34
3.1.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	34
3.2. Experimento de radiación adaptativa en ambientes con distinto grado de heterogeneidad .....	34
3.3 Curvas de crecimiento en aerobiosis y microanaerobiosis .....	36
3.4 Determinación de diversidad y productividad .....	37
3.5. Medición de la heterogeneidad ambiental .....	38
3.6. Análisis de datos .....	39
3.6.1. Diversidad.....	39
3.6.2. Relación de la heterogeneidad con la diversidad .....	42
3.6.4. Relación entre productividad y diversidad .....	43

<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>44</b>
4.1. Oxígeno como recurso limitante .....	44
4.2. Diversidad.....	47
4.3. Heterogeneidad .....	55
4.4. Efecto de la heterogeneidad sobre la diversidad .....	59
4.6. Relación entre productividad y diversidad .....	62
<b>V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>66</b>
5.1. Las relaciones productividad-diversidad y heterogeneidad diversidad están determinadas por la respuesta a la disponibilidad de oxígeno .....	66
5.2. La relación heterogeneidad-diversidad es contingente y depende de la divergencia fenotípica .....	68
5.3. Los resultados con <i>Pseudomonas aeruginosa</i> son congruentes con la hipótesis de heterogeneidad espacial como mecanismo de la relación productividad-diversidad.....	72
5.4. La relación productividad-diversidad no es general .....	74
<b>VI. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....</b>	<b>78</b>
<b>LITERATURA CITADA .....</b>	<b>81</b>



*Although we ecologists cannot yet say how many species inhabit the Earth, we have found various regularities about diversity. These patterns are too common for anyone to say there are accidents. They occur repeatedly in different taxa, on different continents and in different geological eras.*

*Because the patterns happen again and again, we believe that knowable mechanical processes must control the diversity of species. In fact, by studying the patterns closely, we've made considerable progress in understanding some aspects of this control.*

*- Rosenzweig, 1995*

Rebolleda-Gómez, M.. 2011. *Ecología Experimental: Diversidad, densidad bacteriana y heterogeneidad ambiental en microcosmos de Pseudomonas*. Tesis profesional de licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de México, Ciudad de México

## RESUMEN

En el primer caso, se espera, que a mayor heterogeneidad se tenga una mayor oportunidad ecológica y por lo tanto más diversidad. En el segundo, la relación más mencionada es de forma unimodal con un aumento en la diversidad cuando se tienen productividades intermedias. Sin embargo, los mecanismos y factores que determinan estas relaciones son muy difíciles de estudiar en la naturaleza. En éste trabajo se utilizaron tubos de cultivo (“microcosmos”) fundados por una clona ancestral, perteneciente a *Pseudomonas aeruginosa* o a *Pseudomonas* sp. RM051 (aislada en una poza roja de Cuatrociénegas, Coahuila) que después de un proceso de radiación adaptativa establecen una comunidad con distintos ecotipos que se distinguen por la morfología de las colonias que forman. En estas comunidades se varió la heterogeneidad y disponibilidad de oxígeno de los distintos tubos. Con respecto a la heterogeneidad, los microcosmos de *P. aeruginosa* mostraron una relación positiva. En cambio, la diversidad de los microcosmos de *Pseudomonas* sp. RM051 no fue afectada por la heterogeneidad. En cuanto a la productividad, la relación mostró ser altamente variable dependiendo del indicador de diversidad utilizado. Con ambas especies se obtuvo al menos una relación unimodal. No obstante, los resultados apuntan a que, mientras que la heterogeneidad ambiental fue el principal determinante de este patrón en los microcosmos de *P. aeruginosa*; la hipótesis de equilibrio dinámico podría explicar la curva unimodal entre riqueza y productividad en tubos homogéneos y heterogéneos de *Pseudomonas* sp. RM051. Estos resultados apuntan a que los patrones no son necesariamente generales y pueden verse afectados por la historia natural y genética de cada especie. Sin embargo, dichos patrones existen y nos proveen información importante sobre el origen y mantenimiento de la diversidad.

## ABSTRACT

---

Heterogeneity-diversity and productivity-diversity are two of the most cited patterns concerning diversity maintenance. For the first pattern, a positive relationship, where increased spatial heterogeneity leads to ecological opportunity and therefore, to more diversity; is expected. For the second pattern, instead, a unimodal distribution, with diversity peak at intermediate productivities is the most popular result described in the literature. Nonetheless, their causes and mechanisms are very difficult to study in nature. Culture tubes (microcosms) founded with a single clone (from either *Pseudomonas aeruginosa* or *Pseudomonas* sp. RM051- from Cuatrociénegas, Coahuila) were used in this work. After an adaptive radiation process these single clone microcosms establish a different ecotypes community. Heterogeneity and oxygen availability was varied within different microcosms. Regarding heterogeneity, *Pseudomonas aeruginosa* microcosms showed a positive pattern. In stead, diversity was not affected by heterogeneity in *Pseudomonas* sp. RM051 culture tubes. About productivity, the pattern showed to be highly variable and dependent on the Diversity index used. With both species at least one unimodal distribution was found. Nevertheless, with the results obtained, it appears that the pattern observed, was determined by heterogeneity in *P. aeruginosa* microcosms. Whereas the dynamic equilibrium hypothesis seems the reason to observe an unimodal pattern in both homogeneous and heterogeneous tubes with *Pseudomonas* sp. RM051. These results demonstrate that the patterns observed are not necessarily general. These patterns can be affected by the natural history of each species. However, these patterns do exist and they provide important information to the understanding of diversity origin and maintenance.

# I. INTRODUCCIÓN

---

## 1.1. Diversidad: competencia por recursos, coexistencia y estructura de las comunidades.

*It was not until I asked myself why the larger species should breed first, and then the more general question as to why there should be two and not 20 or 200 species- of the genus in the pond, that ideas suitable to present to you began to emerge. These ideas finally prompted the very general question as to why there are such an enormous number of animal species.*

- Hutchinson, 1959

Desde 1959, la pregunta de Hutchinson, planteada en una forma más general — ¿Por qué existen tantas especies?— sigue siendo una de las preguntas centrales en la ecología de comunidades. Las causas y los patrones de la diversidad son los objetivos centrales de ésta y otras disciplinas biológicas, como la sistemática y la evolución.

La diversidad de especies es, sin embargo, un concepto ambiguo y complejo que involucra dos componentes: la riqueza (el número de especies) y su abundancia relativa (equidad o dominancia). Por lo tanto, existe una gran cantidad de índices y definiciones matemáticas que buscan dar cuenta de la diversidad en una comunidad, que asignan un peso distinto a cada uno de los componentes sin que ninguno, por sí solo, sea suficiente para describir la estructura de una comunidad. Los diferentes índices difieren en el peso que se asigna a la riqueza con respecto a la abundancia relativa (Magurran, 1988; Ricotta, 2003). En este sentido, una alternativa para la representación matemática de una comunidad es la aplicación de familias enteras de índices, de forma tal que cada índice dentro de la familia le confiera un peso distinto a la abundancia con respecto a la riqueza y las comunidades puedan ser comparadas a lo largo de estas

dos dimensiones (Tóthmérész, 1995; Ricotta, 2003).

Caracterizar la diversidad es sólo el primer paso para entender los procesos que la generan y mantienen. Posteriormente, se deben identificar patrones, enunciar hipótesis y coleccionar la evidencia necesaria para desentrañar las causas de los patrones identificados. 50 años después del planteamiento de Hutchinson, se ha avanzado mucho en el estudio de la diversidad; sin embargo, aún queda mucho por hacer. La diversidad es un problema polémico y en debate (Dornelas, Connoly y Hughes, 2006), mientras que algunos postulan que las distintas especies tienen la misma respuesta ecológica y por lo tanto la coexistencia se debe únicamente a la estocasticidad poblacional (Hubell, 2001; Hubell y Borda-de-Água, 2004) otros postulan que no sólo existen diferencias ecológicas, sino que son éstas las que determinan la diversidad en un ambiente dado (Tilman, 1982; Tilman, 2004).

La coexistencia de las especies depende de las interacciones entre ellas, si la competencia entre las especies es muy desigual una será desplazada y como consecuencia se tendrá una menor diversidad (Tilman, 1982; Chesson, 2000). Desde los primeros desarrollos teóricos sobre competencia, como el modelo de Lotka-Volterra, se encontró que la condición *sine qua non* de coexistencia entre las especies es que “la competencia intraespecífica sea mayor en intensidad que la competencia interespecífica” (Chesson, 2000). En el caso del modelo de Lotka-Volterra, planteado como:

$$\frac{1}{N_i} \cdot \frac{dN_i}{dt} = r_i (1 - \alpha_{ii} N_i - \alpha_{ij} N_j), i = 1, 2, j \neq i$$

donde  $N_i$  es el tamaño de la población, mientras que  $\alpha_{ii}$  y  $\alpha_{ij}$  son coeficientes absolutos de competencia intraespecífica e interespecífica, respectivamente. Por lo tanto, en una situación de dos especies, se requiere que  $\alpha_{11} > \alpha_{21}$  y  $\alpha_{22} > \alpha_{12}$  para que

ambas especies puedan coexistir (Chesson, 2000).

El modelo de competencia de Lotka-Volterra y sus derivados, no son modelos mecanísticos en tanto que no explican las causas sino las dinámicas resultantes (Chesson, 2000). Sin embargo, existen varias formas de competencia por los recursos y múltiples estrategias han evolucionado como resultado de esta competencia. A grandes rasgos, la competencia (tanto intra como interespecífica) puede separarse en dos categorías con dinámicas distintas: interferencia competitiva y competencia por explotación (Begon, Townsend y Harper, 2005).

La interferencia competitiva se da mediante la interacción directa de los individuos para evitar que el otro pueda consumir los recursos. Esta interacción se ve ejemplificada por la producción de alelopáticos en plantas, toxinas en levaduras y antibióticos en bacterias (Park, 1962; Begon, Townsend y Harper, 2005).

Por otra parte, la competencia por explotación, se caracteriza por la ausencia de interacción directa entre los distintos individuos, y se presenta por el consumo de un mismo recurso; definiendo recurso como: un factor consumible que, al aumentar su disponibilidad permite el aumento en el tamaño de la población (Tilman, 1982; Begon, Townsend y Harper, 2005). De esta forma, si un individuo consume el recurso bajando su disponibilidad, afecta a otro individuo que requiera dicho recurso para sobrevivir. Las estrategias de competencia, en este caso, se enfocan en el consumo eficiente de los recursos (Begon, Townsend y Harper, 2005).

La intensidad de la competencia por explotación está fuertemente ligada a la relación entre la disponibilidad y la demanda del recurso. En cambio, la interferencia competitiva puede en muchos casos ser muy intensa, aún cuando el recurso no sea limitante en ese momento (Begon, Townsend y Harper, 2005).

Cuando varios organismos tienen que competir por el espacio o la comida su

adecuación se puede ver comprometida. Adecuación es, en el sentido de la ecología evolutiva, el éxito evolutivo de un organismo; éxito que, a su vez, depende de la capacidad de supervivencia y éxito reproductivo del organismo.

Una de las explicaciones más comunes sobre los factores que hacen posible la coexistencia de distintas especies en una comunidad es la de las relaciones costo/beneficio asociadas al desempeño de distintas funciones ecológicas y que por lo tanto afectan su adecuación. Estas relaciones pueden ser entendidas como disyuntivas o interacciones negativas entre caracteres. En el contexto de comunidades, las disyuntivas entre los distintos caracteres de las especies implican un proceso de diferenciación de nicho que emerge de las constricciones a nivel individual en un contexto ambiental determinado (Chesson, 2000; Kneitel y Chase, 2004).

Una de las principales disyuntivas, y probablemente la más importante en comunidades de un solo nivel trófico en el que prevalezca la competencia por explotación, es la explotación diferencial de los recursos (Tilman, 1982; Kneitel y Chase, 2004).

Si se define la tasa de crecimiento poblacional como:

$$\frac{dN_i}{N_i dt} = f_i(R_1, R_2, \dots, R_k) - m_i$$

$$\frac{dR_j}{dt} = g_j(R_j) - \sum_{i=1}^n N_i f_i(R_1, \dots, R_k) h_{ij}(R_1, \dots, R_k)$$

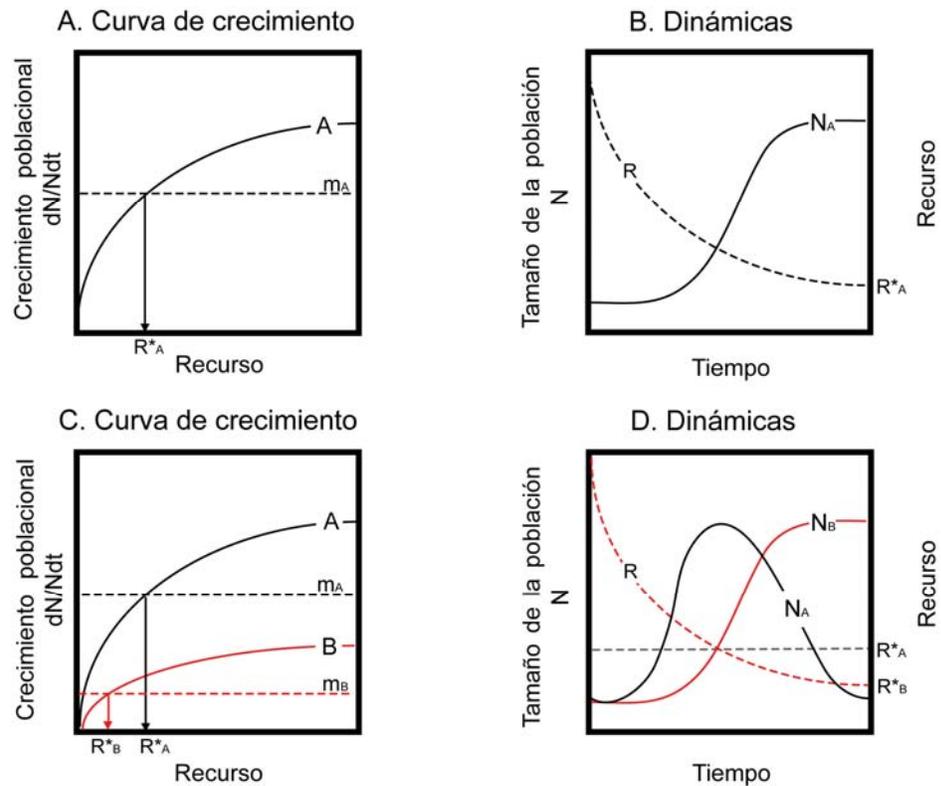
donde  $N_i$  es la densidad poblacional de la especie  $i$ ;  $R_j$  es la disponibilidad del recurso  $j$ ;  $m_i$  es la tasa de mortalidad de la especie  $i$ ;  $f_i$  es la función que describe la dependencia de la tasa reproductiva neta *per capita* en la disponibilidad de los recursos;  $g_j$  es la función que describe la tasa de abastecimiento del recurso  $j$ ;  $h_{ij}$  la función que describe la cantidad de recurso  $j$  necesaria para producir cada nuevo

individuo de la especie  $i$  ; todo para un total de  $n$  especies compitiendo por  $k$  recursos (Tilman, 1982).

Si una comunidad se compone únicamente de un nivel trófico, la coexistencia de las dos especies es posible siempre y cuando haya más de un recurso por el cual competir. Para determinar si las especies podrían coexistir se debe obtener el valor  $R^*$  de cada una, donde  $R^*$  se refiere a la cantidad de recurso en la que la tasa de muerte y natalidad son iguales en la población y, por tanto, hay un recambio constante (Figura 1.1A; 1.1C).

Una especie  $A$  con una tasa de mortalidad  $m$  en un determinado ambiente, aumenta su tamaño poblacional mientras los recursos excedan una concentración crítica o  $R^*$ ; sin embargo, este crecimiento poblacional se lleva a cabo por medio del consumo de los recursos y en consecuencia, la disponibilidad de éstos disminuye hasta alcanzar la concentración crítica ( $R^*$ ). En ese punto el crecimiento poblacional balancea exactamente la tasa de mortalidad y la población alcanza el equilibrio (Figura 1.1B).

Cuando dos o más especies compiten por el mismo recurso, la especie con menor  $R^*$  desplazará competitivamente a las otras en el equilibrio, debido a que la población seguirá creciendo hasta llevar la disponibilidad de recursos hasta su  $R^*$ , es decir, por debajo de la  $R^*$  de las otras poblaciones, haciendo así imposible su subsistencia (Figura 1.3D; Tilman, 1982; Kneitel y Chase, 2004). En consecuencia, si hay sólo un recurso limitante, dos especies no pueden coexistir. Para que la coexistencia sea posible se requieren al menos dos recursos limitantes y, por tanto, un aprovechamiento diferencial de los recursos (Kneitel y Chase, 2004).



**Figura 1.1** **A.** La línea sólida representa la tasa reproductiva *per capita* dependiente del recurso de la especie A. La línea punteada representa la tasa de mortalidad de esta misma especie.  $R^*_A$  es la concentración del recurso a la cual se intersectan ambas tasas. Es por tanto la concentración del recurso a la que se obtiene un equilibrio en el crecimiento poblacional. **B.** La línea sólida representa la dinámica de la población y la línea punteada la dinámica del recurso. Conforme la concentración del recurso se aproxima a  $R^*$  la población se aproxima al equilibrio. **C.** Curvas de crecimiento de las dos especies: A en negro y B en rojo. En la figura se muestran las concentraciones de los recursos al equilibrio para las dos especies ( $R^*_A$ ,  $R^*_B$ ). **D.** Las líneas sólidas representan las dinámicas poblacionales de las dos especies (A en negro y B en rojo). La línea punteada representa la dinámica de los recursos. En la figura se puede observar que mientras la especie B alcanza un equilibrio, la especie A es desplazada. Esto ocurre debido a que la especie B es capaz de llevar los recursos hasta una concentración  $R^*_B$ , a la cual, el recurso es insuficiente para la subsistencia de la especie A (Modificada de Tilman, 1982).

Con un solo recurso limitante, las disyuntivas ecológicas no son suficientes. Aún cuando las ventajas de una especie vengán acompañadas de otras desventajas, de forma que la adecuación de las dos especies sea similar, cuando solamente hay un

recurso limitante, una especie desplazará a la otra tarde o temprano. Se requiere, entonces, un factor estabilizador que reduzca los efectos causados por las diferencias en adecuación de cada especie (Chesson, 2000).

Bajo esta perspectiva, existen dos clases de mecanismos implicados en la coexistencia de dos o más especies: los ecualizadores y los estabilizadores. Los primeros permiten la reducción en las diferencias de adecuación de las distintas especies involucradas, mientras que los mecanismos estabilizadores son aquellos que, equilibran la interacción y la coexistencia (Chesson, 2000). Existen distintos mecanismos ecualizadores y estabilizadores. Y algunos incluso pueden actuar como ambos (Chesson, 2000); este trabajo, sin embargo, se enfoca en aquellos ligados con la coexistencia en ambientes espacialmente heterogéneos.

Uno de los mecanismos estabilizadores más generales es la coexistencia por partición del nicho. Este modelo fue formalizado por MacArthur (1970), para el caso particular de la partición en el uso de los recursos a partir de la ecuación de Lotka-Volterra:

$$\bar{r}_i = \frac{1}{N_i} \cdot \frac{dN_i}{dt} = b_i(k_i - k_s) + b_i(1 - \rho)k_s$$

donde  $\bar{r}_i$  representa la tasa de crecimiento de baja densidad al largo plazo de una especie invasora  $i$  compitiendo contra una especie residente  $s$ ,  $b_i$  representa la tasa a la que declina el crecimiento *per capita* de la especie  $i$  conforme disminuye la disponibilidad de los recursos.  $k_i$  y  $k_s$  son medidas de la adecuación de las especies  $i$  y  $s$  respectivamente. Mientras que  $\rho$  es una medida del traslape en el consumo de los recursos en las dos especies. De esta forma, el primer término de la ecuación compara las adecuaciones promedio de ambas especies y es por tanto ecualizador; el

último término es un estabilizador que permite la coexistencia. Cuando  $\rho < 1$  (el solapamiento es de menos del 100%) el segundo término es positivo y puede compensar por la diferencia en la adecuación de las distintas especies, permitiendo la coexistencia (Chesson, 2000).

De igual forma, si hay dos recursos limitantes, dos especies pueden coexistir sólo si una tiene una menor  $R^*$  (mejor habilidad competitiva) para uno de los recursos y la otra para el otro recurso disponible, es decir, el consumo de los recursos de las distintas especies casi no se solapa. En esta relación hay un costo de explotación asociado al beneficio de utilizar de manera más eficiente el otro recurso (Kneitel y Chase, 2004).

Estas predicciones teóricas se han comprobado en distintos sistemas experimentales. La primera demostración se realizó con diatomeas a finales de la década de los setenta: se calcularon las cinéticas de crecimiento de dos especies de diatomeas de agua dulce —*Asterionella formosa* y *Cyclotella meneghiniana*— con distintas concentraciones de fosfato y silicato como recursos limitantes. A partir de estas curvas se pudieron determinar los puntos de equilibrio y por tanto predecir el resultado de la competencia en un quimiostato (Tilman y Kilham; 1976 Titman, 1976). Posteriormente se realizaron experimentos de competencia con distintas concentraciones de los dos recursos limitantes (silicatos y fosfatos) y en once de trece los resultados fueron consistentes con las predicciones teóricas (Titman, 1976; Tilman, 1977). A lo largo de estas tres décadas, se han realizado experimentos similares con otras especies de algas (Tilman, 1981), una especie de alga y una cianobacteria (Holm y Armstrong, 1981; Tilman, 1982), plantas (ej. Tilman y Wedin, 1991) y animales (ej. Rothhaupt, 1988). En todos estos casos, los resultados, coinciden con las predicciones teóricas.

A forma de resumen, se puede decir que la coexistencia, y por tanto la

diversidad, dependen en gran medida de las dinámicas competitivas. Para que dos especies puedan coexistir debe haber una mayor competencia intra que interespecífica así como factores estabilizadores que compensen por las diferencias en adecuación. Uno de los factores estabilizadores más importante es la partición del nicho (Chesson, 2000).

## **1. 2. Heterogeneidad espacial: la importancia de la estructura espacial en el mantenimiento de la diversidad.**

*Spatial structure has been identified as a major contributor to the maintenance of diversity. (...) The impact of spatial structure on diversity is strongly affected by the ecological mechanism maintaining diversity.*

- Saxer, Doebeli y Travisano, 2009

*Theoretical developments in spatial competitive coexistence are far in advance of empirical investigations.*

- Amarasekare, 2003

La heterogeneidad espacial (o estructura espacial) se define como la varianza entre las condiciones ambientales y la disponibilidad de los recursos de distintos microhábitats muestreados al azar considerados en el tiempo de vida del organismo (Tilman, 1982). Ésta se ha relacionado con el origen (ej. Rainey y Travisano, 1998) y mantenimiento de la diversidad (ej. Harcombe, 2010). Desde la década de los sesenta con experimentos y observaciones clásicas como las realizadas por Pianka (1966a) con lagartijas desérticas australianas, la heterogeneidad espacial se ha correlacionado con la diversidad. En este trabajo Pianka observó que la heterogeneidad tanto horizontal como vertical en la distribución de la vegetación, estaba fuertemente relacionada con la cantidad de

especies de lagartijas. Observaciones más actuales confirman este patrón (ej. Sommer, 1999) y recientes estudios ambientales con bacterias apuntan a que el mismo patrón se presenta en comunidades microbianas (Zhou *et al.*, 2002). De igual manera, se han hecho numerosas aproximaciones teóricas a los mecanismos involucrados en promover la diversidad en ambientes espacialmente heterogéneos (Amarasekare, 2003).

Sin embargo, experimentos ecológicos y evolutivos con microcosmos de bacterias y levaduras han demostrado que el papel de la estructura espacial en el origen y el mantenimiento de la diversidad depende en gran medida del tipo de interacciones y de las relaciones costo-beneficio implicadas en la coexistencia estable (Greig y Travisano, 2008 ; Saxer, Doebeli y Travisano, 2009).

Para que dos o más especies puedan coexistir, tienen que existir diferencias ecológicas entre ellas (Tilman 1982; Amarasekare, 2003). Si pensamos en el nicho como el efecto y la respuesta de una especie a un punto determinado en el conjunto de condiciones ambientales en las que la especie vive (Chesson, 2000); debe haber cierto grado de diferenciación o partición de nicho para permitir la coexistencia estable de las distintas especies (Amarasekare, 2003).

La diferenciación de nicho puede presentarse a lo largo de una escala espacial, de tal manera que las distintas especies experimenten diferentes factores o los experimenten con distinta intensidad en parches ambientales distintos. Así, cada especie puede tener una distinta adecuación a cada parche, permitiendo una mayor competencia intra que interespecífica y por tanto la coexistencia por diferenciación o partición espacial del nicho (Amarasekare, 2003). Bajo este esquema, a mayor heterogeneidad ambiental, mayor variabilidad en las condiciones y por tanto, el número de los posibles nichos que las distintas especies pueden experimentar será mayor. Se

puede esperar entonces una alta diversidad pues el ambiente da cabida a más especies que pueden coexistir de manera estable (Rainey y Travisano, 1998).

Recientes experimentos con microorganismos han probado el papel de la heterogeneidad espacial sobre la diversidad en distintas condiciones. En estos experimentos se ha observado que la estructura espacial puede promover la diversidad i) localizando las interacciones cooperativas de forma que se optimice el beneficio y se disminuya el costo asociado a tramposos (individuos que aprovechan los beneficios sin pagar los costos asociados) (Harcombe, 2010). ii) Por medio de diferencias ambientales y disyuntivas ecológicas de las especies permiten la segregación de éstas en el espacio y en consecuencia una mayor competencia intraespecífica y menor competencia interespecífica. Lo mismo aplica para disyuntivas entre el aprovechamiento del recurso y la resistencia a la depredación (Tilman, 1982; Rainey y Travisano, 1998; Amarasekare, 2003). iii) De forma similar, los ambientes con estructura espacial promueven la diversidad en interacciones no transitivas similares a un juego de “piedra, papel y tijera” en el que piedra le gana a tijera, tijera a papel y papel a piedra (Kerr *et al.*, 2002). En todos estos casos, la coexistencia en ambientes con estructura espacial es promovida debido a que las interacciones ocurren de forma local disminuyendo los costos y permitiendo obtener mayores beneficios (ejs. Por competencia, por aparición de tramposos).

Otros experimentos con microorganismos han demostrado, sin embargo, que la heterogeneidad ambiental no siempre favorece la diversidad (Greig y Travisano, 2008; Saxer, Doebeli y Travisano, 2009). Existen algunos casos en que los costos de las interacciones aumentan en ambientes con estructura espacial. Tal es el caso de las interacciones incidentales de alimentación cruzada (incidental cross-feeding, *sensu* Bull y Harcombe, 2009) en las que un organismo utiliza los productos secundarios del

metabolismo de otro como recurso. En este caso, la interacción depende en gran medida de la difusión de los recursos de manera tal que se encuentren disponibles para su consumo y, por tanto, mayor estructura espacial impide la libre difusión de los recursos inhibiendo los beneficios de la interacción (Saxer, Doebeli y Travisano, 2009).

En el caso de la interferencia competitiva, para que permita la coexistencia se requiere que la habilidad de explotar el recurso de cada especie exceda los efectos y costos de la interferencia con el otro (Amarasekare, 2002). Si la interacción es muy costosa y los organismos se presentan en baja densidad, la estructura espacial va a dificultar aún más la probabilidad de encuentros o la difusión de toxinas, por lo que la especie invasora no va a poder aumentar su abundancia y la diversidad no va a aumentar, debido a que las interacciones son, en muchos casos, dependientes de la frecuencia y la densidad (Greig y Travisano, 2008).

### **1. 3. Productividad y densidad de bacterias: disponibilidad y flujo de materia y energía.**

*The trophic-dynamic viewpoint, as adopted in this paper, emphasizes the relationship of trophic or "energy-availing" relationships within the community-unit to the process of succession.*

- Lindeman, 1942

Con la publicación del artículo "The trophic-Dynamic Aspect of Ecology" en 1942, Lindeman sentó las bases del estudio de los ecosistemas. En este escrito se resalta la importancia de los flujos de materia y energía como componentes fundamentales en el funcionamiento del ecosistema. En este contexto, la productividad, entendida como la tasa de flujo de energía en un ecosistema (Rosenzweig y Abramsky, 1993; Fukami y

Morin, 2003; Begon, Townsend y Harper, 2005; Balvanera y Aguirre, 2006), es un concepto fundamental en ecología.

Para poder estudiar y entender las dinámicas relacionadas con el flujo de energía, la productividad se ha dividido en distintos niveles. El total de energía fijada por los autótrofos es conocida como productividad primaria gruesa. Si a esta cantidad se le resta la energía utilizada en respiración y que ya no está disponible a la comunidad, se obtiene la productividad primaria neta, que representa, además, la tasa a la que se produce nueva biomasa disponible para el consumo primario. La tasa de producción de biomasa por los consumidores secundarios es entonces, la productividad secundaria. El flujo de energía total en el ecosistema es la productividad neta del ecosistema (Begon, Townsend y Harper, 2005).

Debido a la complejidad de la productividad y los factores que la afectan, se han encontrado correlaciones entre la productividad y muchas otras variables de importancia ecológica. Sin embargo, las correlaciones permiten buscar patrones, pero no necesariamente reflejan causas. Una vez encontrados los patrones deben investigarse los procesos implicados, preferentemente por medio de experimentación (Rosenzweig, 1995).

Una de las correlaciones más investigadas, pero sobre la que aún existen controversias –no sólo en torno a las causas, sino al patrón en sí mismo— es la relación entre productividad y diversidad. En estos estudios, la productividad es normalmente entendida como la disponibilidad de los recursos debido a que el flujo total en el ecosistema no es fundamental en un contexto de competencia. Lo que es determinante, es el flujo correspondiente a los recursos limitantes implicados en la competencia (Abrams, 1995; Balvanera y Aguirre, 2006), es decir, se utiliza una noción de productividad potencial o realizada, donde la productividad potencial está dada

únicamente por la disponibilidad de recursos mientras que la realizada es la energía total incorporada como biomasa en un cierto periodo de tiempo (Balvanera y Aguirre, 2006).

De estas dos últimas definiciones, la productividad realizada es la más relevante en un contexto de competencia pues se relaciona directamente con el aprovechamiento de los recursos por los distintos individuos involucrados (Tilman y Pacala, 1993). En este sentido, aunque la productividad potencial nos puede ayudar a comprender el papel de la productividad en la diversidad, como se ha hecho en algunos estudios con microcosmos bacterianos (Kassen *et al.*, 2000; Kassen, Llewellyn y Rainey, 2004). Las dinámicas competitivas involucradas en esta relación son más evidentes y comprensibles al analizarlas considerando la productividad como la energía total incorporada como biomasa.

Con la finalidad de adentrarse en el entendimiento de las dinámicas competitivas implicadas en la interacción entre productividad y diversidad, en este estudio se tomará la densidad bacteriana y no la biomasa como una medida de la productividad realizada. Esto se debe a que la densidad bacteriana, a diferencia de la biomasa puede ser medida y comparada para los distintos morfotipos pues éstos no pueden ser identificados previo al sembrado en las cajas de petri, momento en el cual la biomasa ha cambiado (ver métodos). Esta aproximación es válida porque no existen diferencias en el tamaño celular de los diferentes morfotipos ni de *Pseudomonas fluorescens* (Spiers *et al.*, 2002) ni en los de *Pseudomonas aeruginosa* (Häußler *et al.*, 1999). Aunque aún no se tiene información sobre el tamaño de las células de los distintos morfotipos para la *Pseudomonas* sp. de Cuatrociénegas utilizada en este estudio (ya que es una especie nueva); sabemos que esta bacteria pertenece al mismo grupo de *Pseudomonas* que *P. fluorescens* y *P. aeruginosa* (M, Peimbert, datos no pub.), y por lo

tanto podemos pensar que las diferencias en el tamaño celular de los distintos morfotipos tampoco son significativas.

No obstante, cabe resaltar que este enfoque, aunque práctico, tiene sus limitantes; medir la productividad de esta forma es, por un lado, una foto de las dinámicas de la productividad dado que sólo considera un momento en el tiempo y por otro lado, sólo considera la materia viva. La productividad es un aspecto ecológico muy complejo, al estudiarlo puede ser útil la simplificación, pero cabe reconocer que la densidad bacteriana medida como unidades formadoras de colonias (UFCs) es sólo una aproximación.

#### **1.4. Relación entre productividad y diversidad**

*But do not surrender hope yet. Just because the matter is still perplexing, do not conclude that the unimodal curve has no unified explanation. It fits too many animal taxa. It fits in too many habitats and on too many continents. Something so pervasive ought to have a simple explanation.*

- Rosenzweig, 1995

La relación entre productividad y diversidad se ha estudiado desde hace poco más de cuarenta años (Leigh, 1965 Pianka, 1966b); sin embargo aún no hay acuerdo respecto a los patrones, y menos aún respecto a los mecanismos implicados en esa relación.

Al menos tres curvas distintas se han propuesto correlacionando la diversidad con la productividad (Figura 1.7): unimodal (en forma de joroba), positiva y negativa. Waide *et al.* (1999) realizaron una extensa revisión (se analizaron más de 200 relaciones publicadas) para determinar la frecuencia con la que se presentan cada una de las curvas propuestas y encontraron que el 30% presentaron una relación unimodal,

el 26% muestran una asociación lineal positiva, 12% lineal negativa y 32% no presentan una relación significativa que se asocie a ningún otro patrón.

La gran variación en patrones entre la productividad y la diversidad se ha atribuido a diversos factores, tales como: i) las distintas condiciones en que se puede mantener una relación estable de competencia al interior de la comunidad (Abrams, 1995); ii) a que los grupos taxonómicos utilizados en los distintos estudios tienen diferentes respuestas ecológicas (Currie, 1991; Mittelbach *et al.*, 2001; Horner-Devine, *et al.*, 2003); a la escala espacial (local, regional) (Currie, 1991; Mittelbach *et al.*, 2001) donde los procesos locales favorecen un patrón unimodal, mientras que los procesos en una escala regional presentan una curva lineal positiva (Chase y Leibold, 2002); iii) al ensamblaje de la comunidad y a los procesos de sucesión (Fukami y Morin, 2003); iv) a la frecuencia de las perturbaciones (Kondoh, 2001) v) y a la heterogeneidad espacial (Rosenzweig, 1995; Rosenzweig y Abramsky 1993; Tilman y Pacala 1993).

Con respecto a las bacterias son contados los estudios que evalúan esta relación. No obstante se ha encontrado, de igual manera, una gran variabilidad con respecto a los resultados obtenidos. Kassen y colaboradores en el 2000 realizaron un experimento similar al del presente estudio y encontraron una relación unimodal entre la productividad y la diversidad (de este experimento se hablará con más detalle más adelante). Adicionalmente se han realizado algunos estudios ambientales, en diferentes ambientes y con diferentes grupos bacterianos. Benlloch y colaboradores (1995) compararon la diversidad bacteriana de dos lagunas con diferentes niveles de productividad y encontraron una mayor cantidad de secuencias de genes ribosomales bacterianos únicos en la laguna más productiva, indicando que ésta tenía una mayor diversidad. En otro trabajo Torsvilk y su equipo (1998) encontraron lo contrario. En este caso compararon los sedimentos de dos ambientes acuáticos uno prístino en el que

encontraron la mayor diversidad contra el sedimento de granjas de peces que a pesar de ser más productivo presentó una menor diversidad.

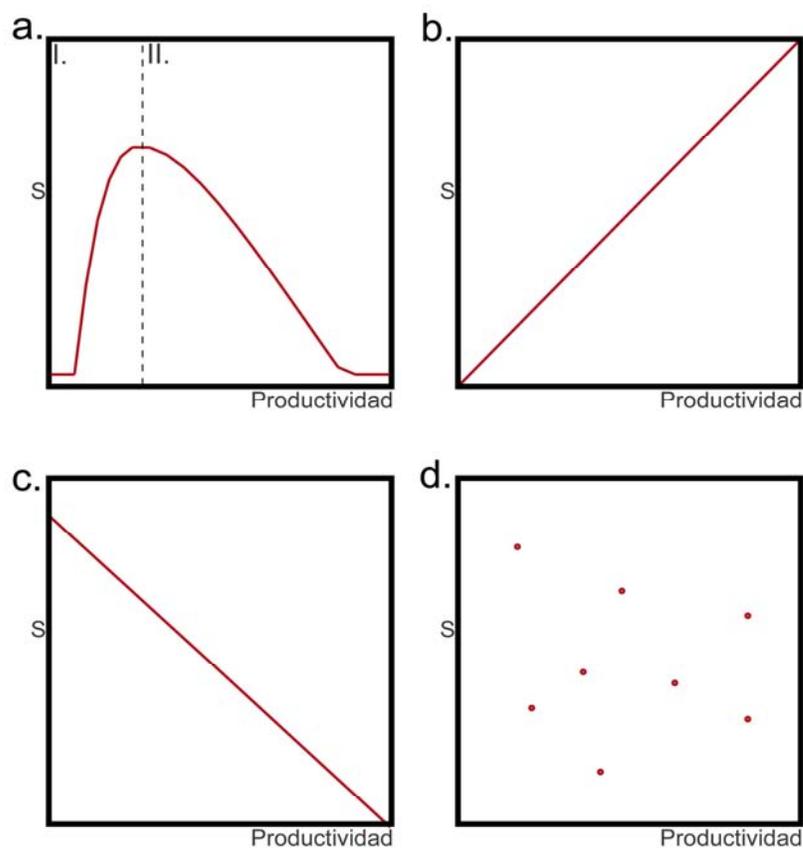
Por último, en otro estudio bacteriano se analizó el patrón de productividad-diversidad explícitamente para los distintos grupos bacterianos. Este estudio se realizó en microcosmos diseñados para imitar pequeñas pozas y se observó que aún en el mismo sistema, distintos grupos presentaban distintos patrones. Para el grupo Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides se observó una relación unimodal. En cambio se registró una relación en forma de U para las  $\alpha$ -proteobacteria y ninguna relación significativa para las  $\beta$ -proteobacteria (Horner-Devine *et al.*, 2003).

Sin embargo, la curva unimodal es a la que más atención ha recibido (Abramsky y Rosenzweig, 1984; Rosenzweig 1992; Rosenzweig y Abramsky 1993; Tilman y Pacala 1993) y debido a su naturaleza, primero ascendente y posteriormente descendente, entender los mecanismos causantes de dicho patrón puede ayudar a elucidar, o al menos, generar hipótesis sobre las causas detrás de otros patrones (*i.e.* curvas lineal positiva y negativa).

La relación unimodal consta entonces de dos fases: una fase ascendente en la que la diversidad aumenta, con el incremento en productividad de niveles muy bajos a niveles intermedios hasta llegar a un máximo y, posteriormente, una fase descendente en la que el aumento de la productividad conlleva un decremento en el número de especies (Ver figura 1.7. a.).

En general existe un consenso sobre el mecanismo de la fase ascendente pues pocas especies pueden tolerar ambientes tan pobres en recursos disponibles: conforme aumenta la productividad, más especies cubren sus requerimientos mínimos para sobrevivir y por tanto la diversidad aumenta. Esto tiene que ver con que las tasas de extinción son más altas cuando los tamaños poblacionales son muy bajos y en el caso

de los ambientes con niveles bajos de productividad, la disponibilidad de recursos no es suficiente para mantener un tamaño poblacional estable, especialmente para especies con mayores requerimientos nutricionales (Tilman, 1982; Rosenzweig, 1995).



**Figura 1.7.** Distintos patrones de la relación entre productividad y diversidad. **a.** Curva unimodal. I. Fase ascendente, conforme aumenta la productividad aumenta la diversidad hasta alcanzar un punto máximo a partir del cual comienza II. la fase decreciente, la diversidad disminuye al aumentar la productividad de intermedia a alta **b.** Lineal positiva, la diversidad aumenta conforme aumenta la productividad **c.** Lineal negativa **d.** No hay relación significativa.

La pérdida de diversidad relacionada con el aumento de productividades intermedias a altas disponibilidades del recurso es más controversial. Si bien la exclusión competitiva es la explicación más aceptada para explicar la fase decreciente

de la curva, las explicaciones sobre por qué aumenta la competencia con la productividad son diversas (Rajniemi, 2003). A continuación se explican las hipótesis generales (que no sean específicas para ciertos grupos taxonómicos) más soportadas por la evidencia disponible, es decir, el equilibrio dinámico (Huston, 1979; Rajniemi, 2003), la intensidad total de competencia (Grime, 1977; Rajniemi, 2003), y la heterogeneidad ambiental (Tilman, 1982; Tilman y Pacala, 1993).

### **1.3.1. Equilibrio dinámico**

En 1979 Michael Huston propone que la relación entre productividad y diversidad está relacionada con las tasas de crecimiento de las especies. Considera que estas tasas implican la velocidad con la que las especies competitivas se acercan a la exclusión de otra u otras especies (equilibrio competitivo). Si el crecimiento poblacional es lento, las especies pueden mantener la coexistencia por un intervalo de tiempo mayor. En cambio, en ambientes productivos, donde el crecimiento poblacional sucede a mayor velocidad, la especie con mayor habilidad competitiva rápidamente domina desplazando a las demás (Huston, 1979; Rajniemi, 2003).

Este modelo predice que para mantener altos niveles de diversidad se necesitan niveles bajos de productividad (pero suficientes para permitir la supervivencia de las distintas especies) y al mismo tiempo perturbaciones periódicas (pero no tan frecuentes que no permitan la recuperación de las poblaciones) que evitan así, alcanzar el equilibrio competitivo (Huston, 1979; Rajniemi, 2003).

### **1.3.2. Intensidad total de la competencia**

En esta hipótesis se establece que a mayor productividad aumenta la biomasa y con ello la competencia total. Bajo estas circunstancias, las especies con mayor capacidad

competitiva desplazarán a las especies con otra estrategia adaptativa (*i.e.* ruderales y resistentes a condiciones de estrés); en cambio, en condiciones de baja productividad las especies con mayor resistencia al estrés serán las que dominen (Grime, 1977). Mientras que en productividades intermedias (cuando se alcanza el pico de diversidad) una mezcla de ambas estrategias puede coexistir y como resultado se maximiza la diversidad (Rajniemi, 2003).

Sin embargo, esta hipótesis asume que muchas especies competitivas y resistentes al estrés no serán desplazadas en condiciones intermedias. Sin embargo Grime (1977) reconoce que puede haber especies con estrategias secundarias intermedias mejor adaptadas a productividades medias. Es decir, especies que son en cierta medida resistentes al estrés y competitivas.

### **1.3.3. Heterogeneidad espacial**

Probablemente la hipótesis más discutida sobre la causa del patrón unimodal en la relación entre productividad y diversidad es la relacionada con la heterogeneidad espacial en la disponibilidad de los recursos (Tilman, 1982; Tilman y Pacala, 1993; Abrams, 1995; Rosenzweig, 1995).

Tomando en cuenta esta concepción y los modelos de coexistencia, Tilman propone la hipótesis de heterogeneidad para explicar la relación entre productividad y diversidad en 1982. Tilman explica que en ambientes poco productivos todas las especies están limitadas por los nutrientes, de forma tal que la que mejor aproveche esos pocos recursos será dominante, independientemente de la heterogeneidad espacial. Conforme aumenta la disponibilidad de los recursos, aumenta el número de especies que pueden coexistir, hasta llegar a un punto en el que al aumentar la productividad, algunas especies aprovechan mejor los recursos desplazando así a las

demás y la diversidad disminuye (Tilman 1982; Tilman y Pacala, 1993; Kassen *et al.*, 2000). Esta hipótesis fue generada a partir de los modelos gráficos de proporción de recursos y coexistencia.

Cuando se representan las isoclinas de crecimiento neto cero, de distintas especies con respecto a la disponibilidad de dos recursos y se considera a un ambiente heterogéneo como un área dentro de la gráfica en la que caben representados distintas concentraciones de los recursos, se observa que a muy bajas concentraciones del recurso las especies no pueden sobrevivir. Conforme la disponibilidad aumenta, rápidamente crece también el número de especies que pueden coexistir dentro del área designada como un ambiente heterogéneo; sin embargo, si la disponibilidad de los recursos aumenta, se comenzarán a perder especies por desplazamiento competitivo (Tilman 1982). En un ambiente heterogéneo la coexistencia depende de que las distintas especies presenten una adecuación diferencial en los distintos nichos de forma que cada tipo con un nicho diferente y que por lo tanto tiende a divergir (ecotipo; Cohan, 2002) sea mejor que los otros en un nicho y peor en los demás. Además, los nichos deben contener un número similar de individuos. Si un nicho es más productivo que los demás, la especie mejor adaptada a ese nicho dominará y rápidamente desplazará a las otras (Kassen *et al.*, 2000).

En un experimento con *P. fluorescens*, Kassen y colaboradores (2000) comprobaron que la heterogeneidad en la disponibilidad de los recursos puede tener un papel importante en la relación entre productividad y diversidad en un modelo bacteriano. En este trabajo se inocularon distintos morfotipos de *P. fluorescens* en medios sin agitación (ambiente heterogéneo) y en continua agitación (homogéneo), bajo distintas concentraciones de nutrientes. En el ambiente heterogéneo se observó una curva unimodal, mientras que en el ambiente homogéneo no se encontró ningún

patrón. Sin embargo, en este trabajo no se sabe exactamente el papel de los nutrientes ni cual es su relación con los distintos morfotipos y la productividad considerada es potencial, no realizada. Además, aún cuando se sabe que la heterogeneidad puede ser un factor importante en esta relación, no se sabe cómo es que actúa ni qué efecto tienen, sobre esta relación, distintos niveles de heterogeneidad.

#### **1.4. Bacterias como modelo**

*More generally, work on the productivity-diversity relationship should be shifted from trying to identify and generalize about patterns to investigating the mechanism responsible for patterns. It is clear that relationships between productivity and diversity differ not only among scales and between artificial and natural gradients, but also within scales and gradient types. A better understanding of productivity-diversity relationships will require studying the mechanism creating the relationships and whether. The proposed mechanism can best be evaluated by experiments that directly examine the effects of competition on species diversity.*

- Rajaniemi, 2003

La hipótesis de los procesos y mecanismos implicados en los patrones de diversidad de especies con respecto a la productividad son muy difíciles de probar en la naturaleza, debido en gran parte a la complejidad de los ecosistemas. En este sentido, los microorganismos ofrecen varias ventajas como modelos para probar hipótesis ecológicas y evolutivas: son fáciles de contar y propagar, se reproducen rápidamente (tiempos generacionales cortos), se pueden tener pequeños volúmenes con altas densidades poblacionales y resulta fácil manipular y controlar las variables

ambientales. Tales características, en conjunto, permiten realizar manipulaciones experimentales con sus respectivas réplicas y controles para probar la plausibilidad de distintas hipótesis evolutivas y ecológicas (Elena y Lenski, 2003; Prosser *et al.*, 2007).

Por otra parte, las bacterias son un grupo de gran abundancia y diversidad, presente en todos los ecosistemas y de gran relevancia en el funcionamiento de los ecosistemas y los ciclos biogeoquímicos. Entender los patrones y procesos ecológicos que permiten el origen y mantenimiento de la diversidad procarionte, resulta entonces fundamental (Prosser *et al.*, 2007).

#### **1.4.1. Versatilidad ecológica del género *Pseudomonas***

El género *Pseudomonas* es un grupo bacteriano de gran importancia ecológica. Está conformado por bacterias del grupo  $\gamma$ -proteobacteria, móviles heterótrofas gram-negativas con forma de bacilos e incluye una gran diversidad de especies con una enorme capacidad metabólica y, por lo tanto, una gran capacidad de adaptación a un amplio espectro de ambientes (terrestres, acuáticos y los asociados a plantas y animales) (Kiil *et al.*, 2008).

Los genomas de estas bacterias son de gran tamaño y con un alto contenido genético así como un amplio sistema de regulación, permitiéndole a las distintas especies de *Pseudomonas* una extraordinaria plasticidad metabólica. En consecuencia ; estas bacterias tienen la capacidad de colonizar una gran variedad de nichos (Stover *et al.*, 2000; Nelson *et al.*, 2002; Kiil *et al.*, 2008). Las dos especies de *Pseudomonas* utilizadas en este trabajo presentan una ecología contrastante: *P. aeruginosa* es una bacteria cosmopolita, generalista y patógena oportunista con una gran versatilidad metabólica; *Pseudomonas* sp. RM051 fue aislada en el tapete microbiano de una poza roja dominada por *Pseudomonas* en Cuatrociénegas, Coahuila.

#### **1.4.2. Biología contrastante de las dos especies usadas en este estudio (*Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas* sp. RM051)**

Las cepas utilizadas en este estudio, a pesar de pertenecer al mismo género presentan diferencias ecológicas importantes: mientras que *Pseudomonas* sp. RM051 es una especie aparentemente endémica pues es diferente a las especies de *Pseudomonas* descritas anteriormente (G. Bonilla, com. pers.) indicando que a la fecha no ha sido aislada en otro sitio. *P. aeruginosa* es una especie cosmopolita y metabólicamente muy versátil.

##### 1.4.2.1. *Pseudomonas* sp. RM051

Esta cepa de *Pseudomonas* fue aislada del tapete microbiano de la poza “Eguiarte”, una poza roja estacional de la localidad de “Los Hundidos” en Cuatrociénegas, Coahuila (V. Souza, com. pers.). Es una especie aparentemente endémica pues es diferente a las especies de *Pseudomonas* descritas anteriormente (G. Bonilla, com. pers.).

Las pozas rojas de Los Hundidos están caracterizadas por una fuerte fluctuación estacionaria. Registros obtenidos en la poza contigua muestran variaciones extremas en la temperatura, alcanzando temperaturas cercanas a los 60°C durante el verano y a 10°C en el invierno. Asimismo, debido a la evaporación, las pozas pasan periodos casi secas durante el verano. La condición más extrema de las pozas rojas, es probablemente la ausencia de fósforo con una proporción C:N:P de 15820:157:1 (M. Peimbert *et al.*, datos no pub.).

Resultados de un análisis metagenómico del tapete microbiano en otra de las pozas rojas muestran que el tapete se encuentra dominado principalmente por *Pseudomonas* (M. Peimbert *et al.*, datos no pub.; G. Bonilla-Rosso, datos no pub.). Resulta entonces interesante tratar de entender la capacidad de diversificación y la

plasticidad fenotípica de una cepa aislada de estos ambientes extremos por las condiciones ambientales así como por la intensidad competitiva.

#### 1.4.2.2. *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* es una bacteria ambiental ubicua y muy plástica, puede crecer en una gran diversidad de ambientes que van desde el suelo hasta tejidos animales y vegetales. Presenta una gran versatilidad metabólica y por eso puede colonizar muy diversos nichos y crecer aún en condiciones hostiles y pobres en nutrientes. Como resultado de esta gran plasticidad, *P. aeruginosa* puede colonizar diversos tejidos y es un patógeno oportunista de gran relevancia médica. Asimismo, esta especie es causante de un importante número de infecciones bacterianas en pacientes inmunocomprometidos, así como la primer causa de mortandad en enfermos de cirrosis quística (Stover *et al.*, 2000; Frimmersdorf *et al.*, 2010; Kung, Ozer y Hauser, 2010; Roy *et al.*, 2010). *P. aeruginosa* crece normalmente en condiciones de aerobiosis; sin embargo en ausencia de oxígeno puede crecer por desnitrificación o fermentación de arginina, utilizando aceptores de electrones alternativos presentes en el ambiente. De igual manera lleva a cabo fermentación de piruvato que, aunque no provee energía para crecimiento en condiciones anaeróbicas, es fundamental para la supervivencia en anaerobiosis al largo plazo (Davies, Lloyd y Boddy, 1989; Eschbach *et al.*, 2004)

Consistente con su gran versatilidad ecológica, el genoma de *P. aeruginosa* es complejo pues a pesar de su gran tamaño, no hay evidencia de duplicaciones recientes y presenta una gran proporción de elementos reguladores. Este genoma, además, contiene una gran cantidad de genes que codifican para proteínas trans-membranales involucradas en adhesión, movilidad, flujo de sustancias tóxicas como los antibióticos y sistemas de dos componentes que le permiten reaccionar a las condiciones ambientales (Stover *et al.*, 2000; Kung, Ozer y Hauser, 2010; Roy *et al.*, 2010).

*P. aeruginosa* puede vivir de forma planctónica o adherida a superficies formando una película bacteriana. El estudio de las películas bacterianas es de gran relevancia debido a que se la formación de estas películas se encuentra asociada a los procesos infecciosos y la resistencia a antibióticos (Drenkard y Ausbel, 2002). La formación de películas no sólo tiene relevancia médica: ecológicamente, la intrincada coexistencia implica una serie de cambios fisiológicos y desempeña un papel fundamental en los procesos de adaptación a distintos ambientes (Davey y O'toole, 2000; Branda *et al.*, 2005). Por un lado pertenecer a una película bacteriana ofrece ventajas como aumento en las interacciones metabólicas debido a la proximidad, y protección contra depredación y estrés. Sin embargo, la alta densidad de células también tiene desventajas como el establecimiento de gradientes dinámicos de nutrientes y toxinas producto del metabolismo (Kiristis *et al.*, 2005).

Las películas bacterianas se componen principalmente de una matriz extracelular que mantiene a las bacterias juntas. En estudios con *P. aeruginosa* se ha determinado que los componentes de la matriz pueden ser tanto moléculas de DNA extracelular, exopolisacáridos (muchas veces asociados a iones fosfato; Sutherland, 2001) como componentes proteínicos. La presencia de los distintos componentes depende de la cepa, las condiciones ambientales y la madurez del biofilm (Allesen-Holm, 2006). De cualquier manera, son moléculas metabólicamente costosas por lo que la formación de películas, junto con los beneficios, tiene fuertes costos asociados.

El crecimiento de películas bacterianas, ya sea en condiciones naturales o en las condiciones del laboratorio provoca la aparición de variantes fenotípicas. Estas nuevas variantes presentan normalmente mayor adhesión e hidrofobicidad y movilidad reducida (Kristis *et al.*, 2005; Workentine *et al.*, 2010). Entender las condiciones en las que se favorece la aparición de estos morfotipos y el papel que desempeña esta

diversidad fenotípica es de gran importancia para entender no sólo la formación de las películas, sino otros procesos asociados como una mayor resistencia a antibióticos, pues algunos de estos fenotipos presentan perfiles de resistencia a antibióticos distintos (Drenkard y Ausbel, 2002; Kristis *et al.*, 2005).

#### **1.4.3. Comunidades de ecotipos de *Pseudomonas fluorescens* (introducción al modelo)**

Uno de los modelos bacterianos más utilizados para estudiar los factores implicados en el origen y mantenimiento de la diversidad son cultivos de *P. fluorescens* en tubos agitados y estáticos (Rainey y Travisano, 1998; MacLean, Bell, Rainey, 2004; Brokhurst *et al.*, 2006; Fukami *et al.*, 2007; Beaumont *et al.*, 2009; Koza *et al.*, 2011). En este modelo se cultiva la misma cepa con ambos tratamientos (agitado y estático) y rápidamente (alrededor de tres días) se obtiene un aumento en la diversidad de morfotipos en el medio sin agitación, debido a la estructuración espacial con respecto a la disponibilidad de oxígeno (Rainey y Travisano, 1998; Koza *et al.*, 2011). En los ambientes homogéneos (medios en agitación), en cambio, se mantiene un solo morfotipo a lo largo de todo el experimento (Rainey y Travisano, 1998). En estas estrategias experimentales se hace una extrapolación entre la aparición de variantes morfológicas y la abundancia de especies en un ecosistema, suponiendo que la diversidad de estas variantes es una expresión de la variabilidad genética que subyace a la formación de nuevas especies.

En este sentido la diversidad morfológica está dada por la competencia por el oxígeno, que, en este caso, es el recurso limitante. Y puede ser considerado un recurso debido a que el oxígeno actúa en este sistema como un factor consumible que permite el crecimiento de los morfotipos, limitando su disponibilidad (Koza *et al.*, 2011).

La diversidad fenotípica de los microcosmos estáticos puede ser agrupada en tres categorías morfológicas ecológicamente distintas: los *wrinkly spreader* (WS) que crecen preferentemente formando una película bacteriana en la interfaz entre el medio y el aire, los *smooth morphs* (SM) que se encuentran principalmente en el medio líquido y los *fuzzy spreaders* (FS). Este último morfotipo habita el fondo de los frascos y es mucho menos común. Los tres morfotipos coexisten por mecanismos dependientes de la frecuencia (Rainey y Travisano, 1998).

Si bien el alcance de este modelo puede ser cuestionado, sobre todo en lo que concierne a la comparación con la diversidad a nivel de especies, es un modelo que presenta varias ventajas para abordar preguntas ecológicas. En estos modelos se trabaja con comunidades en estados de sucesión comparables, formadas por morfotipos que aunque no sean especies, desempeñan roles ecológicos particulares (Rainey y Travisano, 1998; Anexo 1). Además ser organismos con reproducción asexual, se mantienen aislados de las otras entidades ecológicas. Debido a que estos morfotipos surgen por un proceso evolutivo de diferenciación de nicho (Rainey y Travisano, 1998; Spiers *et al.*, 2002), son concordantes con la noción ecológica de unidad evolutiva (Van Valen, 1976), aunque no son lo suficientemente divergentes para considerarlos especies diferentes. Por último, el ambiente puede modificarse desde un principio, evitando así confundir el efecto del cambio de hábitat por eutroficación con el impacto en sí de los recursos. Un problema que se presenta en los experimentos de fertilización con plantas en los que se piensa que la pérdida de diversidad puede estar más relacionada con el cambio ambiental (perturbación) que con el aumento de la productividad en sí (Rosenzweig, 1995).

## II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

---

### 2.1. Objetivos

Para entender algunos de los factores que promueven –o limitan– la coexistencia entre morfotipos dentro de dos especies de *Pseudomonas* de linajes diferentes y con ecologías contrastantes, el objetivo principal de este trabajo es determinar el papel de la heterogeneidad espacial producida por un gradiente de oxígeno en la diversidad de morfotipos, así como en la relación entre productividad (densidad bacteriana) y diversidad.

Para poder cumplir este objetivo, se realizó un experimento en el que se varía tanto la disponibilidad de oxígeno como la heterogeneidad en la concentración de este recurso, comparando así la diversidad y la productividad en un ambiente heterogéneo (sin agitar) vs. un ambiente homogéneo (con agitación).

De forma más particular, se buscó I) determinar si el oxígeno es un recurso limitante para ambas especies de *Pseudomonas* y su efecto en las dinámica y patrones ecológicos encontrados para cada especie; II) obtener información empírica sobre el papel de la heterogeneidad en dos de los parámetros ecológicos de mayor relevancia: la diversidad y la productividad.

### 2.2. Hipótesis

Con respecto a los posibles resultados, en este trabajo se proponen una serie de hipótesis refiriéndose a cada uno de los resultados y patrones posibles:

**Hipótesis 1:** Si el oxígeno es un factor limitante, se espera observar patrones de diversidad fuertemente asociados a la disponibilidad y heterogeneidad del recurso.

**Hipótesis 2:** Si la heterogeneidad ambiental favorece la coexistencia de los morfotipos de cada *Pseudomonas* (Rainey y Travisano, 1998); entonces se espera una mayor diversidad de morfotipos en el experimento donde existe un gradiente de oxígeno que donde se encuentre el oxígeno distribuido de manera homogénea.

**Hipótesis 3:** Si la heterogeneidad ambiental es el mecanismo causal de la relación entre la productividad y la diversidad de morfotipos (Tilman 1982; Tilman y Pacala, 1993; Kassen *et al.*, 2000), entonces se espera, que la relación muestre un patrón unimodal y que éste sea exclusivo de los tratamientos heterogéneos.

**Hipótesis 4:** Si el patrón entre la diversidad y la productividad ocurre en todo el género, entonces se espera encontrarlo en ambas especies aunque los parámetros ecológicos como la diversidad y la productividad sean específicos de cada especie debido a sus diferencias ecológicas y evolutivas.

**Hipótesis 0:** En cambio, si no existen patrones entre la heterogeneidad y la productividad con respecto a la diversidad, es decir si éstos no son componentes importantes para la coexistencia, entonces observaremos que no existe ningún patrón y que cada condición experimental y cada especie tendrán comportamientos diferentes.

## III. METODOLOGÍA

---

### 3.1. Cepas utilizadas

#### 3.1.1. *Pseudomonas* sp. RM051

Esta cepa de *Pseudomonas* fue aislada en noviembre del 2008 del tapete microbiano de la poza “Eguiarte”, una poza roja estacional de la localidad de “Los Hundidos” en Cuatrociénegas, Coahuila (V. Souza, com. pers.). Y pertenece al grupo de *P. fluorescens* y *P. aeruginosa* sin embargo no es ninguna de las especies previamente descritas (G. Bonilla, com. pers.).

#### 3.1.2. *Pseudomonas aeruginosa*

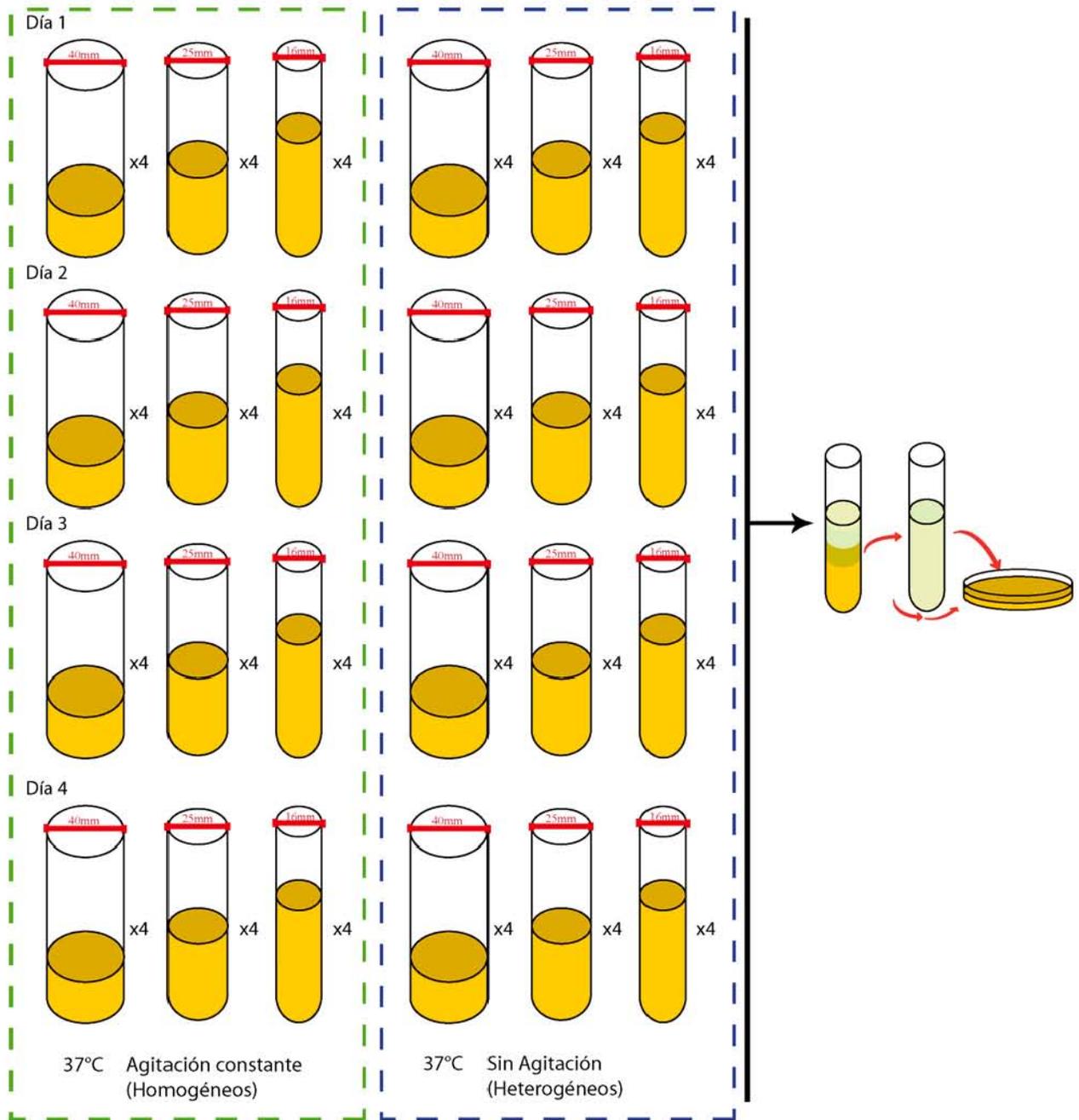
La cepa de *P. aeruginosa* fue aislada recientemente en un lago en Minnesota, Estados Unidos. Sin embargo fue encontrada como contaminación en una colección de *E. coli*.

### 3.2. Experimento de radiación adaptativa en ambientes con distinto grado de heterogeneidad

Con la finalidad de variar la heterogeneidad en la disponibilidad de oxígeno, recurso determinante en el proceso de diversificación de *P. fluorescens* en un medio líquido sin agitación (Rainey y Travisano, 1998; Koza *et al.*, 2011) se varió el área de la interfaz entre el medio y el aire, así como la agitación de los tubos.

Se utilizaron tubos de tres diámetros distintos (16mm, 25mm y 40mm), cada uno con 10ml de medio de cultivo LB (Anexo 3). Se inocularon 24 tubos de cada tamaño (dos condiciones de cultivo (agitados y sin agitar) \* 4 días \* 4 réplicas) con 10µl de un cultivo de 12 horas de *P. aeruginosa*. Una vez inoculados, la mitad de los tubos (12 de

cada diámetro) se colocaron en una incubadora a 37°C con agitación constante a 200 rpm; la otra mitad se incubó también a 37°C, pero los tubos se mantuvieron estáticos (Figura 3.1).



**Figura 3.1.** Diagrama mostrando los tubos utilizados con las condiciones de cultivo. Cada día los tubos correspondientes se agitaron para homogeneizarlos y 10µl del homogeneizado fueron diluidos para sembrar las cajas de Petri.

Cada día, durante cuatro días, se tomaron muestras destructivas de 18 tubos (uno por réplica por tamaño y por tratamiento). Una vez retirado de la incubadora, cada tubo se agitó fuertemente hasta homogeneizarlo completamente. Posteriormente, se tomaron de los tubos homogeneizados, 10µl que se diluyeron hasta una concentración de 1 en 100,000. 100µl de esa dilución se sembraron en una caja de petri con agar LB, donde se dejaron crecer dos días a 37°C (Figura 3.1).

El mismo procedimiento, con las mismas condiciones de cultivo, se realizó utilizando *Pseudomonas* sp. RM051. En este caso, sin embargo, la cuarta réplica estaba contaminada, por lo que no fue utilizada.

### **3.3 Curvas de crecimiento en aerobiosis y microaereofilia**

Para determinar si el oxígeno es un factor limitante en el crecimiento de cada una de las especies de *Pseudomonas* se realizaron dos curvas de crecimiento, una en presencia de oxígeno (aerobiosis) y la otra en condiciones de microaereofilia. Para las curvas aeróbicas se inocularon tres tubos (réplicas) con 100 µl de un cultivo con una absorbancia de 2.2 a una densidad óptica (OD) de 540nm en 5 ml de medio de cultivo LB. Estos tubos se inocularon a 37°C con una agitación constante a 200 rpm. Para la curva anaeróbica se llenaron a tope tubos con tapa de rosca (8.5 ml) con medio LB y se inocularon con 170 µl de un cultivo con una absorbancia de 2.2 a una densidad óptica (OD) de 540nm. De esta manera, se aseguró que la densidad bacteriana previa a la incubación fuera igual para los distintos tratamientos. Las condiciones de incubación para los tubos microanaerofílicos fueron las mismas que para los tubos en presencia de oxígeno.

### 3.4 Determinación de diversidad y productividad

Después de dos días de crecimiento en sólido, se observaron las colonias a simple vista y con un microscopio estereoscópico. Se categorizaron de acuerdo a su forma en distintos morfotipos y se contabilizaron.

En la determinación de la productividad, se utiliza generalmente la biomasa, como una medida del flujo de energía. En estos microcosmos se ha observado que las células son aproximadamente del mismo tamaño sin importar la morfología de la colonia (Häußler *et al.*, 1999; Spiers *et al.*, 2002), por lo que es posible utilizar el número total de unidades formadoras de colonias (UFCs) por mililitro como medida de la productividad (Hodgson *et al.*, 2002). En este estudio en particular, es especialmente relevante utilizar el número de UFCs como medida de la productividad porque permite determinar en qué grado contribuye cada morfotipo a la productividad total. Como los morfotipos sólo pueden ser identificados después de días de crecimiento en la caja de Petri, la biomasa ya no se puede medir en ese punto (debido a que cambia) y por lo tanto no se podría saber que porcentaje de la biomasa corresponde a qué morfotipo.

Para determinar la diversidad fenotípica se registró el número de UFCs por morfotipo distinto. Asimismo, con la finalidad de reducir la inconsistencia en la clasificación de morfotipos, se tomaron fotos como referencia para la asignación posterior. Los distintos morfotipos identificados fueron posteriormente aislados y resembrados. Sólo se consideraron morfotipos distintos aquellos que mantuvieran el fenotipo después de ser resembrados. Por último se creció cada morfotipo en tubos de 25mm de diámetro con 10ml de medio LB, sin agitación para determinar en que región del tubo crecían y si formaban una película bacteriana o no (ver Anexo 1).

### 3.5. Medición de la heterogeneidad ambiental

Para cuantificar el porcentaje de oxígeno presente en los tubos, se midió la concentración de oxígeno disuelto cada micrómetro de profundidad en el centro de cada tubo con un microsensor de oxígeno (OxyMicro de punta cónica de 50 $\mu$ m marca WPI, Sarasota, Florida). Se tomaron muestras en los tubos de *P. aeruginosa* y *Pseudomonas* sp. RM051 al tiempo cero y en el día en que se alcanza la mayor diversidad para cada tubo, tanto en agitación como sin agitar. Se realizaron cuatro réplicas para medir la heterogeneidad.

Con los datos de la concentración de oxígeno a distintas profundidades en cada uno de los tubos se obtuvo el coeficiente de variación (CV). Este parámetro permite comparar la variación relativa de muestras con distintas medias (Sokal y Rohlf, 1987) y por lo tanto se utilizó como el índice de la heterogeneidad espacial de cada tubo con respecto al oxígeno.

Para ver el efecto de la heterogeneidad, primero se realizaron las pruebas de t anidadas para determinar los tubos en los que la heterogeneidad aumenta con respecto al tiempo cero. Los tubos que presentaron diferencias significativas con respecto al tiempo cero se compararon entre sí con pruebas de t anidadas pareadas.

## 3.6. Análisis de datos

### 3.6.1. Diversidad

Para medir la diversidad, se utilizó la familia de índices de diversidad de Hill (números de Hill). Esta familia de índices es una adaptación a la biología de la ecuación de Rényi (1961) para la teoría de la información (Hill, 1973; Magurran, 2007). Estas familias ordenadas de índices permiten, mediante la variación del parámetro de entropía  $\alpha$ , variar el peso relativo de la abundancia con respecto al número total de especies. Los valores de diversidad de esta familia se calculan mediante la función:

$$N(\alpha) = \ln \left[ \left( \sum_{i=1}^S p_i^\alpha \right)^{1/(1-\alpha)} \right]$$

donde  $\alpha > 0$ ;  $p$  es la abundancia relativa de la especie  $i$  (en este caso morfotipo), y  $S$  el número total de especies. En este caso, se consideran los morfotipos en vez de las especies al cuantificar la diversidad. Los distintos valores de diversidad se grafican contra los valores de alfa, de forma que en el lado izquierdo de la gráfica están los índices que asignan un valor mayor al número total de especies y hacia la derecha se presentan aquellos que, en cambio, priorizan la abundancia relativa de las especies. Los valores de  $\alpha=0, 1, 2, \dots, \infty$  se relacionan a los principales índices de diversidad: riqueza, entropía de Shannon, dominancia de Simpson y el índice de Berger-Parker, respectivamente (Hill, 1973; Tóthmérész, 1995; Ricotta, 2003). Aunque  $\alpha=1$  no está definido, se puede demostrar que  $N(1) = \lim_{\alpha \rightarrow 1} N(\alpha)$  es igual al exponencial de la entropía de Shannon ( $e^H$ ):

$$N(1) = \lim_{\alpha \rightarrow 1} N(\alpha) = e^H = e^{\left( -\sum_{i=1}^S p_i \ln(p_i) \right)}$$

mientras que  $\alpha=2$  es equivalente al recíproco del índice de dominancia de Simpson ( $D'$ ), es decir, un índice de diversidad:

$$N(2) = D' = 1 / \left( \sum_{i=1}^S p_i^2 \right)$$

y  $\alpha=\infty$  al recíproco del índice de dominancia de Berger-Parker ( $d'$ ):

$$N(\infty) = \lim_{\alpha \rightarrow \infty} (N(\alpha)) = d' = 1 / p_{max}$$

donde  $p_{max}$  es, en este caso, la proporción del morfotipo dominante con respecto al total.

En este trabajo, la familia de índices de Hill es utilizada para comparar la diversidad de los distintos tratamientos y poder determinar, a su vez, la importancia en cada caso de la dominancia de ciertos morfotipos. Para calcular los números de Hill se utilizó el paquete *VEGAN* para R (Dixon, 2003).

Sin embargo, las comparaciones y correlaciones de diversidad con otros factores ambientales se vuelven mas complejas con las familias de índices, debido a que estas ya incluyen dos dimensiones. En este caso, con fines comparativos, se utilizaron la riqueza, el índice de Shannon y el índice de dominancia de Berger-Parker como indicadores de diversidad. Estos índices se escogieron debido a sus propiedades y por ser repetitivo se sacó el índice de Simpson (los otros tres representan los dos extremos y el punto medio del gradiente).

La riqueza resulta de gran utilidad comparativa, ya que la mayoría de los estudios en que se analiza la relación entre productividad y diversidad se han hecho a partir de la determinación del número total de especies (en este caso la riqueza observada de morfotipos):

$$S_{obs} = \sum_{i=1}^S sp_i$$

donde  $S$  es el número total de especies y  $sp_i$  es la especie  $i$ .

El índice de Shannon, por su parte, resultó dar una mayor resolución para ver las diferencias entre tratamientos en los perfiles de Hill, las pruebas anidadas de  $t$  y las gráficas con los intervalos de los índices de diversidad (ver resultados). Además, estos tres índices representan tres puntos diferentes en el continuo entre el peso que se le asigna a la riqueza y a la dominancia: la riqueza observada sólo considera el número de especies; el índice de Shannon, aunque es difícil de interpretar biológicamente, considera tanto la riqueza como la abundancia relativa de las distintas especies (Magurran, 2007):

$$H = -\sum_{i=1}^S p_i \ln(p_i)$$

y el índice de Berger-Parker es un índice de dominancia que considera únicamente la abundancia relativa de la especie dominante (Magurran, 2007):

$$d = n_{max} / N$$

donde  $n_{max}$  es la cantidad de individuos de la especie (tipo) más abundante y  $N$  la población total.

Para los análisis estadísticos de los tubos de 16mm y 40mm estáticos de *P. aeruginosa* y *Pseudomonas* sp. RM051 se consideró sólo la información de productividad y diversidad correspondiente al cuarto día, para el resto de los tubos se utilizaron los datos del tercer día. En ambos casos, estos son los días en que se alcanza la mayor diversidad de cada comunidad (microcosmo) y se puede pensar que se encuentran, entonces, en estados de sucesión comparables (Rosenzweig, 1995).

Con la finalidad de comparar la diversidad morfológica entre las dos especies y con la literatura citada, se asignaron los distintos morfotipos a categorías morfológicas previamente descritas (Rainey y Travisano, 1998; Kristis, 2005; Workentine *et al.*, 2010) y se graficó el número de morfotipos distintos pertenecientes a cada categoría para las dos especies. Se realizaron curvas de rarefacción por individuos (Gotelli y Colwell, 2001) con el programa EcoSim 7.72 (Gotelli y Entsminger, 2011) para poder comparar la riqueza entre los distintos tratamientos y al mismo tiempo, evaluar la cobertura del muestreo. Los índices de diversidad de los distintos tratamientos fueron comparados estadísticamente con pruebas anidadas de t. Esta prueba de hipótesis es la adecuada para comparar dos grupos con distintos individuos cada uno (ej. tubos con distintas poblaciones bacterianas; Stockburger, 1996). Además, las pruebas fueron realizadas con índices que generalmente se distribuyen de forma normal (Magurran, 2007) y previo al análisis se realizó la prueba de Levene de igualdad de varianzas. En caso de que ésta fuera significativa se realizó el análisis de forma más conservadora, sin asumir igualdad de varianzas (Stockburger, 1996).

### **3.6.2. Relación de la heterogeneidad con la diversidad**

Se realizó un análisis de ajuste de regresión lineal para determinar el patrón entre heterogeneidad y diversidad. Se realizó el ajuste por separado para tubos agitados y sin agitar de las distintas *Pseudomonas* utilizando dos índices de diversidad (riqueza y el índice de Shannon) y uno de dominancia (Berger-Parker).

### **3.6.3. Determinación del oxígeno como factor limitante**

Con la finalidad de determinar la importancia relativa del oxígeno en el crecimiento de las distintas especies se calcularon las diferencias entre cada uno de los tiempos en

que se registró el crecimiento de ambos tratamientos (aeróbico y anaeróbico) para cada especie. Estas diferencias en la absorbancia a 540nm (pico de absorbancia para las células bacterianas) para los dos tratamientos fueron comparadas por medio de una t de Student con respecto a las diferencias entre tratamientos de la otra especie. De esta forma se puede determinar si existe una especie con un crecimiento menos limitado en ausencia de oxígeno con respecto a su crecimiento en presencia de este gas.

#### **3.6.4. Relación entre productividad y diversidad**

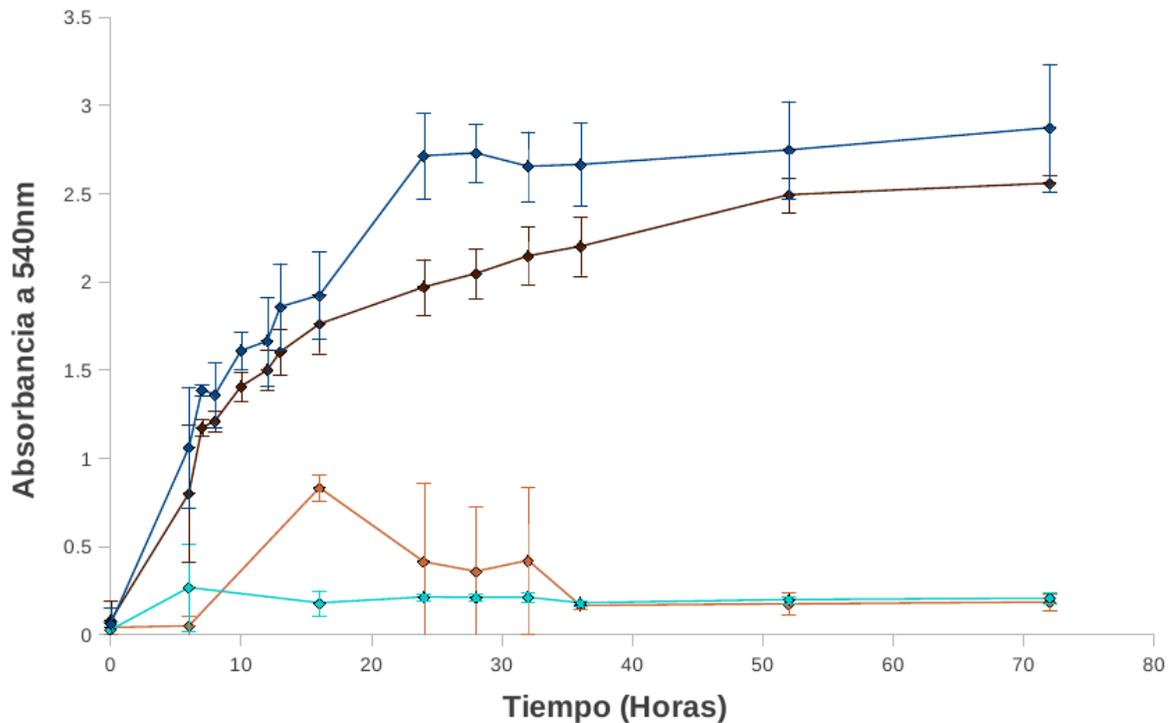
Con el objetivo de determinar el patrón entre la productividad y la diversidad en los microcosmos con *P. aeruginosa* y *Pseudomonas* sp. RM051 se realizó un análisis de ajuste de regresión con un modelo lineal y uno cuadrático para cada una de las especies. Para estos análisis se utilizaron como indicadores de la diversidad: la riqueza y el índice de Shannon; y como indicador de la dominancia: el índice de Berger-Parker.

## IV. RESULTADOS

---

### 4.1. Oxígeno como recurso limitante

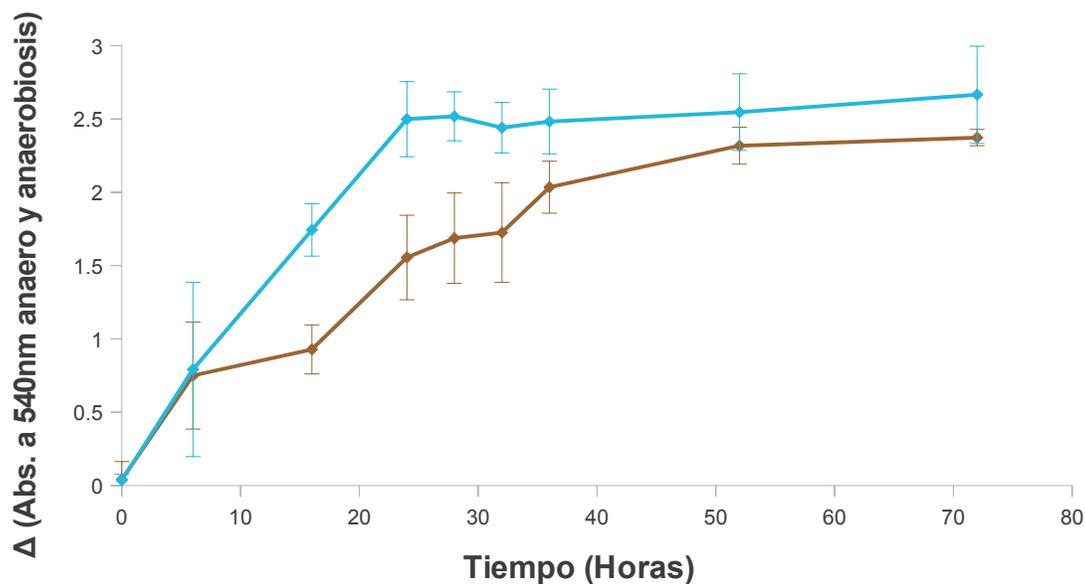
Debido a que el oxígeno se considera el recurso limitante en experimentos similares, utilizando a *P. fluorescens* como modelo (Rainey y Travisano, 1998; Koza *et al.*, 2011), se realizaron las cinéticas de crecimiento de ambas especies (el morfotipo ancestral) en condiciones de aerobiosis y microaereofilia. En estos experimentos se puede ver que ambas especies tienen un crecimiento similar si hay oxígeno disponible. Sin embargo, a las 25 horas el crecimiento de *P. aeruginosa* es más acelerado. Asimismo ambas cepas presentan un crecimiento limitado en condiciones de anaerobiosis. Sin embargo, en ausencia de oxígeno, *Pseudomonas* sp. RM051 alcanza, a las 15 horas, una densidad aproximadamente tres veces mayor que la alcanzada por la otra especie en las mismas condiciones (Figura 4.1).



**Figura 4.1.** Curvas de crecimiento de las dos especies: *P. aeruginosa* (Azules) y *Pseudomonas* sp. RM051 (Cafés), en condiciones de aerobiosis (colores oscuros) y anaerobiosis (colores claros). Las barras de error representan la media  $\pm$  una desviación estándar.

Para poder comparar la diferencia en el crecimiento aeróbico y microaereofílico de cada especie se restaron los valores de absorbancia a 540nm del crecimiento aerobio menos los registrados en condiciones de microaereofilia (Figura 4.2). Estas diferencias se calcularon para los distintos puntos compartidos entre ambos tratamientos. Al graficar estas diferencias se observa que tanto en las densidades iniciales como en las finales, la relación entre el número de bacterias en los cultivos microaereofílicos con respecto al cultivo con disponibilidad de oxígeno es igual, independientemente de la especie. No obstante, cabe resaltar, que la diferencia en la velocidad del crecimiento aerobio respecto al microaereofílico es mayor en el caso de *P. aeruginosa*. Al comparar estas diferencias con una prueba de t estas diferencias, se

obtuvo que son significativas, implicando que hay una mayor diferencia entre el crecimiento aerobio y microaerofílico de *P. aeruginosa* que la encontrada para *Pseudomonas* sp. RM051 ( $t= 2.055$ ,  $gl= 52$ ,  $p<0.05$ ).



**Figura 4.2.** Diferencia entre las curvas de crecimiento en microaerobiosis y anaerobiosis de las dos especies: *P. aeruginosa* (Azul) y *Pseudomonas* sp. RM051 (Café). Las barras de error representan la media  $\pm$  una desviación estándar.

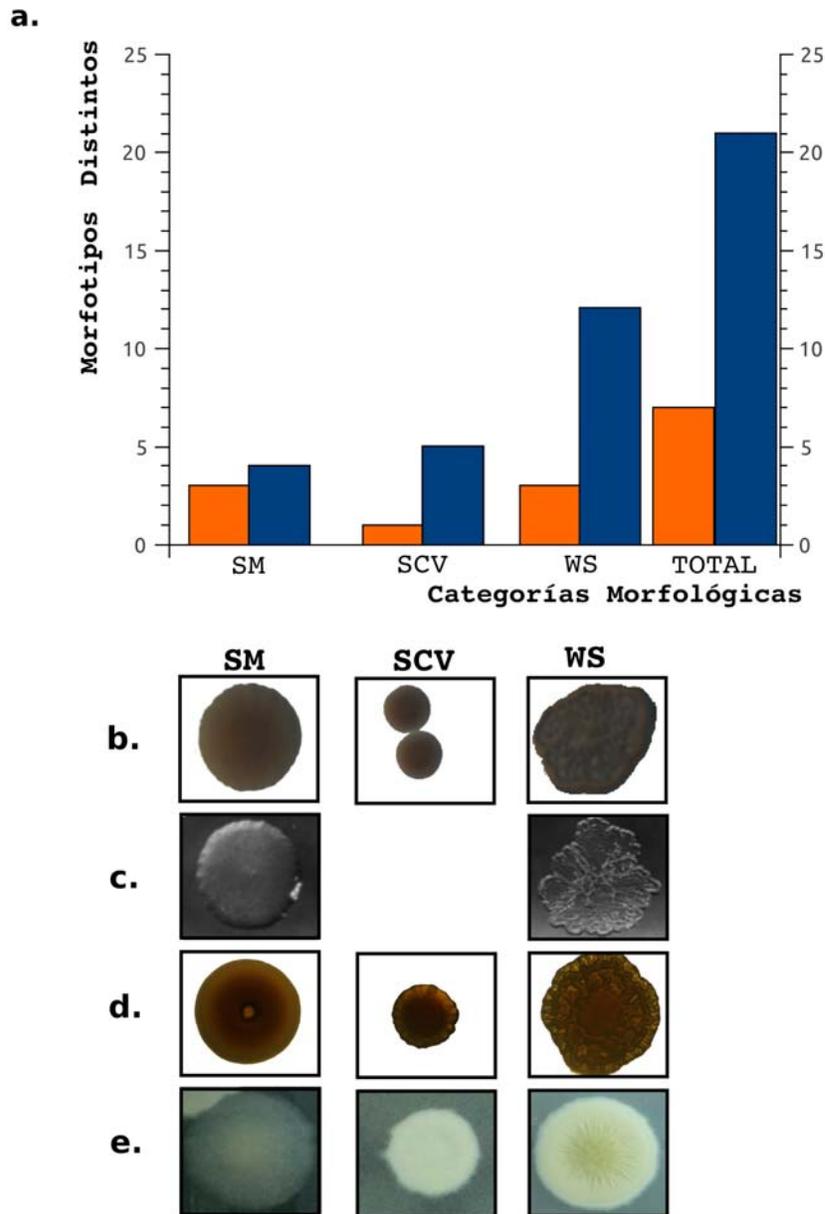
Sin embargo, cabe resaltar que ninguna de estas bacterias crece realmente en condiciones de anaerobiosis y que, por lo tanto se puede considerar el oxígeno como un recurso limitante en ambos casos.

## 4.2. Diversidad

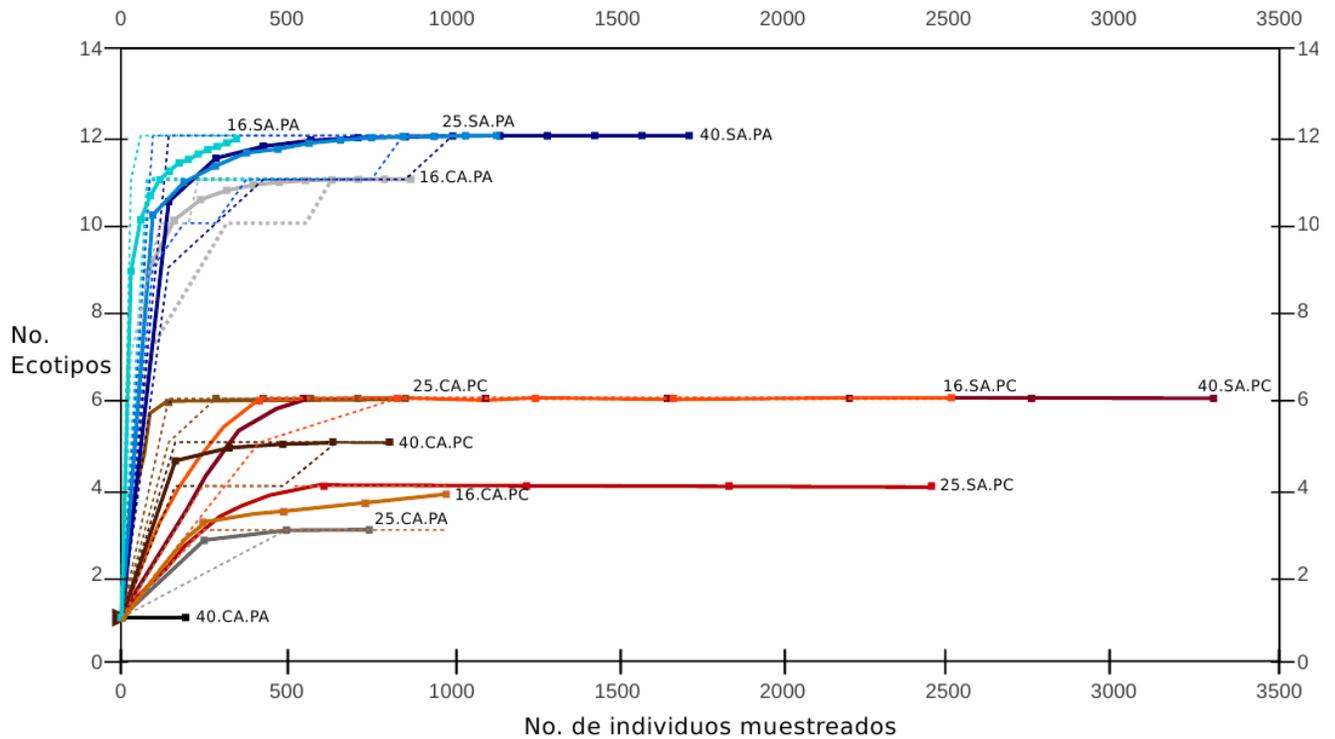
Al ser un carácter complejo y multidimensional, la diversidad de morfotipos en cada tubo de ensayo se caracterizó de varias formas para obtener una mayor información y poder comparar los distintos tubos. La primera comparación que se realizó fue una descripción general de la distribución de los morfotipos en categorías descritas para *P. fluorescens* (Rainey y Travisano, 1998; Workentine *et al.* 2010) y *P. aeruginosa* (Drenkard y Ausbel, 2002; Kristis, 2005). Los distintos morfotipos fueron asignados de acuerdo a sus características a tres categorías previamente descritas: SM (smooth morph), WS (wrinkly spreader) (Rainey y Travisano, 1988) y SCV (small colony variants) (Drenkard y Ausbel, 2002; Workentine *et al.* 2010; Figura 4.3 a-c).

En la figura 4.3 a se puede observar que dentro de cada categoría morfológica se encontró una mayor cantidad de morfotipos distintos para los tubos de *P. aeruginosa* que para los tubos de *Pseudomonas* sp. RM051. Sin embargo, cabe notar que la diferencia es menor dentro de la categoría SM y más pronunciada al comparar el número de WS distintos. En cambio, la *Pseudomonas* de Cuatro Ciéneas (*Pseudomonas* sp. RM051) casi no mostró diversidad en esta categoría; de hecho, ésta es mucha menor que la registrada en los experimentos con *P. fluorescens* (M. Travisano, com. pers.). Aunque informativa, esta primera aproximación es sobre todo descriptiva por lo que se realizaron más análisis para comparar los distintos tratamientos y cuantificar las diferencias.-

Para determinar si el muestreo había sido adecuado—se realizaron curvas de rarefacción por individuos (Gotelli y Colwell, 2001) para los distintos tratamientos: los tres diámetros, agitados y sin agitar, para las dos especies de *Pseudomonas* (Figura 4.4).



**Figura 4.3. a.** Gráfica de barras en la que se representan el número de morfortipos distintos por categoría morfológica. Azul- *P. aeruginosa* Naranja- *Pseudomonas sp. RM051*. Las categorías morfológicas son las reportadas para *Pseudomonas* en otros artículos (c. Rainey y Travisano, 1998, *P. fluorescens*; Kristis, 2005, *P. aeruginosa*; b. Workentine *et al.*, 2010, *P. fluorescens* ). **b-e.** Fotografías de morfortipos pertenecientes a cada una de las categorías morfológicas. **d-e.** Ejemplos de morfortipos de cada una de las categorías obtenidos en el presente trabajo. **d.** *P. aeruginosa* **e.** *Pseudomonas sp. RM051*. Los datos son de todos los días en que se tomaron muestras.



**Figura 4.4.** Curvas de rarefacción basadas en individuos para los distintos tratamientos. 16, 25 y 40, así como los colores de claro a oscuro, respectivamente; representan los distintos diámetros de los tubos en milímetros. En azules los tubos de *P. aeruginosa* (PA) sin agitar (SA); en grises los tubos de *P. aeruginosa* con agitación (CA); así como en rojos-naranja y cafés los tubos de *Pseudomonas* sp. RM051, sin agitar (SA) y con agitación (CA) respectivamente. Las líneas punteadas representan los intervalos de confianza al 95%.

Todas las curvas de rarefacción obtenidas presentan una forma asintótica, lo que indica que el muestreo tiene una cobertura adecuada y que aunque se hubiera muestreado más no se hubieran obtenido una mayor cantidad de morfotipos (o en dado caso, sólo unos pocos nuevos morfotipos). Se pueden observar, en la figura anterior dos grandes grupos en cuanto a la riqueza morfológica: un grupo de alta riqueza (entre 10-12 morfotipos) comprendido por los tubos sin agitar y el tubo de 16mm agitado de *P. aeruginosa*; y un grupo de menor riqueza que contiene a todos los tubos de la *Pseudomonas* de Cuatro Ciénegas, así como a los tubos de 25 y 40 mm de diámetro

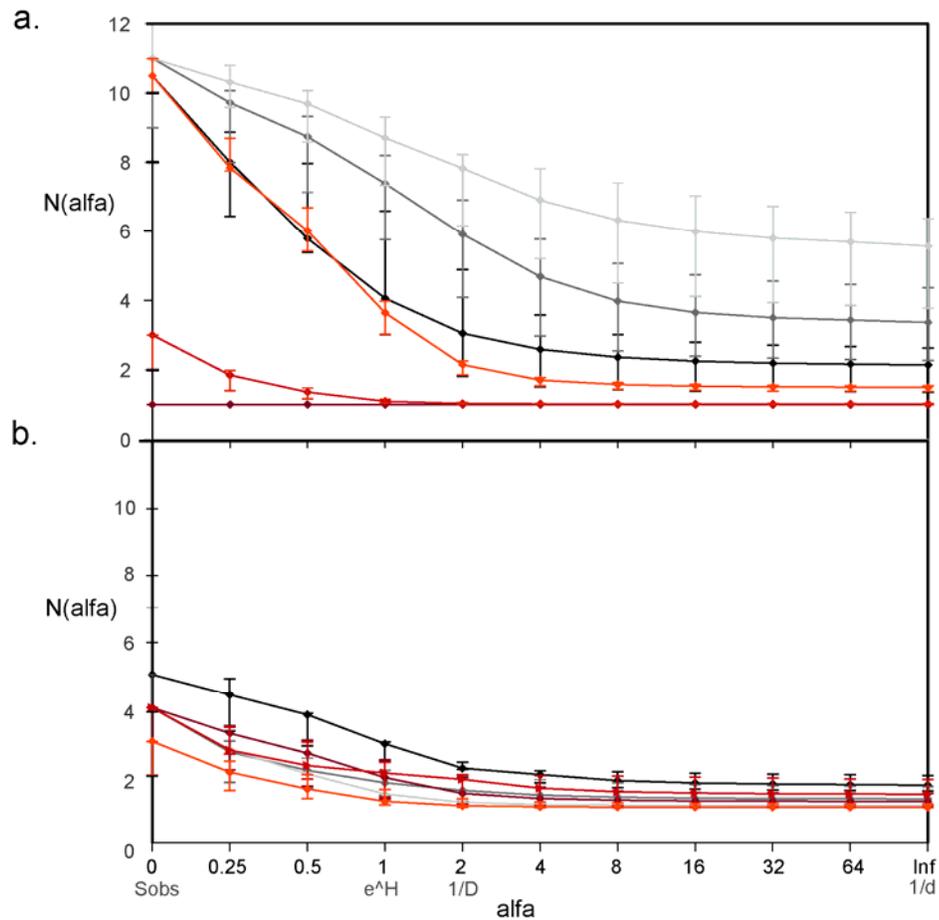
agitados de *P. aeruginosa*. Los intervalos de confianza al 95% de los tubos sin agitar de *P. aeruginosa* se traslapan entre sí y con el tubo de 16mm agitado. Sin embargo, dentro del grupo de baja diversidad, se observa que se sobreponen los datos ni entre los tubos agitados de cada especie, ni entre los tubos de 40 y 16mm sin agitar con el tubo de 25mm de *Pseudomonas* sp. RM051, sugiriendo que la riqueza de morfotipos es distinta entre estos tubos (Figura 4.4).

El número de especies (o en este caso morfotipos) no es el único componente de la diversidad en una comunidad. Por lo que se calcularon los números de Hill ( $N(\alpha)$ ) con respecto a distintos valores del parámetro  $\alpha$ . Cabe recordar que esta función está definida de forma que conforme aumenta el valor de  $\alpha$ , aumenta el valor relativo de la abundancia contra la riqueza, por lo que los extremos (0 y  $\infty$ ) representan respectivamente el número de tipos distintos y el inverso de Berger-Parker, que es un índice que refleja la abundancia del tipo dominante con respecto al total (Figura 4.5). Además, se obtuvieron distintos índices de diversidad ( $S_{Obs}$  y  $H$ ) y de dominancia ( $D$  y  $d$ ) y para compararlos se utilizaron dos métodos: se graficó el mínimo, la media y el máximo de cada índice, para cada tratamiento (Figura 4.6) y se realizaron pruebas de anidadas de  $t$  pareadas para determinar si existían diferencias estadísticas entre las muestras con los mismos índices, a excepción de Simpson (Anexo 4).

Las pruebas anidadas de  $t$  comparando los índices de diversidad para los distintos morfotipos confirman lo observado con los resultados anteriores: las dos especies son distintas al comparar los tubos sin agitación ( $S_{obs}$ -  $gl=19$ ,  $t=11.784$ ,  $p<0.001$ ;  $H$ -  $gl=19$ ,  $t=7.726$ ,  $p<0.001$ ;  $d$ - $gl=19$ ,  $t=-5.403$ ,  $p<0.001$ ) pero no presentan diferencias significativas al comparar los tratamientos con agitación constante (Anexo 4.1). Especialmente cabe resaltar que, mientras que no existen diferencias entre los tubos agitados y sin agitar de *Pseudomonas* sp. RM051, existen diferencias entre los

tratamientos de *P. aeruginosa* (Anexo x).

En los perfiles de Hill (gráficas de  $N(\alpha)$  con respecto a  $\alpha$ ; Fig. 4.5) se observan, nuevamente, dos grandes grupos en cuanto a la diversidad (en este caso es la diversidad a lo largo de sus dos componentes) en el perfil de *P. aeruginosa*. Un primer grupo integrado por los microcosmos sin agitar y el tubo agitado de 16mm de diámetro y otro grupo conformado por los tratamientos en agitación de 25 y 40mm. Además, es posible observar que si bien hay dos grupos grandes, al interior de cada grupo encontramos tratamientos que no se traslapan en toda la extensión del intervalo (barras de error en la Figura 4.5 a), implicando que son diferentes con respecto a la diversidad. Éste es el caso de los tratamientos estáticos de mayor y menor diámetro que, a pesar de tener intervalos completamente traslapados cuando  $\alpha = 0 = S_{obs}$  (Figura 4.3 a), consistente con los resultados obtenidos en las curvas de rarefacción (Figura 4.2); están claramente diferenciados para toda  $\alpha > 0$ . Lo mismo puede decirse para el tubo de 16mm agitado con respecto a los tubos de 25 y 16 mm sin agitar, sólo que para  $\alpha \geq 0.5$ . Cabe resaltar que, al igual que en las curvas de rarefacción, este último tratamiento es mucho más diverso que los otros dos tubos en agitación (Figura 4.5 a).



**Figura 4.5.** Perfiles de Hill en los cuales se grafica el índice  $\alpha$  con respecto al resultado de aplicarle a los datos la función de Hill  $N(\alpha)$  para distintos valores de  $\alpha$ . Cuando  $\alpha$  vale 0, 1, 2 e infinito son, respectivamente, la riqueza, el exponencial del índice de entropía de Shannon y los recíprocos de los índices de dominancia de Simpson y Berger-Parker. **a.** *P. aeruginosa*. **b.** *Pseudomonas* sp. RM051. En rojos y naranja los tubos agitados y en grises los estáticos. Rojo oscuro y negro- tubos con 40mm de diámetro. En rojo y gris claros los tubos con 25 mm y en naranja y el gris más claro los tubos de 16mm de diámetro. Los puntos representan la mediana y las barras de error el intervalo.

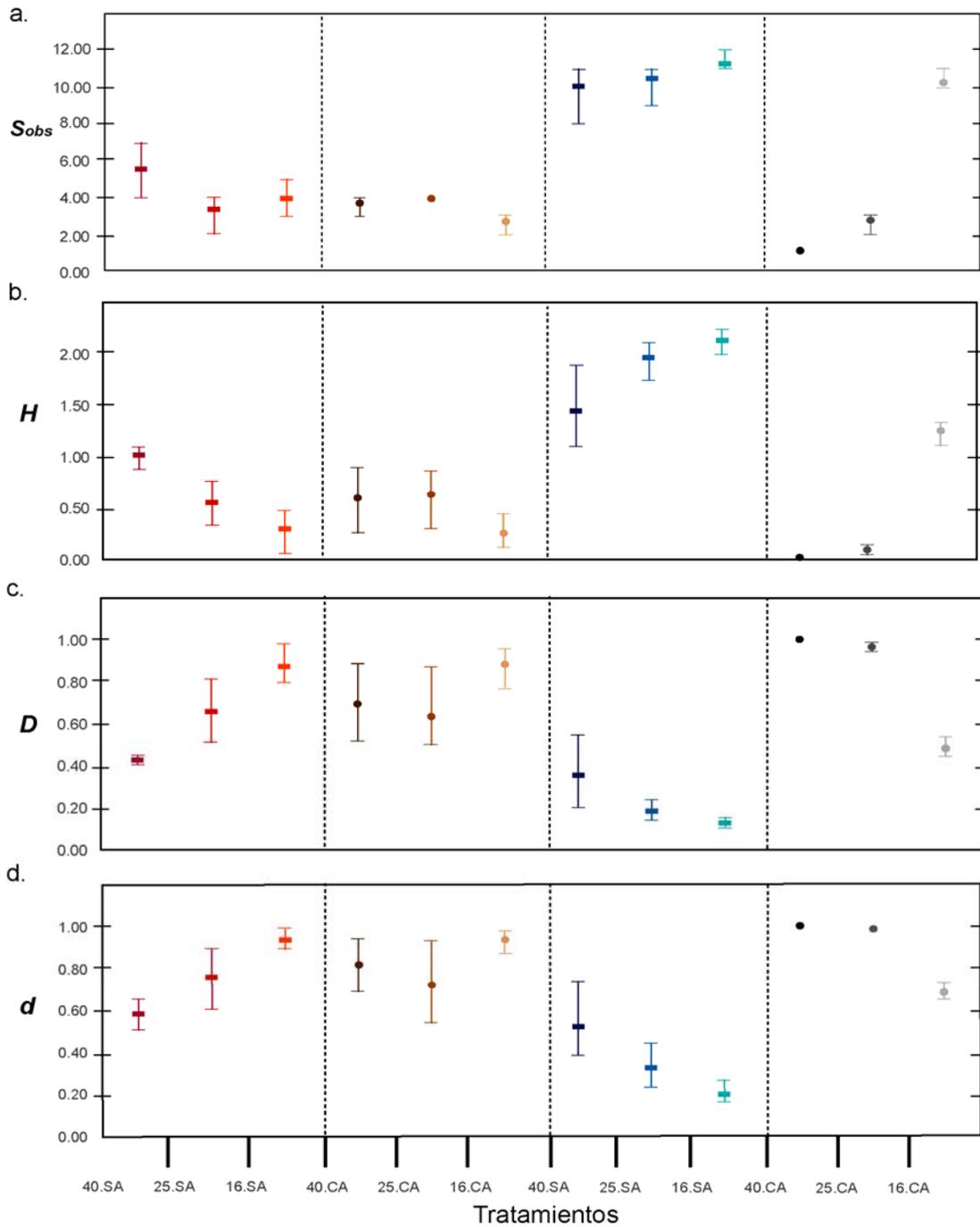
Como era de esperarse de acuerdo a los resultados anteriores, la diferencia entre los tubos estáticos de *P. aeruginosa* con 16 y 40mm de diámetro resultó estadísticamente significativa al compararlos con los índices de Shannon (H) y Berger-Parker (H-gl=6,  $t=-4.043$ ,  $p<0.01$ ; d-gl=6,  $t=3.819$ ,  $p<0.01$ ). Asimismo, con esta prueba se puede ver que, aunque no lo parezca en el perfil de Hill, el índice de Shannon de

25mm es diferente al de 40mm de diámetro ( $H\text{-}gl=6$ ,  $t=-2.847$ ,  $p<0.05$ ; Anexo 4.2).

En contraste con los tratamientos sin agitar, en los microcosmos de *P. aeruginosa* agitados hay un claro efecto del diámetro, y en todas las comparaciones realizadas por medio de las pruebas anidadas de  $t$ , se obtuvieron diferencias significativas (Anexo 4.3). Estas diferencias se pueden entender, en parte por la gran diversidad en el tubo de 16 mm agitado (no es un ambiente homogéneo pues la superficie de contacto con el aire es muy pequeña y el oxígeno se vuelve limitante), así como por la ausencia de diversidad en el tubo de 40 mm (es el único que está bien aireado).

A diferencia de lo observado para *P. aeruginosa*, en el perfil de Hill de las *Pseudomonas* de Cuatro Ciénegas (Fig.4. 5. b) no se observan grupos claramente distintos. Además, aunque algunos tubos son diferentes (ej. tubo de 40 mm sin agitar y tubo de 16 mm en constante agitación) no parece haber un patrón y varias de las líneas en la gráfica se cruzan, indicando que ninguna es más diversa que la otra, (Tóthmérész, 1995; Ricotta, 2003; Figura 4.5 b).

En la Figura 4.6 se muestran el mínimo, media y máximo valor de los distintos índices de diversidad ( $S_{obs}$  y  $H$ ) y de dominancia ( $d$ ), así como las pruebas anidadas de  $t$  pareadas,. En general los resultados son consistentes con las figuras anteriores; sin embargo, en estas gráficas y análisis se puede observar con mayor detalle que también existen diferencias entre los tubos de 16 y 40mm sin agitar de *Pseudomonas* sp. RM051 ( $H\text{-}gl=4$ ,  $t=5.283$ ,  $p<0.01$ ;  $d\text{-}gl=4$ ,  $t=-6.739$ ,  $p<0.005$ ). De igual manera, se observan diferencias entre los tubos sin agitar de 40 y 25mm; no obstante, este efecto es exclusivo del índice de Shannon ( $H\text{-}gl=4$ ,  $t=3.335$ ,  $p<0.05$ ; Anexo 4.4). Por otro lado, los tubos sin agitar no exhiben diferencias de acuerdo al diámetro como sería de esperarse en un ambiente en el que la distribución de los recursos es homogénea (Anexo 4.5).



**Figura 4.6.** Media, el valor mínimo y el valor máximo de distintos índices de diversidad (a. Riqueza observada  $S_{obs}$ , b. diversidad Shannon  $H$ ) y dominancia (c. Simpson  $D$  y d. Berger-Parker  $d$ ), para los distintos tamaños de tubo (40mm (40-oscuro), 25mm (25-medio) y 16mm (16-claro)) y las dos especies (*P. aeruginosa* en cuadros azules los tubos sin agitar (SA) en círculos grises los tubos agitados (CA) y los tubos sin agitar (SA) de *Pseudomonas* sp. RM051 en cuadros rojos y con agitación los círculos cafés (CA).

### 4.3. Heterogeneidad

La heterogeneidad en la disponibilidad de oxígeno se calculó como el coeficiente de variación (CV) en la concentración de oxígeno disuelto a distintas profundidades. La primera medición se hizo en los tubos de los tres diámetros, previamente a la inoculación con *Pseudomonas* (Tabla 4.1).

**Tabla 4.1.** Tabla en la que se muestran el intervalo, la media y la desviación estándar para los coeficientes de variación en la concentración de oxígeno de los distintos tubos al tiempo cero.

Diámetro	Intervalo	Media	Desv. Estándar
16mm	0.046-0.0509	0.0509	0.0069
25mm	0.01-0.012	0.0112	0.0009
40mm	0.008-0.0148	0.0116	0.0036

Las siguientes mediciones se realizaron en la mayor parte de los tubos 72 horas después de haber sido inoculados, con excepción de los tubos sin agitar de 16mm con *P. aeruginosa* y el de 40mm con *Pseudomonas* sp. RM051, cuyas medidas fueron tomadas el día 4 que fue cuando alcanzaron su diversidad máxima.

En general los valores del CV al tiempo cero son bajos (de 0.008-0.0509; Tabla 4.1) al igual que en los tubos en agitación constante (de 0.009 a 0.06 para *Pseudomonas* sp. RM051 y de 0.01 a 0.02 con *P. aeruginosa*). No obstante, en el tubo de 16mm de diámetro con *P. aeruginosa* se registraron valores un orden de magnitud más grandes (0.54-0.579; Tabla 4.2), valores más cercanos a los obtenidos para los tubos estáticos (Tabla 4.3).

**Tabla 4.2.** Tabla en la que se muestran el intervalo, la media y la desviación estándar para los coeficientes de variación en la concentración de oxígeno de los distintos tubos agitados al día en el que alcanzan la mayor diversidad. PA- *P. aeruginosa* PC- *Pseudomonas* sp. RM051.

<b>Diámetro</b>	<b>Intervalo</b>	<b>Media</b>	<b>Desv. Estándar</b>
16mm.PA	0.54-0.579	0.5531	0.0222
25mm.PA	0.01-0.02	0.0148	0.0049
40mm.PA	0.012-0.019	0.0165	0.0035
16mm.PC	0.047-0.06	0.0608	0.007
25mm.PC	0.009-0.019	0.0129	0.0049
40mm.PC	0.014-0.025	0.0189	0.0053

Sin embargo, a los pocos días (3 o 4 dependiendo el tubo), las bacterias en los tubos sin agitación consumen el oxígeno creando un gradiente en el que se agota por completo el recurso a pocos  $\mu\text{m}$  de profundidad. Este gradiente genera una mayor heterogeneidad espacial y por tanto un aumento en el CV en la concentración de oxígeno disuelto (Tabla 4.3).

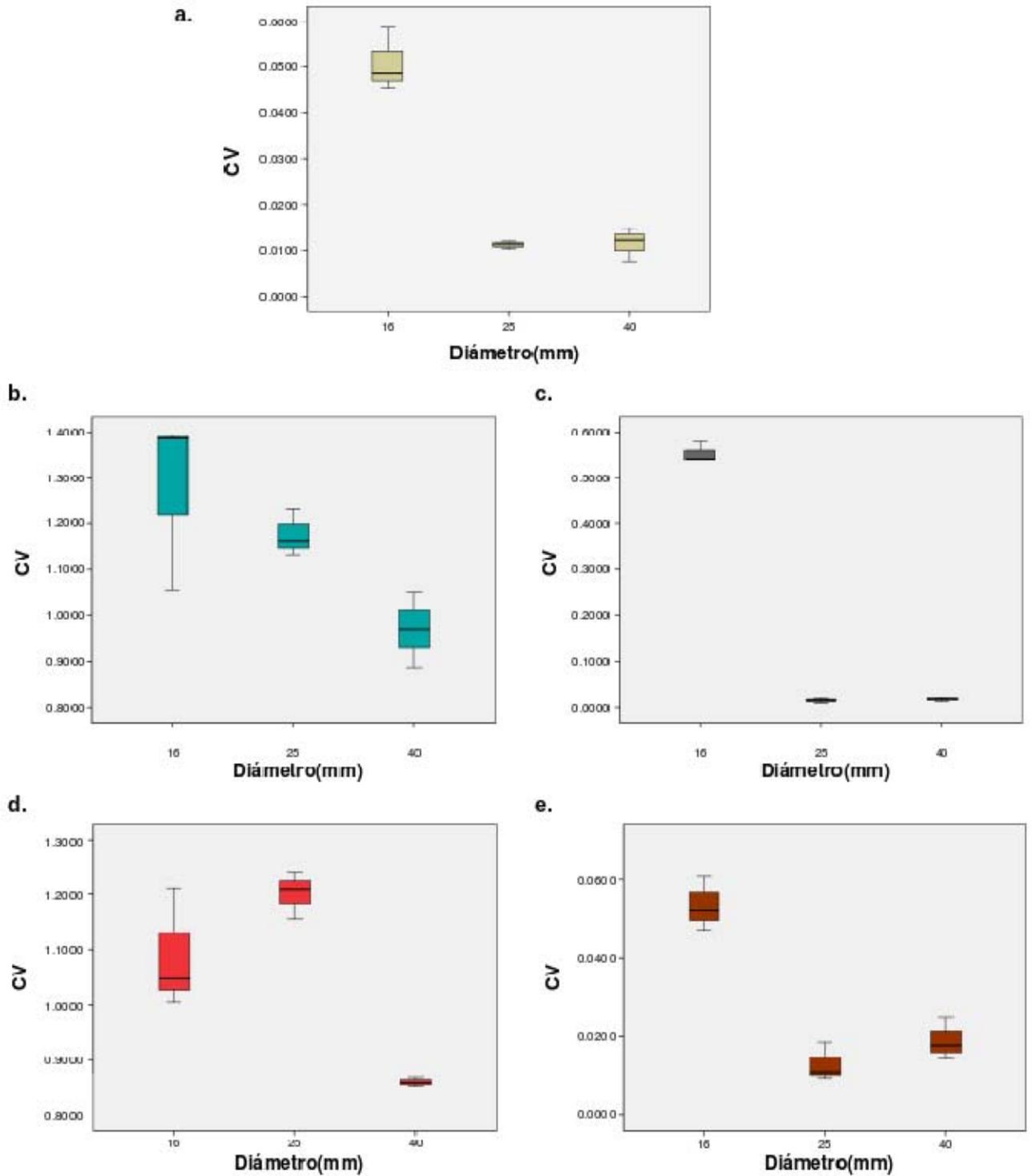
**Tabla 4.3.** Tabla en la que se muestran el intervalo, la media y la desviación estándar para los coeficientes de variación en la concentración de oxígeno de los distintos tubos sin agitar al día en el que alcanzan la mayor diversidad. PA- *P. aeruginosa* PC- *Pseudomonas* sp. RM051.

<b>Diámetro</b>	<b>Intervalo</b>	<b>Media</b>	<b>Desv. Estándar</b>
16mm.PA	1.057-1.392	1.2781	0.1919
25mm.PA	1.134-1.234	1.1769	0.0516
40mm.PA	0.8872-1.052	1.0518	0.0823
16mm.PC	1.005-1.213	1.0885	0.1099
25mm.PC	1.156-1.241	1.241	0.043
40mm.PC	0.853-0.869	0.8602	0.0083

En los tubos sin agitar con *P. aeruginosa* el diámetro parece ser inversamente proporcional a la heterogeneidad en la disponibilidad de oxígeno, siendo el tubo de mayor diámetro el menos heterogéneo y viceversa. En cambio en los tubos de *Pseudomonas* sp. RM051 el de 25mm es más heterogéneo que el de 16mm. El de 40mm es el menos heterogéneo, también en este caso (Tabla 4.3). Sin embargo, en ambos casos (los tubos de *P. aeruginosa* y de *Pseudomonas* sp. RM051) hay mucha variación entre las distintas réplicas de los tubos de 16mm y por lo tanto sólo hay diferencias significativas entre los tubos de 40 y 25mm (Figura 4.7; Tabla 4.4).

**Tabla 4.4.** Pruebas anidadas de t pareadas comparando los CV en la concentración de oxígeno disuelto a distintas profundidades para los tubos con mayor heterogeneidad (Tabla 4.1). *P. aeruginosa* (PA) y *Pseudomonas* sp. RM051 (PC). Los asteriscos denotan significancia con un valor de  $p < 0.05$ . En los casos en que la prueba de Levene fue significativa se realizaron las pruebas anidadas de t sin asumir varianzas iguales.

Tubos sin agitar	Prueba de Levene (Igualdad de varianzas)			Prueba de t	
	F	p	gl	T	p
PA (40mm vs. 25mm)	0.325	0.599	4	-3.689	0.021*
PA (40mm vs. 16mm)	4.071	0.114	4	-2.556	0.063
PA (25mm vs. 16mm)	7.865	0.049*	2.288	0.882	0.460
PC (40mm vs. 25mm)	4.523	0.101	4	-13.520	0.000*
PC (40mm vs. 16mm)	10.218	0.033*	2.023	-3.589	0.068
PC (25mm vs. 16mm)	3.781	0.124	4	-1.675	0.169
Tubos con agitación	F	p	gl	T	p
PA (40mm vs. 16mm)	11.053	0.029*	2.098	-41.299	0.000*
PA (25mm vs. 16mm)	9.088	0.039*	2.195	-40.938	0.000*



**Figura 4.7.** Gráficas de cajas y bigotes del CV de la concentración de oxígeno disuelto a distintas profundidades. **a.** Tiempo cero (beige); **b.** y **c.** *P. aeruginosa*; **b.** Tubos sin agitar (azul); **c.** Tubos con agitación (gris); **d.** y **e.** *Pseudomonas* sp. RM051; **d.** Tubos sin agitar (rojo); **e.** Tubos agitados (café).

#### 4.4. Efecto de la heterogeneidad sobre la diversidad

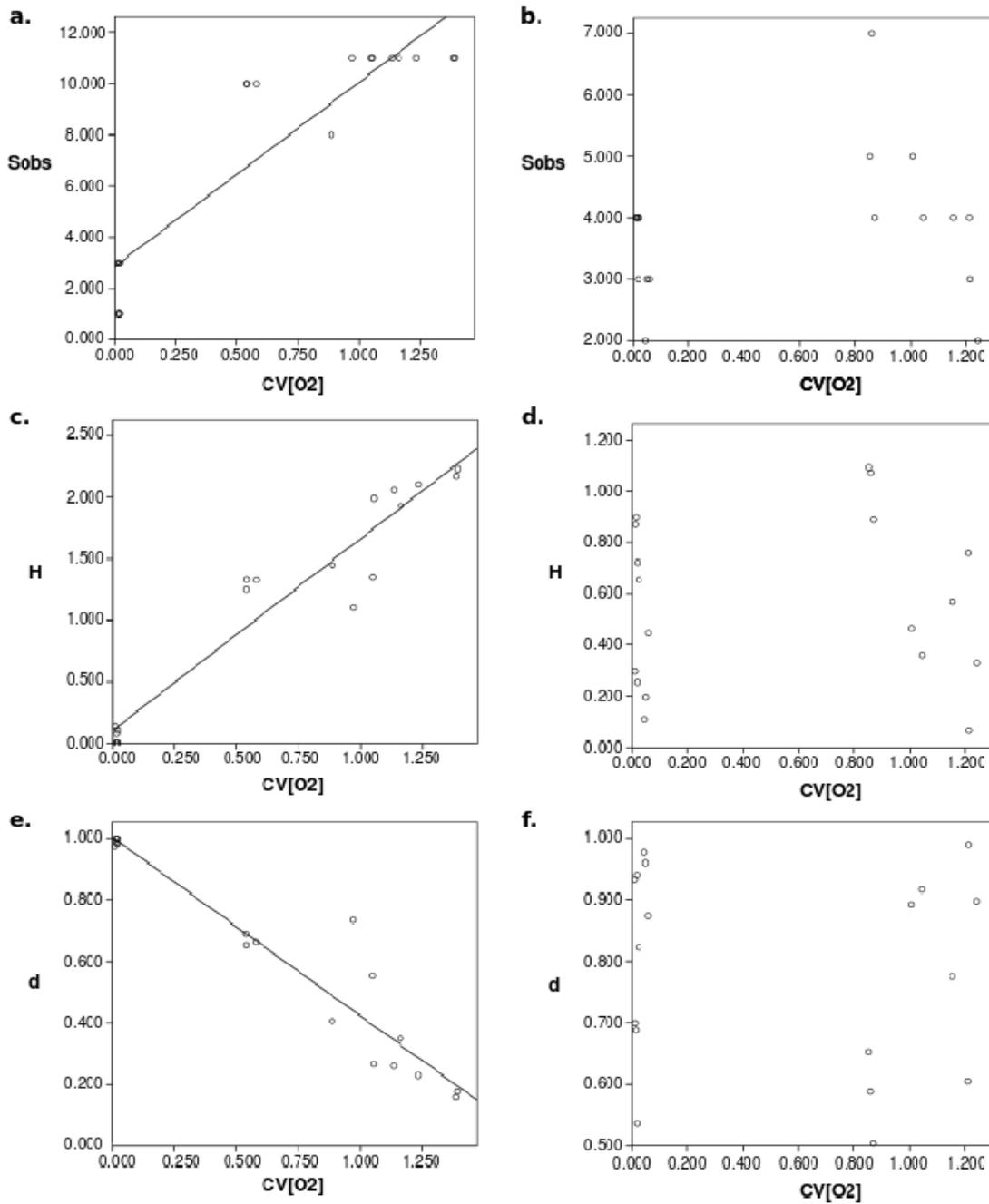
Con la finalidad de ver el efecto que tiene la heterogeneidad espacial en la distribución de oxígeno con respecto a la diversidad de los microcosmos de cada una de las dos especies, se graficó el CV de la concentración de oxígeno contra distintos índices de diversidad (Riqueza observada  $S_{obs}$ , Shannon H), así como el índice de dominancia de Berger-Parker (d) y se realizaron las correspondientes regresiones lineales (Figura 4.8, Tabla 4.5).

**Tabla 4.5.**  $R^2$  y resultados de ANOVA de la regresión lineal (Figura 4.8) para ver la relación entre heterogeneidad en el recurso (CV en la concentración de oxígeno) y la diversidad (determinada por los índices  $S_{obs}$ , H y d) para los microcosmos de las distintas especies: *P. aeruginosa* (PA) y *Pseudomonas* sp. RM051. Datos día en que los tubos alcanzaron la mayor diversidad. El asterisco indica valores significativos.

	$R^2$	F	gl	p
Sobs (PA)	0.827	76.261	17	0.000*
Sobs(PC)	0.041	0.687	17	0.419
H(PA)	0.927	203.329	17	0.000*
H(PC)	0.005	0.086	17	0.773
d(PA)	0.916	175.441	17	0.000*
d(PC)	0.002	0.199	17	0.662

En estos resultados se observa que, como era de esperarse, la heterogeneidad es directamente proporcional a la diversidad e inversamente proporcional a la dominancia en los microcosmos de *P. aeruginosa* ( $S_{obs}$ - $R^2=0.827$ ,  $F=76.261$ ,  $gl=17$ ,  $p<0.001$ ;  $H$ - $R^2=0.927$ ,  $F=203.329$ ,  $gl=17$ ,  $p<0.001$ ;  $d$ - $R^2=0.916$ ,  $F=175.441$ ,  $gl=17$ ,  $p<0.001$ ). Los tubos con *Pseudomonas* sp. RM051, sin embargo, no presentan relación

alguna entre diversidad y heterogeneidad espacial (Figura 4.8, Tabla 4.5).

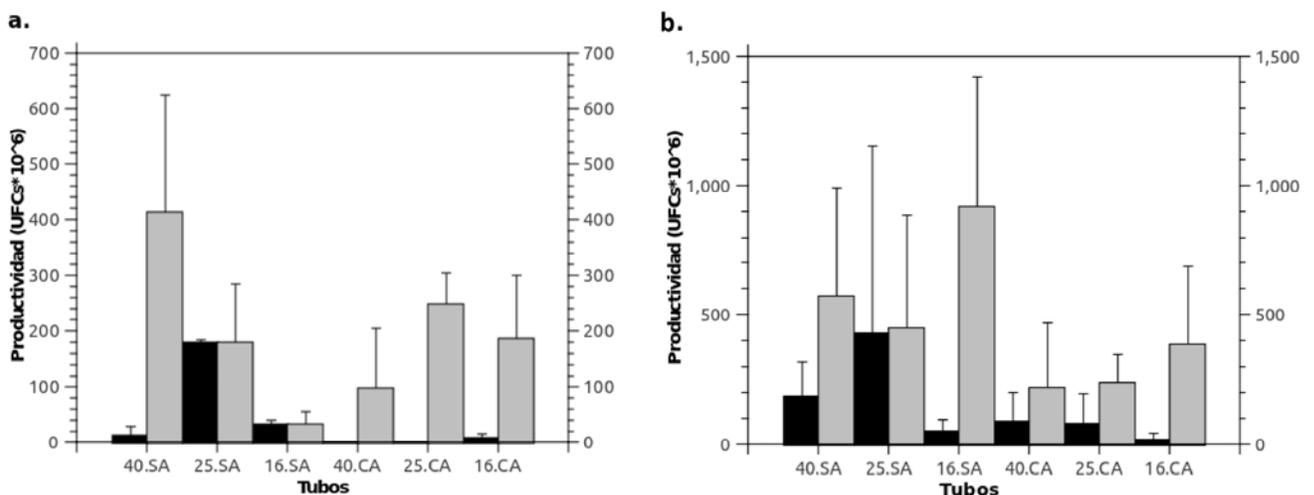


**Figura 4.8.** Gráficas de diversidad (Riqueza observada- Sobs, Shannon- H y Berger-Parker d) con respecto a la heterogeneidad (medida como el CV de la concentración de oxígeno en los distintos tubos a lo largo de un gradiente de profundidad). **a.c.e.** *Paeruginosa*. **b.d.f.** *Pseudomonas sp. RM051*.

## 4.5. Productividad

Se graficó la productividad, medida como unidades formadoras de colonias en medio sólido de las principales categorías de morfotipos (de acuerdo a su abundancia relativa en los distintos tubos): SM y WS. En todos los tubos la productividad de SM era mayor a la de WS; no obstante, la proporción de SM con respecto a WS resultó muy variable y por tanto más informativa al momento de comparar los tubos.

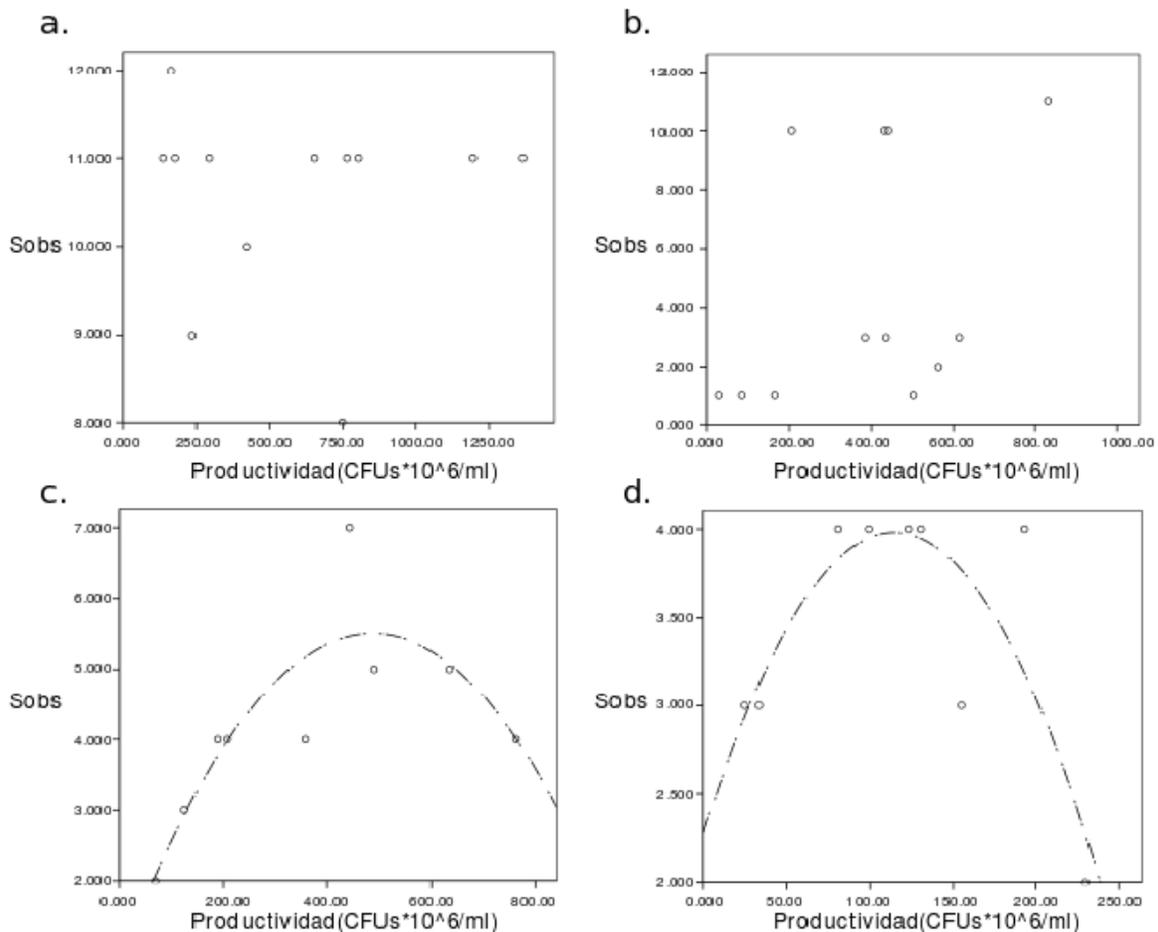
Los tubos agitados de *P. aeruginosa* eran muy poco productivos en términos de WS, casi no se registraron UFCs de ésta categoría. En cambio, en los tubos sin agitar de 25 y 16mm de diámetro la proporción de la productividad de SM y WS era aproximadamente 1:1. Por su parte, el tubo de 40mm de diámetro mostró la mayor productividad de SM y una muy baja de WS. En los tubos de *Pseudomonas* sp. RM051 es de notarse la desequilibrada proporción WS: SM en el tubo de 16mm sin agitar. Sin embargo, no parece haber un patrón, a excepción de la diferencia de productividad entre los tubos sin agitar y los agitados (Figura 4.9).



**Figura 4.9.** Gráficas de barras representando la productividad (UFCs) por tubo de las dos categorías morfológicas principales WS (en negro) y SM (en gris). Las barras de error representan una desviación estándar. **a.** *P.aeruginosa* **b.** *Pseudomonas* sp. RM051. 40, 25 y 16 son los diámetros de los distintos tubos; SA- sin agitar; CA- con agitación.

## 4.6. Relación entre productividad y diversidad

Posteriormente se realizaron los análisis de ajuste de dos modelos distintos (cuadrático y lineal) para los datos de diversidad en relación a la productividad, medida como el total del número de unidades formadoras de colonias por ml (UFCs/ml). Estos datos, al igual que los de análisis anteriores, fueron registrados en el día en que cada tratamiento alcanza la mayor diversidad. Los análisis fueron realizados de acuerdo a los distintos tratamientos: en agitación (ambiente homogéneo) y estáticos (ambiente con heterogeneidad espacial) y con respecto a las dos especies de *Pseudomonas*.

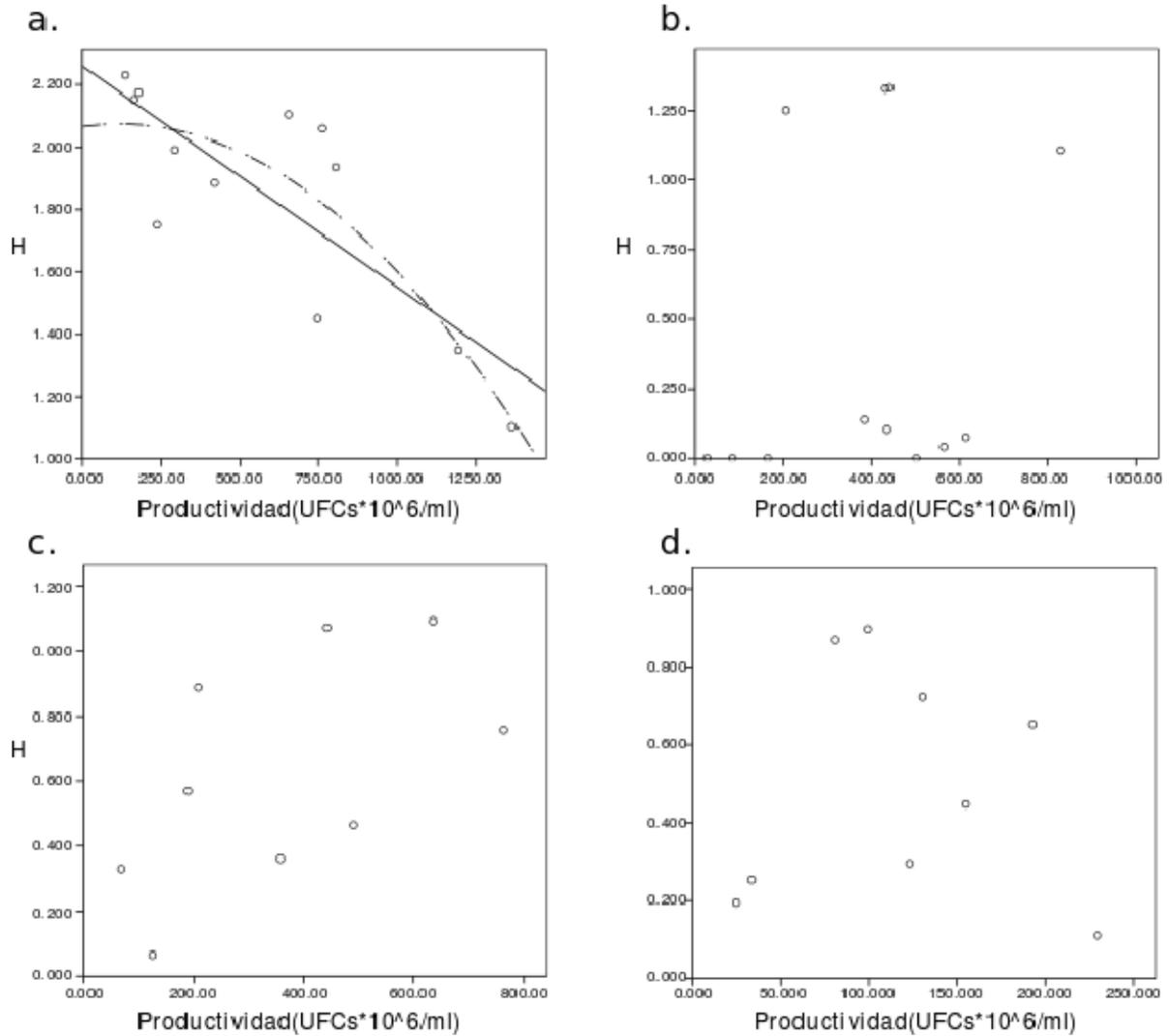


**Figura 4.10.** Relación entre productividad y riqueza. Con línea punteada se indica el ajuste a un modelo cuadrático. **a.b.** *P.aeruginosa*. **c.d.** *Pseudomonas* sp. RM051 **a.c.** tubos estáticos **b.d.** tubos agitados. Sólo están graficados los modelos significativos y que expliquen la mayoría de los datos (*i.e.*  $R^2 > 0.5$ ,  $p < 0.05$ ).

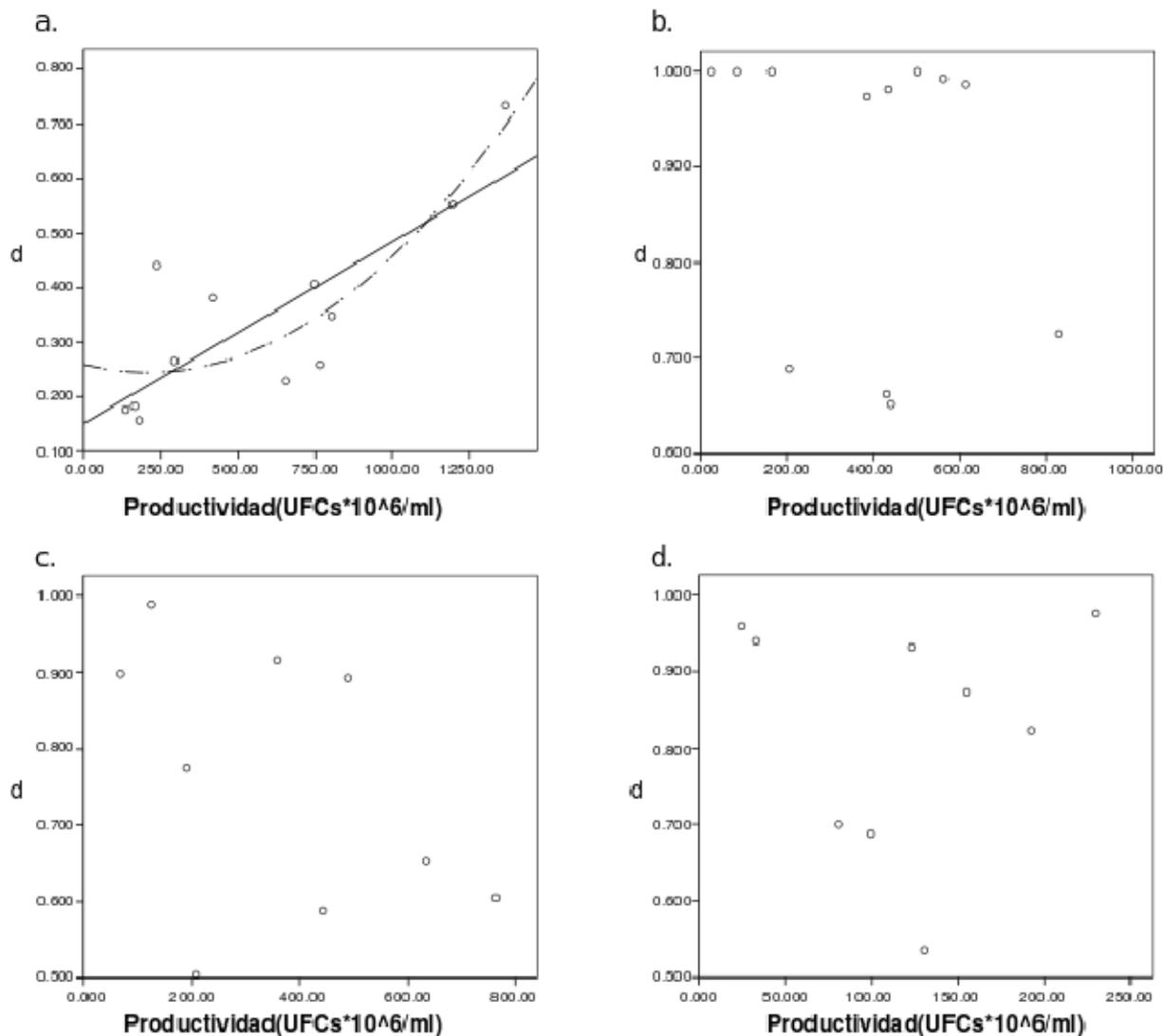
Los resultados en relación a la riqueza son diferentes a lo esperado de acuerdo a resultados previos con *P. fluorescens* (Kassen *et al.*, 2000). En este caso no se observó ningún tipo de relación entre productividad y diversidad en los tubos de *P. aeruginosa*, y se detecto un patrón claramente unimodal para los tubos con y sin agitación de *Pseudomonas* sp. RM051 (Sin agitación-  $R^2=0.739$ ,  $F= 8.484$ ,  $gl= 8$ ,  $p<0.05$ ; Con agitación-  $R^2=0.673$ ,  $F= 6.173$ ,  $gl= 8$ ,  $p<0.05$ ; Anexo 5.1; Figura 4.10).

Cuando se grafica la productividad contra el índice de Shannon sólo los tubos sin agitar de *P. aeruginosa* muestran un patrón significativo tanto lineal como cuadrático; la resolución de los datos no permite distinguir entre estos dos modelos. (Lineal-  $R^2= 0.642$ ,  $gl=11$ ,  $F=17.934$ ,  $p<0.005$ ; Cuadrático-  $R^2= 0.704$ ,  $gl= 11$ ,  $F= 10.717$ ,  $p<0.005$ ). El resto de los tratamientos analizados no muestran ningún patrón.

Por último se realizó el mismo análisis pero en esta ocasión para el índice de Berger-Parker. Cabe recordar que este es un índice que va de cero a uno y que mide la dominancia. no la diversidad. Por lo tanto valores cercanos a uno implican que una sola especie domina y hay pocas especies con poca abundancia relativa (es decir, hay poca diversidad). Si, en cambio, el índice de Berger-Parker tiene valores cercanos a cero, significa que ninguna especie es realmente dominante (alta diversidad). Los resultados con el índice de dominancia de Berger-Parker son consistentes con los obtenidos utilizando el índice de Shannon (Figura 4.11; Anexo 5). Sin embargo al ser un índice de dominancia y no de diversidad, tanto el modelo cuadrático como el lineal de los datos se encuentran invertidos (Figura 4.12).



**Figura 4.11.** Relación entre productividad y diversidad (índice de Shannon). Con línea punteada se indica el ajuste a un modelo cuadrático. Con línea sólida a un modelo lineal **a.b.** *Paeruginosa*. **c.d.** *Pseudomonas sp. RM051* **a.c.** tubos estáticos **b.d.** tubos agitados. Sólo están graficados los modelos significativos y que expliquen la mayoría de los datos (i.e.  $R^2 > 0.5$ ,  $p < 0.05$ ).



**Figura 4.12.** Relación entre productividad y dominancia (índice de Berger-Parker). Con línea punteada se indica el ajuste a un modelo cuadrático. Con línea sólida a un modelo lineal **a.b.** *P.aeruginosa*. **c.d.** *Pseudomonas sp. RM051* **a.c.** tubos estáticos **b.d.** tubos agitados. Sólo están graficados los modelos significativos y que expliquen la mayoría de los datos (*i.e.*  $R^2 > 0.5$ ,  $p < 0.05$ ).

## V. DISCUSIÓN

---

### **5.1. Las relaciones productividad-diversidad y heterogeneidad diversidad están determinadas por la respuesta a la disponibilidad de oxígeno**

De acuerdo con la hipótesis de que *si el oxígeno es un factor limitante, se esperan observar patrones de diversidad fuertemente asociados a la disponibilidad y heterogeneidad del recurso*, esperábamos observar patrones más marcados en la cepa cuyo crecimiento se vea más limitado por la disponibilidad de oxígeno. Esto debido a que, mientras más limitados se vean los morfotipos con respecto al oxígeno, mayor será la intensidad de la competencia por ese recurso (Tilman, 1982; Begon, Townsend y Harper, 2005).

Los resultados obtenidos en este trabajo son congruentes con esta hipótesis. Los tubos de *P. aeruginosa* presentan en general patrones más marcados, sobretodo con respecto al papel de la heterogeneidad espacial sobre la diversidad. A su vez, esta bacteria experimenta una mayor diferencia entre el crecimiento aerobio y anaerobio con respecto a *Pseudomonas* sp. RM051 (Figura 4.2). Sin embargo, el crecimiento anaerobio de *Pseudomonas* sp. RM051 es muy limitado (Figura 4.1) y otro tipo de experimentos (experimentos de invasión y competencia) deberían llevarse a cabo para determinar las diferencias en adecuación de las distintas especies con respecto a la presencia o ausencia de oxígeno. Cabe notar, no obstante, que el crecimiento de ambas se ve fuertemente limitado por el oxígeno. Éste es un recurso fuertemente limitante para ambas cepas.

De esta forma, los tubos de *P. aeruginosa* sin agitación (ambiente heterogéneo) presentaron una mayor diversidad, en general, que los agitados (ambiente homogéneo).

Lo que no ocurre en los tubos inoculados con *Pseudomonas* sp. RM051. El hecho de que la diferencia en diversidad entre los tubos de las distintas *Pseudomonas* es más clara en cuanto al número de morfotipos distintos de WS (Figura 4.3) es, asimismo, concordante con la hipótesis de que la disparidad en los patrones se debe a las respuestas desiguales con respecto al oxígeno. Pues, esta categoría morfológica se ha descrito como formadora de películas microbianas que le permiten colonizar la interfaz entre el aire y el medio (Rainey y Travisano, 1998) y fue caracterizada de la misma forma en el presente estudio (Anexo 1). La disparidad en el número de WS puede ser explicada, asimismo, por constricciones biológicas por las cuales la producción de películas microbianas en *Pseudomonas* sp. RM051 se vea limitada (este último punto se discutirá con más atención más adelante).

En cuanto a la productividad, si bien las curvas de crecimiento en presencia y ausencia de oxígeno son similares, a los tres-cuatro días (depende del tubo) la densidad microbiana de *Pseudomonas* sp. RM051 es casi del doble que la de *P. aeruginosa* (Figura 4.9). Indicando, que al largo plazo, esta cepa se ve menos limitada por las condiciones de los tubos.

Es importante recordar que la productividad utilizada en este estudio es sólo una aproximación que puede reflejar los efectos ligados a la competencia, pero que parte de varias suposiciones. En consecuencia, las conclusiones provenientes de los resultados de productividad deben considerarse bajo esas suposiciones. La densidad bacteriana es, en este caso, una buena aproximación de cómo la asimilación de los recursos puede afectar la coexistencia. Además, tanto las explicaciones teóricas principales (Tilman, 1982, Tilman y Pacala, 1993; Rosenzweig, 1995; Rajniemi, 2003) como los trabajos empíricos (ejs. Abramsky y Rosenzweig, 1984; Fukami y Morin, 2003) que analizan la llamada relación productividad-diversidad consideran la productividad como

los recursos asimilados por o los recursos disponibles para asimilación por los organismos vivos en un momento dado en el tiempo.

Sin embargo, se debe reconocer que otros componentes de la productividad como la biomasa en bacterias muertas o la dimensión temporal no son considerados. Estudios posteriores deberían realizarse para evaluar los efectos estos componentes sobre la diversidad. Posiblemente distintos patrones son observados al considerar distintos aspectos de la productividad.

## **5.2. La relación heterogeneidad-diversidad es contingente y depende de la divergencia fenotípica**

Las diferencias en heterogeneidad no sólo se determinaron entre los tubos agitados (homogéneos) y sin agitar (heterogéneos). Para probar la hipótesis de que *si la heterogeneidad ambiental favorece la coexistencia de los morfotipos de cada Pseudomonas, entonces se espera una mayor diversidad de morfotipos en el experimento donde exista un gradiente de oxígeno que donde se encuentre el oxígeno distribuido de manera homogénea*; se calculó la heterogeneidad de cada tubo.

Se utilizó la heterogeneidad espacial con respecto a la distribución del oxígeno porque se ha determinado que éste es el recurso limitante en experimentos similares utilizando *P. fluorescens* (Koza *et al.*, 2011) y a que la heterogeneidad debe establecerse de acuerdo a la biología particular de los organismos en torno a los cuales se define (Tilman, 1982). Debido a los diferencia en los diámetros de los tubos, la penetración de oxígeno es distinta en cada tubo. Por lo anterior, para que la información fuera comparativa, se utilizó el coeficiente de variación en la concentración de oxígeno a distintas profundidades como medida de la heterogeneidad. Esta medida es un

indicador de la variación en la disponibilidad de oxígeno con respecto a la media para cada uno de los tubos (Sokal y Rohlf, 1987).

Así, en los microcosmos de *P. aeruginosa* el diámetro de los tubos es inversamente proporcional a la heterogeneidad en la concentración de oxígeno (Figura 4.7). Esto se debe a que todos los tubos tienen el mismo volumen de medio LB en todos los tubos (*i.e.* 10ml), pero el grosor del tubo es diferente, por lo tanto la profundidad y la superficie de contacto con el oxígeno varían según el tubo. Por ejemplo en el caso del tubo de 16mm hay una mayor profundidad y en consecuencia un radio mayor entre diámetro y profundidad; además en éste tubo se establece una película bacteriana más gruesa (observaciones personales; Anexo 2). En cambio el tubo de cuarenta milímetros tiene una mayor área lo que conlleva a una mayor dificultad para que se pueda establecer una película bacteriana, en conjunto con una mayor penetración de oxígeno a poca profundidad.

En oposición, el más heterogéneo de los tratamientos con *Pseudomonas sp.* RM051 es el de 25mm, lo que podría deberse a un menor crecimiento bacteriano en los tubos de 16mm, de forma que no se establezca un gradiente tan marcado. Cabe resaltar, sin embargo, que las diferencias en el CV entre los tubos de 16 y 25mm sin agitar no son significativas para ninguna de las dos especies, debido a la gran dispersión de los datos para los tubos de 16mm (Tabla 4.4; Figura 4.7). La alta variación en los CV en la concentración de oxígeno a distintas profundidades de los tubos de 16mm puede deberse, al menos en el caso de *P. aeruginosa*, a la heterogeneidad misma, a la estocasticidad poblacional en el establecimiento de las comunidades (Fukami y Morin, 2003; Tilman, 2004) y/o a la formación de la película bacteriana. Probablemente en estos tubos la competencia por la superficie es mayor y por lo mismo es más variable a lo largo del tiempo.

De acuerdo con lo mencionado anteriormente, mientras que en los tubos con *P. aeruginosa*, conforme aumenta la heterogeneidad ambiental aumentan la riqueza y la diversidad (Shannon), en los microcosmos inoculados con *Pseudomonas* sp. RM051 no hay relación alguna entre diversidad y heterogeneidad ambiental (Figura 4.8). Y si bien la diferencia en la respuesta al oxígeno puede ser la explicación a estas discrepancias, ambas cepas están limitadas por la disponibilidad del oxígeno. Otras posibles explicaciones deben ser consideradas.

En este sentido, otra hipótesis es que la plasticidad y la posibilidad de mutaciones que alteren el fenotipo sin ser deletéreas o letales, sea menor en el caso de *Pseudomonas* sp. RM051 de forma que su capacidad de diversificación en tan corto tiempo se vea reducida. No obstante, se dejaron los tubos de esta especie hasta el sexto día y la diversidad no sólo no aumentaba, incluso se veía reducida (resultados no mostrados).

La gran cantidad de información genómica de *P. aeruginosa* podría explicar su alta plasticidad y diversidad fenotípica (Stover *et al.*, 2000, Kung, Ozer y Hauser, 2010; Roy *et al.*, 2010; Anexo 1), pero no es posible sacar conclusiones porque no se tiene la misma información para *Pseudomonas* sp. RM051, ni se realizaron caracterizaciones moleculares de los distintos fenotipos.

Por último, la tercera hipótesis es que la *Pseudomonas* de Cuatro Ciénegas tiene poca capacidad de formar un película bacteriana, o al menos no sin un soporte como base. Esta última hipótesis es consistente con las observaciones de los tubos inoculados con *Pseudomonas* sp. RM051, donde el crecimiento de la película bacteriana se daba primordialmente en el borde del tubo y era muy lábil, pues a la menor agitación se desintegraba (Anexo 2).

Hay muchas posibles explicaciones respecto a la baja formación de película bacteriana de *Pseudomonas* sp. RM051, una es que en los tubos el costo de la película fuera muy alto con respecto a los beneficios de hacerla, en cuyo caso un morfotipo que no hiciera película crecería a mayor velocidad, utilizando los recursos (espacio, nutrientes) desplazando a los morfotipos formadores de películas. Otra posible explicación es que en el ambiente bajo en fósforo en el que la bacteria de Cuatro Ciénegas ha evolucionado, no fuera costeable hacer películas con mucha matriz, sino aprovechar los sustratos existentes para crecer en película, y al no haber sustrato las bacterias no pueden hacer una película estable.

El análisis de todas estas hipótesis requeriría un mayor conocimiento fisiológico y molecular de la bacteria de Cuatro Ciénegas, cuando menos un conocimiento equiparable al que ya existe para *P. aeruginosa* (Drenkard y Ausbel, 2002; Boles, Thoendel y Singh, 2004; Kristis *et al.*, 2005) o *P. fluorescens* (Spiers *et al.*, 2002; Koza *et al.*, 2011; Workentine *et al.* 2010).

De esta forma, si bien la mayor parte de los estudios tanto teóricos como empíricos coinciden en que al aumentar la heterogeneidad espacial aumenta la diversidad debido a una disminución en la competencia interespecífica por la divergencia o partición espacial del nicho (Rainey y Travisano, 1998; Tilman 1982; Amarasekare, 2003; Chesson, 2000); para que la diversidad se mantenga tienen que haber claras distinciones fenotípicas de forma tal que el solapamiento de los nichos sea mínimo y por lo tanto, el factor estabilizador compense las diferencias en la adecuación de las distintas cepas (Rainey y Travisano, 1998, Saxer *et al.* 2009).

En los tubos con *Pseudomonas* sp. RM051, ya sea porque las presiones selectivas no son suficientes o por constricciones a la divergencia, las diferencias fenotípicas son menores (hay pocos morfotipos que puedan categorizarse como WS y

los que hay, tienen una capacidad restringida de hacer películas bacterianas en estas condiciones; Anexo 1). En consecuencia hay una baja diversidad independientemente del grado de heterogeneidad (Figura 4.8).

### **5.3. Los resultados con *Pseudomonas aeruginosa* son congruentes con la hipótesis de heterogeneidad espacial como mecanismo de la relación productividad-diversidad**

*Si la heterogeneidad ambiental es el mecanismo causal de la relación entre la productividad y la diversidad de morfotipos, entonces se espera que la relación muestre un patrón unimodal y que éste sea exclusivo de los tratamientos heterogéneos. De acuerdo a esta hipótesis, al medir la diversidad con el índice de Shannon los tubos sin agitar de *P. aeruginosa*, exhiben una relación que puede ser lineal o unimodal (lineal-  $R^2= 0.642$ ,  $F=17.934$ ,  $gl= 11$ ,  $p<0.005$ ; cuadrática-  $R^2= 0.704$ ,  $F=10.717$ ,  $gl= 11$ ,  $p<0.005$ ) mientras que los tubos agitados no muestran patrón alguno (Figura 4.11).*

Si bien al utilizar la riqueza como índice de diversidad no hay suficiente resolución y no se observa ningún patrón, se puede ver que los puntos no se distribuyen de manera totalmente aleatoria, se requerirían tubos con mayor diámetro (más productivos) para poder determinar el patrón. Además, los tubos de 16mm tienen una baja productividad, pero probablemente, debido a la alta heterogeneidad presentan una alta riqueza (Figura 4.10 a). Estos tubos son los mismos que por su heterogeneidad, no permiten distinguir entre una relación lineal o unimodal en la

comparación con Shannon. Sin embargo, sin ellos, parecería que el patrón es unimodal (Figura 4.11).

Las diferencias entre lo observado para la riqueza y el índice de Shannon en el caso de los tubos agitados de *P. aeruginosa* se debe a que probablemente los morfotipos dominantes en altas productividades aún no han desplazado a los adaptados a nichos menos productivos (Tilman 1982, Kassen *et al.*, 2000). Sin embargo, la dominancia de aquellos morfotipos pertenecientes a los nichos más productivos sí se ve incrementada, de forma que la relación entre productividad y el índice de dominancia de Berger-Parker para éste tratamiento es positiva (Figura, 4.11 a). De estos resultados se deriva que al aumentar la productividad aumenta la abundancia del morfotipo dominante, como predice la hipótesis de heterogeneidad especial (Tilman, 1982; Tilman y Pacala, 1993; Kassen *et al.*, 2000). También, en concordancia con esta hipótesis, los tubos agitados (homogéneos) de *P. aeruginosa* no presentaron ningún tipo de relación con ninguno de los índices.

Como predicen los modelos de heterogeneidad (Kassen *et al.*, 2010), los organismos pertenecientes al nicho más productivo son los que dominan cuando hay una alta disponibilidad de recursos. El problema para estos experimentos radica en la imposibilidad de medir la productividad de cada nicho, porque aunque aislados (unos morfotipos forman una película y otros crecen en el medio de cultivo (Anexo 1)) en conjunto pueden tener interacciones que compliquen esta caracterización. Por otro lado, la película bacteriana es muy lábil, por lo que no pudo ser aislada.

Empero, es razonable pensar que en general en los tubos sin agitación, la interfaz del medio y el aire (ambiente preferente de los WS) es más productiva debido a la disponibilidad de oxígeno. Sin embargo, en el tubo de 40mm, con alta penetración de oxígeno y poco crecimiento en películas (Anexo 2) es muy probable que fuera más

productivo el medio. En este tubo el medio tiene una alta concentración de nutrientes, alta disponibilidad de oxígeno y no se tienen que pagar los costos asociados a hacer una película bacteriana (MacLean *et al.*, 2004; Spiers, 2007). Los resultados de productividad por categoría morfológica de *P. aeruginosa* son concordantes con estos datos y por lo tanto, el tubo sin agitar de 40mm tiene una muy alta productividad de SM con respecto a la de WS, mientras que los de 25 y 16mm son los más productivos con respecto a los WS y tienen una proporción de WS y SM de 1:1 (Figura 4.9.a).

#### **5.4. La relación productividad-diversidad no es general**

Por último, se había enunciado que *si el patrón entre la diversidad y la productividad ocurre en todo el género, entonces se espera encontrarlo en ambas especies, aunque los parámetros ecológicos como la diversidad y la productividad sean específicos de cada especie debido a sus diferencias ecológicas y evolutivas*. No obstante, ambas especies presentan patrones distintos, es decir, el patrón no es general para este grupo bacteriano.

Con base en los resultados obtenidos, se puede sugerir lo siguiente: la heterogeneidad no explica la relación unimodal entre productividad y diversidad; o no es un mecanismo general y otros mecanismos pueden estar interviniendo. Empero, pensar que la heterogeneidad no explica estos patrones contradice los modelos matemáticos de Tilman (1982) y Kassen *et al.* (2000), pero principalmente, se contrapone a los datos empíricos obtenidos en experimentos de eutroficación (Harpole y Tilman, 2007), en microcosmos similares a éstos (Kassen *et al.*, 2000) así como los resultados obtenidos en los microcosmos de *P. aeruginosa* del presente estudio. Estos son ejemplos de ciertos organismos y bajo condiciones experimentales específicas. En la naturaleza hay

más variables y mecanismos influyendo. Aún así, los resultados de estos modelos y experimentos nos permiten probar la plausibilidad de tales hipótesis para poder generar nuevas y poder explicar lo que ocurre al incluir una mayor cantidad de variables.

En este sentido, los resultados de *Pseudomonas* sp. RM051, indican que la heterogeneidad no es, ni puede ser, el único mecanismo involucrado en la relación entre productividad y riqueza. Este sistema no está determinado por el gradiente en la disponibilidad de oxígeno y los tratamientos agitados y sin agitar presentan los mismos patrones. Asimismo hay otros modelos experimentales en los que no se observa un efecto de la heterogeneidad sobre esta relación (Raynolds *et al.* 2007). La evidencia apunta a que distintos mecanismos pueden afectar esta relación en distintos ambientes (hay distintas hipótesis con distintas evidencias empíricas), explicando a su vez, por qué se encuentran tantos patrones distintos en la naturaleza (Waide *et al.* 1999).

En específico, en el caso de *Pseudomonas* sp. RM051, los datos podrían apoyar la hipótesis del equilibrio dinámico (Huston, 1979), en la cual la velocidad a la que una especie desplaza a otra depende de las tasas de crecimiento *per capita* de cada especie. A mayor productividad mayores tasas de crecimiento y por lo tanto una exclusión competitiva mayor. Bajo este esquema se esperaría que a mayor productividad los morfotipos con un crecimiento más rápido (*i.e.* SM; MacLean *et al.*, 2004; Spiers, 2007) fueran los dominantes. Si analizamos el experimento con *Pseudomonas* sp. RM051 bajo esta hipótesis, se entiende porque, independientemente de la estructura espacial los morfotipos de crecimiento más rápido, es decir los SM (debido a que no tienen que pagar los costos de hacer biofilm los SM crecen a mayor velocidad, MacLean *et al.*, 2004; Spiers, 2007), son los que dominan a productividades altas (Figura 4.9.b).

El patrón entre productividad y riqueza, identificado para *Pseudomonas* sp. RM051, no se observa con la dominancia (Berger-Parker) y en consecuencia, tampoco en el índice de Shannon. Esto se debe a que en estos microcosmos la dominancia siempre es alta ( $d > 0.5$ ; 4.11 c; d) es decir, siempre hay algún morfotipo más abundante. Empero, al aumentar la productividad puede haber un momento en que dos o más morfotipos aumenten su abundancia desplazando a los de crecimiento más lento sin que uno solo domine.

Independientemente de la explicación subyacente a los patrones encontrados, es posible afirmar que las diferencias biológicas de cada especie son importantes en las dinámicas competitivas intra e intermorfotipos y por lo tanto los resultados obtenidos. Se sabe que *P. aeruginosa* es una bacteria con gran versatilidad genética y metabólica lo que le permite la colonización de una gran cantidad de ambientes (Stover *et al.*, 2000; Frimmersdorf *et al.*, 2010; Kung, Ozer y Hauser, 2010; Roy *et al.*, 2010). Así mismo, es una bacteria con un gran potencial para formar películas bacterianas, al grado de volverse uno de los principales modelos de estudio de este crecimiento bacteriano (Sutherland, 2001; Allsen-Holm *et al.*, 2006).

En cambio *Pseudomonas* sp. RM051 es una bacteria endémica adaptada a un ambiente extremo; evidencias que podrían indicar que es una bacteria especialista menos versátil. Es, además una bacteria de un ambiente con muy poco fósforo en el que los costos asociados a hacer una película bacteriana deben ser mucho más altos. En consecuencia, existe la posibilidad de que perdiera, a lo largo de su historia evolutiva, algunos genes útiles en la formación de películas, entre otros los de secreción de compuestos ricos en fósforo (DNA y ciertos exopolisacáridos).

Con estos resultados se puede ver que patrones similares pueden tener distintas causas y que los mismos factores pueden tener distintos efectos sobre distintas

especies. Para entender éstos procesos y poder diferenciarlos se necesita tanto de la modelación matemática y la descripción de las comunidades y ecosistemas naturales como de experimentación con modelos muy controlados. En estos experimentos es claro que las diferencias en la biología de las distintas especies utilizadas llevan a distintos patrones. De igual manera, se puede pensar que los patrones observados en comunidades naturales (multiespecíficas) dependen de las dinámicas competitivas, producto de las estrategias de las distintas especies involucradas.

## VI. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

---

Las relaciones entre heterogeneidad, productividad y diversidad son de gran complejidad e involucran muchas variables y distintos factores. Para dilucidar los mecanismos detrás de estos patrones, se deben realizar experimentos donde las variables puedan ser controladas y se pueda, así, probar la plausibilidad de las distintas hipótesis y los efectos de cada variable. Sin embargo, es importante reconocer también las limitantes de estos modelos y que los resultados obtenidos con estas comunidades de ecotipos, si bien no son directamente extrapolables a lo que sucede en los ecosistemas naturales, nos permiten generar y probar la viabilidad de hipótesis, así como determinar los factores que pueden ser importantes y que por lo tanto se deben considerar al realizar otros estudios.

De igual manera, para entender mejor las causas y mecanismos implicados en los patrones de diversidad observados, se debe considerar la multidimensionalidad de la diversidad y, por lo tanto, considerar en los análisis tanto riqueza como abundancia. De forma más específica, en este trabajo, los resultados obtenidos en la relación entre productividad y diversidad no podrían ser correctamente interpretados sin tomar ambos componentes en cuenta, pues distintos puntos en el gradiente entre riqueza y abundancia proveen distinta información.

En cuanto a la relación entre diversidad y heterogeneidad, se ha propuesto en varias ocasiones que al aumentar la heterogeneidad se abren nuevas oportunidades ecológicas y por lo tanto aumenta la diversidad (Rainey y Travisano, 1998; Tilman 1982; Amarasekare, 2003; Chesson, 2000). Sin embargo, recientes investigaciones en microcosmos bacterianos (Saxer, Doebeli y Travisano, 2009), incluyendo el presente trabajo, han demostrado que no siempre es así. Que el papel de la heterogeneidad

depende de las diferencias fenotípicas de los distintos tipos (Rainey y Travisano, 1998; Saxer, Doebeli y Travisano, 2009) así como de las interacciones entre ellos (Saxer, Doebeli y Travisano, 2009; Harcombe, 2010; A. E. Escalante, M. Rebolleda-Gómez y M. Travisano, en prep.).

En el caso de *P. aeruginosa*, la riqueza no provee suficiente información sobre la relación con la productividad debido a que el grado de heterogeneidad puede permitir que ecotipos de nichos menos productivos se refugien. De alguna forma, y en concordancia con las predicciones teóricas (Tilman, 1982), la heterogeneidad sirve como amortiguador ante los niveles altos de productividad sobre la diversidad.

En cambio, la evidencia de los microcosmos de *Pseudomonas* sp. RM051 apunta a que el mecanismo involucrado en este caso es el de equilibrio dinámico (Huston, 1979) y por lo tanto los SM (de rápido crecimiento) son dominantes y no hay diferencia entre tubos agitados y sin agitar.

En conclusión, y contrario a lo esperado, el patrón entre productividad y diversidad no es universal, ni siquiera al interior del género de *Pseudomonas*. Esto se debe a que distintos mecanismos pueden estar actuando sobre cada una de las especies y las hipótesis propuestas no son mutuamente excluyentes. Debido a que tanto la productividad como la diversidad son factores centrales en un ecosistema, ambos están altamente interrelacionados con diversos componentes del mismo y por lo tanto son muchas las variables y procesos que pueden afectar la relación entre ellos (Waide *et al.* 1999).

Este trabajo demuestra que las diferencias en las estrategias de competencia y la historia evolutiva de cada organismo juegan un papel fundamental en los patrones ecológicos resultantes. En este caso los patrones resultantes con cada especie de *Pseudomonas* son diferentes, debido, en general, a que estas son dos bacterias con

ecología e historias contrastantes. Falta, sin embargo una mayor información sobre *Pseudomonas* sp. RM051 para poder identificar cuales son las diferencias más importantes entre ambas especies y cómo es que estas diferencias pueden estar determinando sus dinámicas ecológicas.

A pesar de que los estudios de diversidad, heterogeneidad y productividad se remontan a los inicios de la ecología, aún nos falta mucho por entender sobre la diversidad, su origen y cómo es mantenida. Se requieren más experimentos que prueben las distintas hipótesis y una mayor cantidad de predicciones teóricas específicas de cada modelo para poder distinguir entre ellos.

Aún en ambientes controlados como estos microcosmos, los patrones ecológicos presentan una gran complejidad y son multifactoriales. La gran diversidad de patrones identificados en la literatura con respecto a variables como la diversidad y la productividad pueden deberse a las particularidades de los casos y a las variables implicadas. Sin embargo, los patrones no sólo existen, sino que nos permiten entender las causas que subyacen a los procesos ecológicos.

## LITERATURA CITADA

---

- Allesen-Holm, M., K. B. Barken, L. Yang, M. Klausen, J. S. Webb, S. Kjelleberg, S. Molin, M. Givskov y T. Tolker-Nielsen. 2006. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Molecular Microbiology*. 59(4): 1114-1128
- Abrams, P. 1995. Monotonic or Unimodal Diversity-Productivity Gradients: What does competition theory predict? *Ecology*. 76(7): 2019-2027
- Abramsky, Z. y M.L. Rosenzweig. 1984. Tilman's predicted productivity-diversity relationship shown by desert rodents. *Nature*. 309: 150-151
- Amarasekare. P. 2002. Interference competition and species coexistence. *Proceedings of the Royal Society of London*. 269:1541-2550
- Amarasekare. P. 2003. Competitive coexistence in spatially structured environments: a synthesis. *Ecology Letters*. 6(12): 1109-1122
- Balvanera, P. y E. Aguirre. 2006. Tree Diversity, Environmental Heterogeneity, and Productivity in a Mexican Tropical Dry Forest. *Biotropica*. 38(4): 479-491
- Beaumont, H.J.E., J. Gallie, C. Kost, G. C. Ferguson, y P.B. Rainey. 2009. Experimental evolution of bet-hedging. *Nature*. 462:90-93
- Begon, M., C. Townsend, J. Harper. 2006. *Ecology: From individuals to ecosystems* (4ª edición). Blackwell Publishing, Malden, E.U.A. 738pp.
- Benlloch, S., F. Rodriguez-Valera y A.J. Martinez-Murcia. 1995. Bacterial diversity in two coastal lagoons deduced from 16S rDNA PCR amplification and parcial sequencing. *FEMS Microbiol. Ecol.* 18: 267-279
- Boles, B. R., M. Thoendel y P. K. Singh. 2004. Self-generated diversity produces "insurance effects" in biofilm communities. *PNAS*. 101(47): 16630-16635

- Branda, S. S., S. Vik, L. Friedman, R. Kolter. 2005. Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*. 13(1): 20-26
- Brokhurst, M. A., M.E. Hochberg, T. Bell y A. Buckling. 2006. Character Displacement Promotes Cooperation in Bacterial biofilms. *Current Biology*. 16: 2030-2034
- Bull, J. J. y W. R. Harcombe. 2009. Population Dynamics Constrain the Cooperative Evolution of Cross-Feeding. *Plos one*. 4(1): e4115
- Chase, J. M. y M. A. Leibold. 2002. Spatial scale dictates the productivity-biodiversity relationship. *Nature*. 416: 427-430
- Chesson, P. 2000. Mechanism of maintenance of species diversity. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 31:343-366.
- Cohan, F.M. 2002. What are bacterial species? *A. Rev. Microbiol*. 56: 457-487
- Currie, D.J. 1991. Energy and Large-Scale Patterns of Animal- and Plant-Species Richness. *The American Naturalist* 137(1): 27.
- Davey, M.E. Y G.A. O'toole. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64(4): 847-867
- Davies, K.J., D. Lloyd y L. Boddy. 1989. The effect of oxygen on denitrification in *Paracoccus denitrificans* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of General Microbiology*. 135: 2445-2451
- Dixon, P. 2003. VEGAN, a package of R functions for community ecology. *Journal of Vegetation Science*. 14:927-930
- Dornelas, M., S.R.Connolly y T.P. Hughes. 2006. Coral reef diversity refutes the neutral theory of biodiversity. *Nature*. 440:80-82.
- Drenkard, E., y Ausubel, F.M. 2002. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature*. 416: 740-743
- Elena, S.F. y R.E. Lenski. 2003. Evolution Experiments with Microorganism: The

- Dynamics And Genetic Bases of Adaptation. *Nature Reviews Genetics*. 4: 457-469
- Eschbach, M., K. Schreiber, K. Trunk, J. Buer, D. Jahn y M. Schobert. 2004. Long-Term anaerobic survival of the oportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* via pyruvate fermentation. *Journal of Bacteriology*. 186: 4596-4604
- Frimmdersorf, E., S. Horatzek, A. pelnikevich, L. Wiehlmann y D. Schomburg. 2010. How *Pseudomonas aeruginosa* adapts to various environments: a metabolomic approach. *Environmental Microbiology*. 12(6): 1734-1747
- Fukami, T. y P.J. Morin. 2003. Productivity-biodiversity relationships depend on the history of community assembly. *Nature*. 424: 423-426
- Fukami, T., H. J. E. Beaumont, X. Zhang y P.B. Rainey. Imigration history controls diversification in experimental adaptive radiation. *Nature*. 446: 436-439
- Gotelli, N.J. y R.K. Colwell. 2001. Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecology Letters*. 4:379-391
- Gotelli, N.J. y G.L. Entsminger. 2011. EcoSim: Null models software for ecology. Version 7. Acquired Intelligence Inc. & Kesey-Bear. Jericho, VT 05465. <http://garyentsminger.com/ecosim.htm>.
- Greig, D. y M. Travisano. 2008. Density-Dependent effects on allelopathic interactions in yeast. *Evolution*. 62(3): 521-527
- Grime, J.P. 1977. Evidence for the existence of three primary strategies in plants and its relevance to ecological and evolutionary theory. *The American Naturalist*. 111(982):1169-1194
- Harcombe, W. 2010. Novel Cooperation Experimentally evolved between species. *Evolution*. 64(7): 1-7
- Harpole, W. S. y D. Tilman. 2007. Grassland species loss resulting from reduced niche

- dimension. *Nature*. 446: 791-793
- Häußler, S., B. Tümmler, H. Weißbrodt, M. Rohde e Ivo Steinmetz. 1999. Small-Colony Variants of *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis. *Clinical Infectious Diseases*. 29(3): 621-625.
- Hill, M. O. 1973. Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences. *Ecology*. 54(2): 427-432
- Hodgson, D. J., P. B. Rainey y A. Buckling. 2002. Mechanism linking diversity, productivity and invasibility in experimental bacterial communities. *Proc. Royal Soc. B*. 269(1506): 2277-2283
- Holm, N.P. y D. Armstrong. 1981. Role of Nutrient limitation and competition in controlling the populations of *Asterionella Formosa* y *Microcystis aeruginosa* in semi-continuous culture. *Limnol. Oceanogr.* 26: 622-635.
- Horner-Devine, C., M.A. Leibold, V.H. Smith y B.J.M. Bohannan, 2003. Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. *Ecology Letters*. 6:613-622.
- Hubell; S.P. 2001. *The unified neutral theory of biodiversity and biogeography*. Princeton University Press, Princeton, Nueva Jersey, EUA
- Hubell, S.P. y L. Borda-de-Água. 2004. The Unified Neutral Theory of Biodiversity and Biogeography: Reply. *Ecology*. 85(11): 3175-3178
- Huston, M. 1979. A general hypothesis of species diversity. *The American Naturalist*. 113(1): 81-101
- Hutchinson, G.E. 1959. Homage to Santa Rosalia or Why are there so many kinds of animals? *The American Naturalist*. 93(870): 145-159
- Kassen, R., A. Buckling, G. Bell y P.B. Rainey. 2000. Diversity peaks at intermediate

- productivity in laboratory microcosm. *Nature*. 406: 508-512
- Kassen, R., M. Llewellyn y P.B Rainey. 2004. Ecological constraints on diversification in a model adaptive radiation. *Nature*. 431: 984-989
- Kerr, B., M. A. Riley, M. W. Feldman y B. J. M. Bohannan. 2002. Local dispersal promotes biodiversity in a real-life game of rock-paper-scissors. *Nature*. 418: 171-174
- Kiil, K., Binnewies, T. T., Willenbrock, H., Hansen, S. K., Yang, L., Jelsbak, L., Ussery, D. W. y Friis, C. 2008. Comparative Genomics of *Pseudomonas*, en *Pseudomonas: Model Organism, Pathogen, Cell Factory* (ed. B. H. A. Rehm). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Alemania. pp. 1-24
- Kneitel, J.M. y J.M. Chase. 2004. Trade-offs in community ecology: linking spatial scales and species coexistence. *Ecology Letters*. 7: 69-80.
- Kondoh, M. 2001. Unifying the relationships of species richness to productivity and disturbance. *Proc. Royal Soc. B* 268(1464): 269-271.
- Koza, A., O. Moshynets, W. Otten, A. J. Spiers. 2011. Environmental modification and niche construction: developing O<sub>2</sub> gradients drive the evolution of the Wrinkly Spreader. *The ISME Journal*. 5:665-673
- Krisits M. J., L. Prost, M. Starkey, M. R. Parsek. 2005. Characterization of colony morphology variants isolated from *Pseudomonas aeruginosa* Películas bacterianas. *App. Env. Micro*. 71(8): 4809-4821
- Kung, V. L., E. A. Ozer y A. R. Hauser. 2010. The Accessory Genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and molecular biology reviews*. 74(4): 621-641.
- Leigh, E.G. Jr. 1965. On the relationship between productivity, biomass, diversity and stability of a community. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 53: 777-783
- Lindeman, R.L. 1942. The trophic-dynamic aspect of ecology. *Ecology*. 23(4):157-176

- MacArthur R. 1970. Species packing and competitive equilibrium for many species. *Theoretical Populations Biology*. 1:1–11
- MacLean, R.C., P.B Rainey y G. Bell. 2004. The evolution of a pleiotropic fitness trade-off in *Pseudomonas fluorescens*. *PNAS*. 101: 8072-8077
- Magurran, A. E. 1988. *Ecological Diversity and Its Measurement*. Taylor & Francis, Londres, Inglaterra, pp. 179
- Magurran, A.E. 2007. *Measuring Biological Diversity*. Blakwell Publishing, Oxford, Inglaterra. 256pp.
- Mittelbach G.G., Steiner C.F., Scheiner S.M., K.L. Gross, H.L. Reynolds, R.B. Waide, M.R. Willing, S.I. Dodson y L. Gough. 2001. What Is The Observed Relationship Between Species Richness And Productivity? *Ecology*. 82(9):2381-2396
- Nelson, K.E., C. Weinel, I. T. Paulsen, R. J. Dodson, H. Hilbert, V. A. P. Martins dos Santos, D. E. Fouts, S. R. Gill, M. Pop, M. Holmes, L. Brinkac, M. Beanan, R. T. DeBoy, S. Daugherty, J. Kolonay, R. Madupu, W. Nelson, O. White, J. Peterson, H. Khouri, I. Hance, P. Chris Lee, E. Holtzapple, D. Scanlan, K. Tran, A. Moazzez, T. Utterback, M. Rizzo, K. Lee, D. Kosack, D. Moestl, H. Wedler, J. Lauber, D. Stjepandic, J. Hoheisel, M. Straetz, S. Heim, C. Kiewitz, J. Eisen, K. N. Timmis, A. Düsterhöft, B. Tümmler y C. M. Fraser. 2002. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology*. 4(12):799-808
- Park, T. 1962. Beetles, competition and populations. *Science*. 138:1369-1375
- Pianka, E.R. 1966a. Convexity, desert lizards and spatial heterogeneity, *Ecology*, 47(6):1055-1059
- Pianka, E.R. 1966b. Latitudinal gradients in species diversity: a review of concepts. *Am. Nat.* 100:33-46

- Prosser, J.I., J.M. Brendan, T.C. Curtis, R.J. Ellis, M.K. Firestone, R.P. Freckleton, J.L. Green, L.E. Green, K. Killiam, J.J. Lennon, A.M. Osborn, M. Solan, C. J. van der Gast y P.W. Young. 2007. The role of ecological theory in microbial ecology. *Nat. Rev. Micro.* 5: 384-392
- Rajaniemi, T.K. 2003. Explaining productivity-diversity relationships in plants. *Oikos.* 101: 449-457
- Rainey, P. B. y M. Travisano. 1998. Adaptive Radiation in a heterogeneous environment. *Nature.* 394: 69-72
- Ricotta, C. 2003. On parametric evenness measures. *Journal of theoretical biology.* 222(2): 189-197
- Rosenzweig, M.L. y Z. Abramsky. 1993. How are diversity and productivity related? Pp. 52- 65 en: Ricklefs, R. E. y D. Schluter (eds.) *Species diversity in ecological communities: historical and geographical perspectives.* University of Chicago Press. Chicago, Estados Unidos.
- Rosenzweig.1995. *Species diversity in space and time.* Cambridge University Press. Cambridge, Inglaterra, 436 pp.
- Rothhaupt, K.O. 1988. Mechanistic resource competition theory applied to laboratory experiments with zooplankton. *Nature.* 333: 660-662
- Roy, P.H., S.G. Tetu, A. Larouche, L. Elbourne, S. Tremblay, Q. Ren, R. Dodson, D. Harkins, R. Shay, K. Watkins, Y. Mahamoud y I.T. Paulsen. 2010. Complete Genome Sequence of the Multiresistant Taxonomic Outlier *Pseudomonas aeruginosa* PA7. *Plos one.* 5(1): e8842.
- Saxer, G., M. Doebeli y M. Travisano. 2009. Spacial structure leads to ecological breackdown and loss of diversity. *Proceedings of the Royal Society of London. Biological Sciences.* 276: 2065-2070

- Sokal. R. R. y F. J. Rohlf. 1987. *Introduction to Biostatistics*. Dover, Nueva York, Estados Unidos
- Sommer, U.1999. Benthic microalgal diversity enhanced by spatial heterogeneity of grazing. *Oecologia*.122(2): 284-287
- Spiers. A. J., S. G. Kahn, J. Bohannon, M, Travisano y P. B. Rainey. 2002. Adaptive Divergence in Experimental Populations of *Pseudomonas fluorescens*. I. Genetic and Phenotypic Bases of Wrinkly Spreader Fitness. *Genetics*. 161: 33-46
- Spiers, A. J. 2007. Wrinkly-Spreader fitness in the two-dimensional agar plate microcosm: maladaptation, compensation and ecological success. *Plos one*. 8: e740
- Stockburger, D.W. 1996. *Introductory Statistics: Concepts, Models, and Applications*. atomicdogpublishing.com. Libro Online (<http://www.psychstat.missouristate.edu/IntroBook/sbk00.htm>)
- Stover, C. K., X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, M. J. Hickey, F. S. L. Brinkman, W. O. Hunfnagle, D.J. Kowalik, M. Lagrou, R. L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook- Waldman, Y. Yuan, L. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G.K.-S. Wong, Z.Wu, I.T. Paulsen, J. Reizer, M.H. Saier, R.E.W. Hancock, S. Lory y M. V. Olson. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. 406: 959-964
- Sutherland, I. W. 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*. 147(1): 3-9
- Tilman, D. 1977. Resource competition between planktonic algae: an experimental and theoretical approach. *Ecology*. 58: 338-348
- Tilman, D. 1981. Experimental tests of resource competition theory using four species of

- Lake Michigan algae. *Ecology*. 62: 802-815
- Tilman, D. 1982. *Resource Competition and Community Structure*. Princeton University Press. Princeton, Nueva Jersey, E.U.A. 296pp.
- Tilman, D. 2004. Niche tradeoffs, neutrality, and community structure: A stochastic theory of resource competition, invasion, and community assembly. *PNAS*. 101(30): 10854- 10861.
- Tilman, D. y S. Kilham. 1976. Phosphate and silicate growth and uptake kinetics of the diatoms *Asterionella formosa* y *Cyclotella meneghiniana* in batch and semicontinuous culture. *J. Phycol.* 12: 375-383
- Tilman, D. y S, Pacala. 1993. The maintenance of Species Richness in Plant Communities. Pp 13-25 en: R.E. Ricklefs y D. Schluter (eds.) *Species diversity in Ecological Communities: Historical and geographical perspectives*. University of Chicago Press, Chicago, Illinois, E.U.A
- Tilman, D. y D. Wedin. 1991. Dynamics of nitrogen competition between successional grasses. *Ecology*. 72(3): 1038-1049
- Titman, D. 1976. Ecological competition between algae: experimental confirmation of resource-based competition theory. *Science*. 192: 463-165
- Torsvik, V., F.L. Daae, R. A. Sandaa y L. Ovreas. 1998. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *J. Biotechnol.* 64:53-62
- Tóthmérész, B. 1995. Comparison of different methods for diversity ordering. *Journal of Vegetation Science*. 6(2): 283–290
- Van Valen, L. 1976. Ecological Species, Multispecies, and Oaks. *Taxon*. 25(2/3): 233-239
- Waide, R.B., M.R. Willig, C.F.Steiner, G. Mittlebach, L.Gough, S.I. Dodson, G.P. Juday y R. Parmenter. 1999. The Relationship Between Productivity and Species

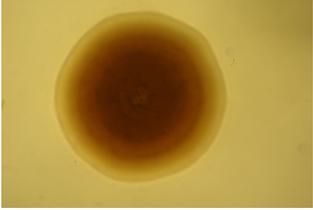
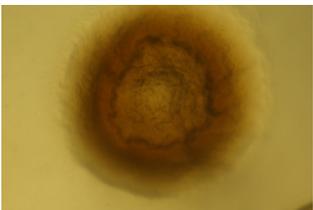
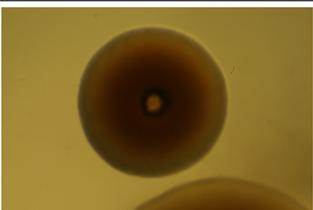
Richness. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 30:257-300

- Workentine, M. L., J. J. Harrison, A. M. Weljie, V. A. Tran, P. U. Stenroos, V. Tremaroli, H. J. Vogel, H. Ceri y R. J. Turner. 2010. Phenotypic and metabolic profiling of colony morphology variants evolved from *Pseudomonas fluorescens* pelliculas bacterianas. *Environmental microbiology*. 12(6):1565-1577
- Zhou, J., B. Xia, D.S. Treves, L. Y. Wu, T. L. Morsh, R.V. R. V. O'Neill, A. V. Palumbo, y J. M. Tiedje. 2002. Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. *App. Environ. Microbiol.* 60: 326-334

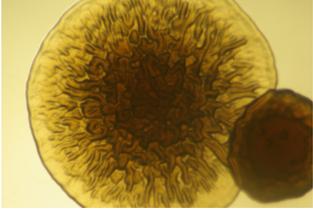
# **ANEXOS**

# ANEXOS

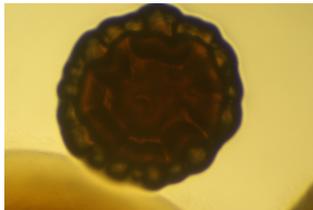
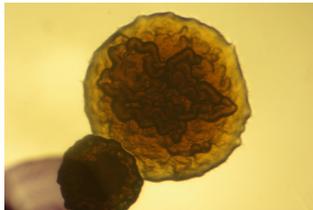
**Anexo 1.** Foto, nicho y categoría de los distintos morfotipos.

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
Morfotipo	Categoría Morfológica	Nicho	Foto
L1	SM	Medio	
L2	SM	Medio	
L3	SM	Medio	
L4	SM	Medio	
D1	SCV	Película bacteriana	

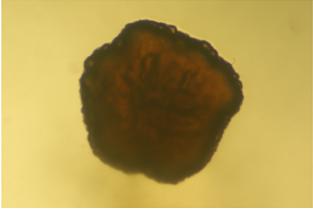
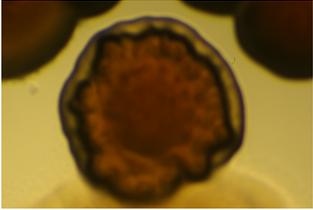
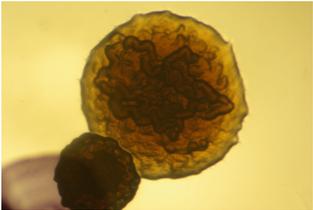
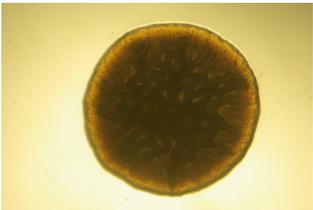
*Pseudomonas aeruginosa*

Morfortipo	Categoría Morfológica	Nicho	Foto
D3	SCV	Película bacteriana	
D18	WS	Película bacteriana	
D8	SCV	Película bacteriana	
D19	WS	Película bacteriana	
D11	WS	Película bacteriana	
D12	WS	Película bacteriana	

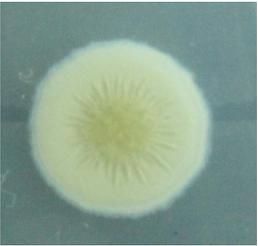
*Pseudomonas aeruginosa*

Morfortipo	Categoría Morfológica	Nicho	Foto
D13	SCV	Película bacteriana	
D14	WS	Película bacteriana	
D15	WS	Película bacteriana	
D16	WS	Película bacteriana	
D17	WS	Película bacteriana	
D20	WS	Película bacteriana	

*Pseudomonas aeruginosa*

Morfortipo	Categoría Morfológica	Nicho	Foto
D21	SCV	Poco Película bacteriana, sólo en la orilla	
D23	WS	Película bacteriana	
D24	WS	Película bacteriana	
D25	WS	Película bacteriana	

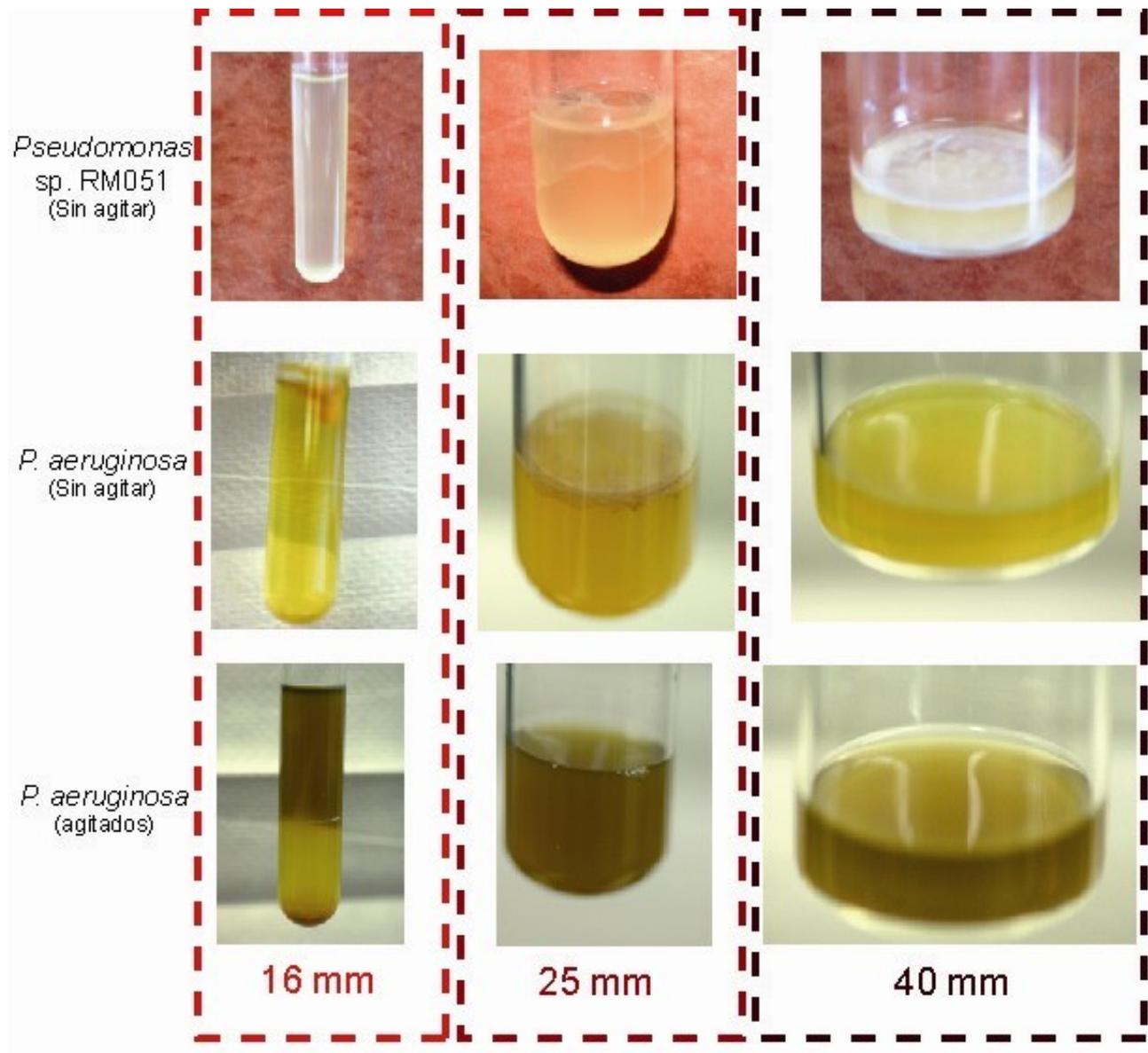
*Pseudomonas* sp. RM051

Morfotipo	Categoría Morfológica	Nicho	Foto
L1	SM	Medio	
L2	SM	Medio	
L3	SM	Medio	
R1	WS	Película bacteriana (Poco, sólo a las orillas)	
R2	WS	Película bacteriana (Poco, sólo a las orillas)	

***Pseudomonas* sp. RM051**

Morfotipo	Categoría Morfológica	Nicho	Foto
R3	SCV	Poco Película bacteriana y medio	
R4	WS	Película bacteriana (Poco, sólo a las orillas)	

**Anexo 2.** Fotos de los distintos tubos en el día en el que se obtuvo mayor diversidad.



**Anexo 3.** Receta para la preparación de medio LB

**Para un litro:**

- **5g Extracto de levadura**
- **10g Triptoma**
- **10g Cloruro de Sodio (NaCl)**

**Anexo 4.** Tablas con los resultados de las pruebas de anidadas t pareadas para comparar la diversidad de los distintos tratamientos. Como indicadores de la diversidad se utilizaron: la riqueza observada ( $S_{obs}$ ), el índice de Shannon (H) y el índice de dominancia de Berger-Parker (d). Los asteriscos denotan significancia con un valor de  $p < 0.05$ . En los casos en que la prueba de Levene fue significativa se realizaron las pruebas anidadas de t sin asumir varianzas iguales.

**Anexo 4.1** Comparación entre las distintas especies.

	Prueba de Levene (Igualdad de varianzas)			Prueba de t	
	F	p	gl	t	p
$S_{obs}$ (SA.PA vs. SA.PC)	0.227	0.639	19.000	11.784	0.000*
$S_{obs}$ (CA.PA vs. CA.PC)	32.261	0.000*	11.866	0.987	0.343
H (SA.PA vs. SA.PC)	0.002	0.967	19.000	7.726	0.000*
H (CA.PA vs. CA.PC)	12.620	0.000*	16.953	-0.230	0.821
d (SA.PA vs. SA.PC)	0.226	0.640	19.000	-5.403	0.000*
d (CA.PA vs. CA.PC)	0.244	0.627	19.000	0.938	0.360

**Anexo 4.2.** Comparación entre los tres diámetros (16, 15 y 40mm) para los tubos sin agitación con *P. aeruginosa*.

	Prueba de Levene (Igualdad de varianzas)			Prueba de t	
	F	p	gl	t	p
$S_{obs}$ (40mm vs. 25mm)	0.273	0.620	6	-0.577	0.585
$S_{obs}$ (40mm vs. 16mm)	2.143	0.194	6	-1.667	0.147
$S_{obs}$ (25mm vs. 16mm)	1.800	0.228	6	-1.342	0.228
H (40mm vs. 25mm)	0.861	0.389	6	-2.847	0.029*
H (40mm vs. 16mm)	1.938	0.213	6	-4.043	0.007*
H (25mm vs. 16mm)	0.913	0.376	6	-1.855	0.113
d (40mm vs. 25mm)	1.359	0.288	6	2.114	0.079
d (40mm vs. 16mm)	5.122	0.064	6	3.819	0.009*
d (25mm vs. 16mm)	2.897	0.140	6	2.323	0.59

**Anexo 4.3.** Comparación entre los tres diámetros (16, 15 y 40mm) para los tubos agitados con *P. aeruginosa*.

	Prueba de Levene (Igualdad de varianzas)			Prueba de t	
	F	p	gl	t	p
S <sub>obs</sub> (40mm vs. 25mm)	9.000	0.024*	3	-7.000	0.006*
S <sub>obs</sub> (40mm vs. 16mm)	9.000	0.024*	3	-37.000	0.000*
S <sub>obs</sub> (25mm vs. 16mm)	0.000	1.000	6	-21.213	0.000*
H (40mm vs. 25mm)	9.713	0.021*	3	-4.431	0.021*
H (40mm vs. 16mm)	6.524	0.043*	3	-24.009	0.000*
H (25mm vs. 16mm)	2.022	0.205	6	-20.754	0.000*
d (40mm vs. 25mm)	9.355	0.022*	3	-4.006	0.028*
d (40mm vs. 16mm)	10.900	0.016*	3	19.313	0.000*
d (25mm vs. 16mm)	5.894	0.051	6	17.808	0.000*

**Anexo 4.4.** Comparación entre los tres diámetros (16, 15 y 40mm) para los tubos sin agitación con *Pseudomonas* sp. RM051.

	Prueba de Levene (Igualdad de varianzas)			Prueba de t	
	F	p	gl	t	p
S <sub>obs</sub> (40mm vs. 25mm)	0.235	0.653	4	1.809	0.145
S <sub>obs</sub> (40mm vs. 16mm)	0.727	0.442	4	1.265	0.275
S <sub>obs</sub> (25mm vs. 16mm)	0.308	0.609	4	-0.756	0.492
H (40mm vs. 25mm)	0.782	0.426	4	3.335	0.029*
H (40mm vs. 16mm)	1.607	0.274	4	5.283	0.006*
H (25mm vs. 16mm)	0.007	0.938	4	1.480	0.213
d (40mm vs. 25mm)	1.066	0.360	4	-1.868	0.135
d (40mm vs. 16mm)	0.289	0.619	4	-6.739	0.003*
d (25mm vs. 16mm)	2.040	0.226	4	-1.933	0.125

**Anexo 4.5.** Comparación entre los tres diámetros (16, 15 y 40mm) para los tubos agitados con *Pseudomonas* sp. RM051.

	Prueba de Levene (Igualdad de varianzas)			Prueba de t	
	F	p	gl	t	p
S <sub>obs</sub> (40mm vs. 25mm)	16.000	0.016*	2	-1.000	0.423
S <sub>obs</sub> (40mm vs. 16mm)	0.000	1.000	4	2.121	0.101
S <sub>obs</sub> (25mm vs. 16mm)	0.308	0.609	4	-0.756	0.492
H (40mm vs. 25mm)	0.007	0.936	4	-0.108	0.919
H (40mm vs. 16mm)	1.019	0.370	4	1.645	0.175
H (25mm vs. 16mm)	0.007	0.938	4	1.480	0.213
d (40mm vs. 25mm)	0.574	0.491	4	0.692	0.527
d (40mm vs. 16mm)	1.084	0.357	4	-1.505	0.207
d (25mm vs. 16mm)	2.040	0.226	4	-1.933	0.125

**Anexo 5.**  $R^2$  y resultados de ANOVA de la regresiones lineales y cuadráticas para ver a relación entre productividad realizada (medida como el número de unidades formadoras de colonias por mililitro) y la diversidad para los distintos tratamientos: sin agitar (SA) y con agitación (CA) con las distintas especies: *P. aeruginosa* (PA) y *Pseudomonas* sp. RM051. Datos del día en que los tubos alcanzaron la mayor diversidad. El asterisco indica valores significativos.

**Anexo 5.1.** Relación entre productividad realizada y riqueza observada (Figura 4.9)

	$R^2$	F	gl	p
<b>PA.SA</b> modelo lineal	0.000	0.002	11	0.964
<b>PA.SA</b> modelo cuadrático	0.122	0.627	11	0.556
<b>PA.CA</b> modelo lineal	0.070	0.752	11	0.406
<b>PA.CA</b> modelo cuadrático	0.070	0.341	11	0.720
<b>PC.SA</b> modelo lineal	0.302	3.029	8	0.125
<b>PC.SA</b> modelo cuadrático	0.739	8.484	8	0.018*
<b>PC.CA</b> modelo lineal	0.039	0.282	8	0.612
<b>PC.CA</b> modelo cuadrático	0.673	6.173	8	0.035*

**Anexo 5.2** Relación entre productividad realizada y Shannon (Figura 4.10)

	$R^2$	F	gl	p
<b>PA.SA</b> modelo lineal	0.642	17.934	11	0.002*
<b>PA.SA</b> modelo cuadrático	0.704	10.717	11	0.004*
<b>PA.CA</b> modelo lineal	0.070	0.752	11	0.406
<b>PA.CA</b> modelo cuadrático	0.070	0.341	11	0.720
<b>PC.SA</b> modelo lineal	0.326	3.381	8	0.109
<b>PC.SA</b> modelo cuadrático	0.370	1.764	8	0.250
<b>PC.CA</b> modelo lineal	0.020	0.004	8	0.951
<b>PC.CA</b> modelo cuadrático	0.496	2.947	8	0.128

**Anexo 5.3** Relación entre productividad realizada y Berger-Parker (Figura 4.11)

	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>F</b>	<b>gl</b>	<b>p</b>
<b>PA.SA</b> modelo lineal	0.634	17.355	11	0.002*
<b>PA.SA</b> modelo cuadrático	0.721	11.615	11	0.003*
<b>PA.CA</b> modelo lineal	0.064	0.686	11	0.427
<b>PA.CA</b> modelo cuadrático	0.650	0.312	11	0.740
<b>PC.SA</b> modelo lineal	0.194	1.684	8	0.235
<b>PC.SA</b> modelo cuadrático	0.194	0.723	8	0.523
<b>PC.CA</b> modelo lineal	0.000	0.000	8	0.993
<b>PC.CA</b> modelo cuadrático	0.448	2.437	8	0.168