



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL**

UNIDAD IRAPUATO

UNIDAD DE GENÓMICA AVANZADA

Propiedades emergentes de las interacciones bacterianas en una
comunidad sintética

Tesis que presenta

IBT Bernardo Aguilar Salinas

Para Obtener el Grado de

Maestro en Ciencias

En la Especialidad de Biotecnología de Plantas

Directora de la Tesis

Dra. Gabriela Olmedo Álvarez

Agradecimientos

Primeramente quiero agradecer a mi directora de tesis la Dra. Gabriela Olmedo Álvarez por su guía durante mi maestría así como sus asesorías que han colaborado enormemente a mi formación.

De igual forma quiero agradecer a mi comité: Dr. Cei Abreu Goodger y Dr. Francisco Barona Gómez que en gran parte colaboraron con el resultado final de esta tesis gracias a su constante asesoría, comentarios y sugerencias.

También quiero agradecer a la Dra. Eugenia Zarza y al Dr. Luis David Alcaraz por su valiosa colaboración y asesorías durante el análisis transcriptómico.

Quiero de igual forma agradecer a mi familia y amigos por todo el apoyo incondicional durante mi maestría.

Agradezco de igual forma a mis compañeros del laboratorio de biología molecular y ecología microbiana por el apoyo durante mi trabajo experimental.

De igual forma agradezco a CONACYT por la beca otorgada.

Índice de contenido

Abstract	5
Introducción y antecedentes	7
1.1 Comunidades microbianas	7
1.1.1 Interacciones bacterianas	9
1.1.2 Interacciones antagónicas	11
1.2 Interacciones contexto-dependientes	15
1.2.1 Complejidad de las interacciones bacterianas en una comunidad	15
1.2.2 Contexto social de las interacciones bacterianas	17
1.3 Modelos de interacciones microbianas	21
1.3.1 Redes de interacción intransitivas	21
1.3.2 Piedra-papel-tijeras	23
1.3.3 Redes de interacción jerárquicas	24
1.4 Interacciones en comunidades bacterianas de suelo y sedimento	26
1.4.1 Comunidades de sedimento en el sistema Churince de Cuatrociénegas	27
1.5 Ecología sintética	30
1.5.1 Comunidades sintéticas	31
Objetivo	33
Específicos	33
Metodología	34
2.1 Selección de cepas	34
2.2 Dinámica temporal de muerte celular	35
2.2.1 Cinéticas de crecimiento y estandarización de las interacciones	35
2.2.2 Ensayos de confrontación	36
2.3 Análisis transcriptómico	40
2.3.1 Diseño experimental, extracción y secuenciación	40
2.3.2 Análisis del RNA-Seq	41
2.3.2.1 Control de calidad y eliminación de adaptadores	42
2.3.2.2 Mapeo	42
2.3.2.3 Conteo de transcritos	43
2.3.2.4 Análisis de expresión diferencial	43
Resultados	45
3.1 Selección de cepas	45
3.2 Cinéticas de crecimiento y curvas de calibración	47
3.3 Dinámica temporal de muerte celular	48
3.3.1 Cambio en el contexto, cambio en la dinámica	49
3.4 Autómata celular	54
3.5 Análisis transcriptómico	56

3.5.1 Mapeo contra el genoma de referencia y control de calidad del mapeo	56
3.5.2 Análisis de expresión diferencial	58
Discusión de resultados	64
Conclusiones	71
Perspectivas	73
Referencias	74

Abstract

Competition has been considered as one of the principal operators of the assembly of bacterial communities, however, it is largely unknown how bacteria detect the presence of a competitor, the specificity and speed of the response. To explore the dynamics of the interactions among bacteria in a microbial community we set up a confrontation assay with three strains having different roles in an interaction network: non-antagonist and resistant (R); antagonist and resistant (A); non-antagonist and non-resistant (S). These strains belong to different *Bacillus* spp. lineages and were isolated from sediment communities of the Churince water system in Cuatrociénegas, Mexico. The experiments were performed in liquid medium for the interactions to occur in a well-mixed interplay (non-structured environment) and then plated on a semisolid medium to quantify the Colony Forming Units. To determine the genetic response of the strains during the interaction with a competitor, we also performed a transcriptomic analysis of different combinations of interacting strains, at different time points. Our results showed that the interaction between A and S strains caused a decline of the colony forming units of the S strain in the first 5 minutes of the interaction, but that its viability did not decrease further within the next 30 min. Unexpectedly, when the R strain was included (interaction among the three strains, R, A, and S), the antagonism against the S strain was not observed. These results suggest that the presence of strain R interfered the antagonism of A against S and constitutes an emergent property of interactions in a synthetic community. Simulations in a cellular automata also confirm the role of strain R as the one that determines the survival of strain S, in the same way a structured environment allows the survival of the sensitive strain. The transcriptome results of the S strain show how, during the antagonistic interaction, the genes related to membrane transport, oxidative stress, DNA metabolism and resistance to antibiotics are differentially expressed. In the present work it is proposed how the context of the interactions is important to determine the dynamics of a community, since factors such as the social context and the complexity of the environment have an important influence on the community.

Resumen

La competencia ha sido considerada como uno de los principales operadores del ensamblaje de comunidades bacterianas, sin embargo, se desconoce cómo las bacterias detectan la presencia de un competidor así como, la especificidad y la velocidad de la respuesta. Para explorar la dinámica de las interacciones entre las bacterias en una comunidad microbiana establecimos un ensayo de confrontación con tres cepas con diferentes roles en una red de interacción: no antagonista y resistente (R); antagonista y resistente (A); no antagonista y no resistente (S). Estas cepas pertenecen a diferentes *Bacillus spp.* linajes y fueron aislados de comunidades de sedimentos del sistema de agua Churince en Cuatrociénegas, México. Los experimentos se realizaron en medio líquido para que las interacciones se produjeran en una interacción bien mezclada (entorno no estructurado) y luego se sembraron en un medio semisólido para cuantificar las unidades formadoras de colonias. Para determinar la respuesta genética de las cepas durante la interacción con un competidor, también realizamos un análisis transcriptómico de diferentes combinaciones de cepas que interactúan, a diferentes tiempos. Nuestros resultados mostraron que la interacción entre las cepas A y S causó una disminución de las unidades formadoras de colonias de la cepa S en los primeros 5 minutos de la interacción, pero que su viabilidad no disminuyó aún más en los siguientes 30 minutos. Inesperadamente, cuando se incluyó la cepa R (interacción entre las tres cepas, R, A y S), no se observó el antagonismo contra la cepa S. Estos resultados sugieren que la presencia de la cepa R interfiere con el antagonismo de A contra S y constituye una propiedad emergente de las interacciones en una comunidad sintética. Las simulaciones en un autómata celular también confirman el papel de la cepa R como la que determina la supervivencia de la cepa S, de la misma manera que un entorno estructurado permite la supervivencia de la cepa sensible. Los resultados del transcriptoma de la cepa S muestran cómo, durante la interacción antagonista, los genes relacionados con el transporte de la membrana, el estrés oxidativo, el metabolismo del ADN y la resistencia a los antibióticos se expresan diferencialmente. En el presente trabajo se propone que el contexto de las interacciones es importante para determinar la dinámica de una comunidad, ya que factores como el contexto social y la complejidad del entorno tienen una influencia importante en la comunidad.

Introducción y antecedentes

1.1 Comunidades microbianas

En la actualidad los microorganismos dominan la Tierra. Son los organismos que cuentan con mayor diversidad de especies además de que su biomasa acumulada sobrepasa a la de cualquier otro organismo de la Tierra. Es de resaltar el tiempo que llevan dominando el planeta que han habitado desde hace más de 3.7 billones de años y continúan siendo los organismos más representados (Øvreås, 2000).

En la naturaleza la mayoría de los organismos viven en comunidades. Las bacterias no son la excepción ya que al igual que los organismos más complejos no viven aislados sino que interactúan en complejas comunidades microbianas. Dichas comunidades se encuentran en prácticamente cualquier ecosistema de la naturaleza incluyendo suelo, plantas, animales y cuerpos de agua. Estas comunidades median importantes procesos en el ecosistema, como el procesamiento del nitrógeno en el suelo, descomposición de materia orgánica en el ciclo del carbono, y remediación de la contaminación ambiental (Øvreås, 2000). Las comunidades bacterianas también tienen gran importancia en las actividades humanas ya que intervienen en una gran cantidad de procesos de carácter biotecnológico al igual que en procesos metabólicos con repercusiones médicas. Es en este conjunto donde reside la importancia del estudio de las comunidades microbianas, que incluye entender su diversidad, función, estabilidad, dinámica e interacciones.

Las comunidades microbianas tienen una gran diversidad de especies tanto de bacterias, virus, hongos y arqueas, las cuales interactúan entre sí. La diversidad que tiene una comunidad microbiana en muchas ocasiones está dada por las condiciones donde ésta se encuentra, es decir, un ambiente con una gran disponibilidad de recursos suele ser más diverso, a diferencia de uno con condiciones extremas donde la diversidad suele ser menor, predominando especies mejor adaptadas a dichos ambientes y con funciones más especializadas (Maier & Pepper, 2009). Además de la diversidad de especies en las comunidades microbianas, existe una gran diversidad de capacidades metabólicas y las comunidades se van estructurando de tal forma que ciertas especies cumplen con una función dentro de la comunidad y de esta forma la carga metabólica se divide entre los miembros de la comunidad. Un ejemplo de esto son los estromatolitos donde se forman capas de diversas bacterias especializadas en una labor metabólica para la comunidad. Las capas superficiales normalmente están formadas por cianobacterias las cuales tienen la labor de fotosintetizar (Souza *et al.* 2006). La

diversidad de las comunidades es uno de los factores que las vuelven tan complejas y desde luego también su estudio. La gran diversidad en las comunidades bacterianas, por ejemplo, les permite mantener una comunidad más estable la cual puede mantenerse en el tiempo al volverse más robusta y así no ser afectada tan fácilmente por los factores ambientales (Hunting *et al.*, 2015).

La estabilidad dentro de las comunidades bacterianas es esencial para su mantenimiento y esta estabilidad es influenciada por factores bióticos y abióticos. Los bióticos son los organismos vivos o que algunas vez vivieron en el ambiente, mientras que los factores abióticos se refieren a factores químicos y físicos dentro del ambiente. Los factores abióticos han sido mayormente estudiados con el propósito de entender cómo es que éstos afectan a las comunidades bacterianas (Dunson & Travis, 1991). Por otro lado el efecto de los factores bióticos en las comunidades no ha sido estudiado tan exhaustivamente, sin embargo estudios recientes han demostrado cómo la estabilidad y la dinámica de las comunidades está fuertemente asociada a estos factores (Gallien, 2017; Kinkel *et al.*, 2014; Celiker & Gore, 2012; Abrudan *et al.*, 2015; Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2013). Por lo reportado en la literatura las interacciones entre organismos vivos claramente juegan un papel importante en la estabilidad y dinámica de las comunidades bacterianas.

La dinámica de las comunidades microbianas es importante al momento de su estudio ya que las comunidades no se encuentran estáticas en el tiempo pues la composición de especies, el nicho que estas ocupan, y su influencia en diversos ambientes va cambiando (Stubbenieck *et al.*, 2016). Esta dinámica bacteriana se encuentra bajo la influencia de cambios ambientales que modifican y hacen evolucionar a las comunidades. Cambios impuestos por el ambiente, como lo son eventos estacionales, cambio climático o la actividad antropogénica son factores que alteran la dinámica de la comunidad (Maier & Pepper, 2009). Sin embargo, además de los cambios externos a la comunidad uno de los estímulos que pueden alterar la dinámica en una comunidad son las propias interacciones, ya sean entre miembros de la misma comunidad o con microorganismos de comunidades aledañas (Stubbenieck *et al.*, 2016). Debido a la complejidad de las comunidades y la cantidad de factores que influyen, el estudio de su dinámica es un reto. Debido a esta gran cantidad de variables un experimento natural para el estudio de la dinámica bacteriana suele ser un ejercicio bastante exhaustivo con las técnicas microbiológicas actuales.

1.1.1 Interacciones bacterianas

Dentro de una comunidad microbiana la dinámica de las bacterias es afectada por factores bióticos y abióticos, donde en la actualidad los abióticos son los mayormente estudiados, y por otra parte a los bióticos no se les ha dado la importancia necesaria. Algunos estudios revelan el importante rol de los factores bióticos dentro de la dinámica de una comunidad bacteriana (Hooper *et al.*, 2005). Las bacterias forman complejas redes de interacciones con su ambiente, dentro de estas interacciones las que se dan entre las bacterias de la misma comunidad es uno de los factores bióticos que más afecta la dinámica y estabilidad (Raes & Bork, 2008).

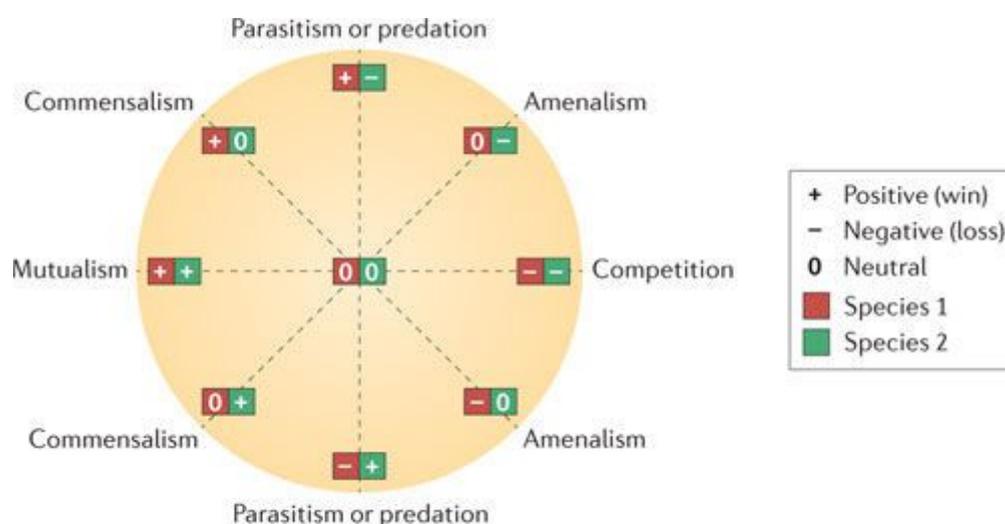


Figura 1.1 Interacciones ecológicas entre miembros de diferentes especies. Las interacciones en las comunidades pueden ser de distintas índoles, algunas generan fenotipos positivos, ya sea para ambas especies o solo para una, de igual forma los fenotipos negativos se generan en interacciones como la competencia o el amensalismo (tomado de Faust & Raes, 2012).

Existen una gran cantidad de interacciones en las comunidades bacterianas ya que en ellas coexisten diversos tipos de bacterias de distintos géneros y especies. Las interacciones normalmente tienen un efecto sobre los interactores que produce fenotipos de distinta índole. Los fenotipos que produce cada interacción van desde un impacto positivo, donde resaltan ejemplos de mutualismo, a un impacto negativo, como el que se da cuando existe una competencia, o pueden incluso no tener impacto sobre alguna de las bacterias involucradas (Fig. 1.1) (Lidicker, 1979).

En la naturaleza las interacciones con un impacto positivo son asociadas al mutualismo en el cual las dos especies que interactúan obtienen un beneficio. Un

ejemplo de esta clase de interacción dentro de las comunidades bacterianas ocurre en los casos de auxotrofias, donde las bacterias mantienen un recíproco intercambio de aminoácidos, nucleótidos o algún metabolito esencial ya que cada una es incapaz de producir un recurso, lo cual las obliga a cooperar proveyendo el recurso esencial para la otra (Pande *et al.*, 2015).

Dentro de las interacciones con impactos negativos la competencia es probablemente el fenómeno mayormente descrito. Durante la competencia ambos organismos sufren una reducción en su adecuación, es decir que disminuye su capacidad de supervivencia y reproductividad (Cornforth & Foster, 2013). Podemos clasificar a la competencia en dos tipos: explotativa (competencia por recursos) y de interferencia (antagonismo) (Birch, 1957; Case & Gilpin, 1974). La competencia explotativa es indirecta ya que al utilizar una bacteria los nutrientes del medio más eficientemente puede dejar sin nutrientes a otra que no pueda asimilarlos de igual forma; dentro de esta categoría podemos incluir a las bacterias capaces de formar estructuras como los biofilms ya que al ser estructuras fuertemente ancladas a alguna superficie la disponibilidad de nutrientes se limita y la competencia se da entre bacterias de la misma comunidad y comunidades aledañas (Nadell, Xavier & Foster, 2009). La competencia por interferencia es aquella que se da de forma directa entre bacterias donde una de ellas produce una toxina, antibiótico o algún compuesto capaz de inhibir el crecimiento de la competidora. Sobre este tipo de interacciones de competencia por interferencia o antagónicas existe literatura extensa (Kinkel *et al.*, 2014; Kirkup & Riley 2004; Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2013; Majeed *et al.*, 2011; Lyons & Kolter, 2017; Stubbendieck & Straight, 2015). Un ejemplo es el estudio donde se probó el rol de la producción de antibióticos en poblaciones de *Streptomyces* donde se realizaron ensayos de interacción por pares entre miembros de la misma población y contra miembros de otra población. Observaron que entre miembros de la misma población el antagonismo era más intenso que entre miembros de distintas poblaciones, lo cual indicaba selección local para fenotipos antagonistas (Kinkel *et al.*, 2014). Otro estudio encuentra, en cambio, mayor antagonismo entre diferentes sitios de aislamiento, para poblaciones de *Bacillus* (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2013).

A pesar de que se han estudiado extensamente las interacciones bacterianas, en su mayoría el intento por entender estas interacciones y su dinámica ha sido a través de experimentos en los cuales solo se involucran a un par de microorganismos, lo que sin duda limita en demasía el entendimiento de lo complejo que es una comunidad. Como se describió anteriormente, las comunidades bacterianas son sistemas complejos y para estudiar las interacciones se tiene que considerar que éstas no se dan en pares, si no que interactúan diversas especies de bacterias en un mismo espacio. Además de esto, otros estímulos ambientales van a influir sobre las respuestas fenotípicas de las interacciones (Hooper *et al.*, 2005).

1.1.2 Interacciones antagónicas

La gran diversidad en las comunidades microbianas permite o ayuda al mantenimiento de la comunidad, pero además desencadena una serie de interacciones con distintos fenotipos. Se debate aún si las interacciones en una comunidad bacteriana comúnmente se asocian a un fenotipo positivo, es decir interacciones benéficas entre los miembros de dicha comunidad, pues existe una gran cantidad de interacciones de competencia en una comunidad, que se desencadena principalmente cuando el espacio y los nutrientes se encuentran limitados (Hibbing *et al.*, 2010).

Como se mencionó anteriormente la competencia entre microorganismos se clasifica principalmente de dos formas, explotativa y por interferencia. Cuando el espacio en el cual la comunidad puede establecerse es limitado tiende a darse competencia explotativa incluso entre miembros de la misma especie, ya que al estar limitado el espacio implica de igual forma una limitación por nutrientes, sobre todo en comunidades de suelo o sedimentos donde las comunidades son más estructuradas y establecidas en las superficies donde forman comunidades con gran densidad celular, como las biopelículas (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2013).

La competencia explotativa puede considerarse como indirecta ya que las bacterias que son más eficientes para asimilar los nutrientes o las que se replican a una velocidad mayor acaparan más fácilmente los nutrientes y esto indirectamente afecta la adecuación de otras especies menos eficientes al momento de utilizar los nutrientes o con una tasa de replicación baja. A diferencia de la explotativa, la competencia por interferencia se considera directa ya que al momento de que una de las bacterias sense la presencia de una bacteria competidora tiende a responder por medio de un antagonismo que normalmente se asocia a la producción de un metabolito (Cornforth & Foster, 2013). La competencia por interferencia o antagonismo es la más ampliamente estudiada debido a los fenotipos de inhibición del crecimiento sobre bacterias sensibles al compuesto antagónico. La definición de antagonismo dentro de la ecología puede ser ambigua, pero normalmente se le asocia con la reducción de la adecuación de una población en consecuencia de la presencia de otra, y por lo general presenta un perjuicio o costo para ambas poblaciones e inclusive una de las poblaciones puede ser eliminada.

Dentro de los compuestos producidos por bacterias que son capaces de inhibir el crecimiento microbiano, a los antibióticos se les ha dado principal importancia y proporcionan beneficios a los productores en ambientes altamente competitivos (Williams *et al.*, 1989; Riley & Gordon, 1999; Martínez *et al.*, 2009).

Normalmente asociamos antibióticos a microorganismos como bacterias del género *Streptomyces* ya que históricamente éstas han sido las más estudiadas por su capacidad de sintetizar una gran gama de antibióticos (Kieser *et al.*, 2000). La capacidad de las bacterias de producir antibióticos o compuestos que inhiben el crecimiento de microorganismos tiene gran importancia en el área de la medicina, pero de igual forma la tiene en la ecología. La producción de estos compuestos inhibitorios tiene importantes implicaciones ecológicas en especial en las interacciones antagónicas que se dan dentro de una comunidad microbiana. Como se mencionó anteriormente, un ejemplo de ello es el trabajo de Kinkel *et al* (2014) que por medio de ensayos de interacción entre grupos de bacterias del género de *Streptomyces* provenientes del mismo sitio de muestreo contra otros que provenían de otros sitios, demostraron que en este grupo de bacterias se mostraba un incremento en fenotipos antagónicos en interacciones simpátricas (entre miembros del mismo sitio) a diferencia de lo observado en interacciones alopátricas (entre miembros de sitios de muestreo distintos), lo cual indica una selección local por fenotipos antagónicos. Nuevamente, lo mismo fue observado por Pérez-Gutiérrez *et al* (2013). La mayor proporción de antagonismo en interacciones simpátricas se le atribuye al sobrelape de nicho, es decir, que la inhibición es dirigida hacia la bacteria que presente una mayor amenaza competitiva. Esto nos habla principalmente de la abundancia de estas interacciones y en este caso de cómo las interacciones antagonistas juegan un importante papel en la estructura de las comunidades.

¿Cómo se detecta la competencia? Los primeros trabajos que abordaron interacciones antagónicas mostraban fenotipos inhibitorios de unas cepas hacia otras y se centraban en clasificar a las cepas como antagonista, sensible, y resistente pero pocos estudios abordan la pregunta de cómo una bacteria sensa a un competidor y cómo responde a esta competencia, “Pocas fallas son tan imperdonables como la falla de evitar a un depredador: ser muerto reduce enormemente la futura adecuación” (Lima and Dill, 1989). Poca información existe sobre la manera en la que se detecta a un competidor y cómo es la respuesta de bacterias en una comunidad, esto es debido a la complejidad que muchas veces representa estudiar comunidades en su ambiente natural.

Cuando existe una interacción de competencia entre microorganismos de una comunidad es común que exista una respuesta mediante la biosíntesis de enzimas o antibióticos extracelulares. De igual manera las bacterias sufren cambios en su fisiología, así como en su movilidad y la estructura de la población, como por ejemplo con la formación de biopelículas. La naturaleza de la respuesta de una bacteria a una competencia, así como la rapidez de la respuesta, pueden determinar la supervivencia de un individuo y de la comunidad. Una de las respuestas que puede darse en presencia de una competencia o más concretamente de

antagonismo es una respuesta motil, como en el trabajo publicado por Stubbendieck y Straight (2015). En este trabajo utilizan dos cepas, *Streptomyces sp.* Mg1 que es capaz de producir linearmicina, un antibiótico que inhibe el crecimiento de la segunda cepa, una cepa silvestre de *Bacillus subtilis*. Cuando se muta la cepa de *B. subtilis* en el gen *yfiK^{T83I}* (que activa un sistema de dos componentes), la cepa se vuelve resistente a la acción del antibiótico y además desata una respuesta motil en las colonias de la cepa, así como en la morfología colonial.

El antagonismo dentro de una comunidad se asocia principalmente a una guerra armamentista por recursos y espacio, sin embargo, estudios señalan la importancia que tienen este tipo de interacciones para la estabilidad de las comunidades, así como para su ensamblaje (Long & Azam, 2001). El ensamblaje de las comunidades bacterianas puede estar influenciado por interacciones antagónicas. Uno de los trabajos que refleja eso es el realizado por Pérez-Gutiérrez y colaboradores (2013), donde se probaron 78 cepas pertenecientes al género de *Bacillus* de cinco sitios de muestreo distintos mediante interacciones pareadas en las cuales se mostró una mayoría de interacciones antagónicas entre bacterias de sitios distintos, estos datos muestran que las comunidades de *Bacillus* de estos sitios no se ensamblan de manera azarosa, sino que el antagonismo juega un rol en la formación de la estructura y donde cada grupo taxonómico puede jugar un rol ecológico específico (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2013).

Además de darle estructura a una comunidad, el antagonismo puede tener un papel importante para evitar invasiones de otros microorganismos y así preservar la comunidad. Estudios recientes revelan que los consorcios bacterianos utilizan distintas estrategias para evitar invasiones como por ejemplo controlar los metabolitos producidos por la comunidad (Taillefumier *et al.*, 2017). La respuesta a nivel metabólico también involucra en general la síntesis de metabolitos como antibióticos o compuestos antagonistas los cuales permiten a una comunidad persistir evitando la invasión de otros microorganismos. Por ejemplo, un estudio sobre inhibición realizado por Wright y Vetsigian en 2016 reveló que el antagonismo juega un importante papel para evitar la invasión. En aislados de *Streptomyces*, si una bacteria residente de una comunidad es capaz de inhibir al invasor es menos probable que ésta invada a la comunidad. Contrario a lo que se pensaba que una bacteria sea capaz de inhibir a la bacteria residente no siempre le asegura el invadir a la comunidad por el contrario bacterias que no inhiben a la residente son más aptas para invadir a esta comunidad. La capacidad de estos aislados de *Streptomyces* de resistir una invasión y no ser los más aptos para invadir propicia más que nada una biestabilidad (Wright & Vetsigian, 2016).

Gracias a algunos de los antecedentes mencionados anteriormente se ha logrado ampliar el conocimiento acerca de interacciones antagónicas. Sin embargo aún es

mucho lo que se tiene que hacer para poder entender de manera más completa la dinámica, mecanismos y funciones del antagonismo en comunidades microbianas, ya que en su mayoría los trabajos enfocadas a éstas son en interacciones pareadas y como se mencionó, una comunidad bacteriana tiene una complejidad mayor tanto en interacciones como en otros factores externos.

1.2 Interacciones contexto-dependientes

A pesar de los varios trabajos que se han hecho para entender las interacciones antagónicas en microorganismos, poco es lo que se sabe de estas interacciones a nivel comunidad. Esto es el resultado de que la mayor parte de los estudios se han interesado más que nada en estudiar el efecto de metabolitos como los antibióticos, pero las interacciones antagónicas son más que la acción de un antibiótico, existen ciertos estímulos que deben de considerarse cuando hablamos de interacciones, sobre todo las interacciones antagónicas.

1.2.1 Complejidad de las interacciones bacterianas en una comunidad

Los estímulos ambientales y el estrés que éstos pueden generar en las comunidades tienen una repercusión importante en la estabilidad, así como de las interacciones que hay entre los miembros de la comunidad. El pH es uno de estos factores que toma gran importancia para la abundancia y la diversidad en una comunidad bacteriana. Estudios han mostrado como la composición de comunidades bacterianas de suelo está fuertemente definida por el pH. Se ha visto que existe variación de pH en muestras tomadas de distancias relativamente cortas, lo cual solo indica el importante rol del pH en las comunidades bacterianas (Rousk *et al.*, 2010).

Un estrés muy común en las bacterias es el estrés oxidativo generado por las llamadas especies reactivas de oxígeno, como el radical anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los altamente reactivos radicales hidroxilo (OH). Estos productos se generan y acumulan por el continuo crecimiento de bacterias aeróbicas, son productos que generan comúnmente un estrés en las bacterias debido a que se acumulan fácilmente y a que dañan a las macromoléculas (ADN, proteínas y lípidos) (Tinajero-Trejo *et al.*, 2013). De hecho, resulta complicado saber si los antibióticos matan a los microorganismos por el daño directo a su blanco de acción, o por el estrés oxidativo resultante. Algunos trabajos demuestran que la muerte celular producida por algunos antibióticos requiere de especies reactivas de oxígeno (Takahashi *et al.*, 2017).

Los organismos, incluyendo a las bacterias, han desarrollado mecanismos para protegerse de la acción de las especies reactivas de oxígeno, por ejemplo, poseen enzimas como la catalasa y la superóxido dismutasa que son capaces de detoxificar el medio de especies reactivas de oxígeno (Cabiscol *et al.*, 2000). Debido a la gran cantidad de bacterias que crecen juntas en una comunidad bacteriana la producción

y sobre todo la acumulación de estas especies reactivas de oxígeno son comunes, pero estos factores normalmente no se consideran cuando se realizan trabajos sobre las interacciones en una comunidad bacteriana.

Los nutrientes son una parte esencial en cualquier comunidad. En las comunidades bacterianas cuando los nutrientes son muy escasos se considera que la condición es oligotrófica. Una comunidad con escasos nutrientes necesita generar estrategias para poder sobrevivir a estas condiciones adversas. Los recursos son una de las causas por las cuales existe competencia entre bacterias de una comunidad. Las comunidades requieren proteger sus recursos de invasores o los llamados “cheaters”, que se benefician de los bienes públicos de una comunidad sin ser parte esencial de ella al no aportar al mantenimiento de la comunidad (Cornforth & Foster, 2013). La presencia o ausencia de un nutriente esencial como lo puede ser el fósforo o nitrógeno puede generar un cambio importante en las interacciones de una comunidad debido a que en una comunidad con una escasez de algún nutriente tiende a generarse una mayor competencia (Cornforth & Foster, 2013). De igual forma una comunidad más especializada en su manera de aprovechar algún nutriente, o una comunidad con recursos en abundancia tienden a generar menos interacciones de competencia o antagonismo entre sus miembros, pero si este nutriente comienza a escasear las interacciones pueden comenzar a cambiar a interacciones antagónicas. El antagonismo puede intensificarse o generarse cuando existe un solapamiento de nutrientes sobre todo cuando son bacterias con gran parentesco que requieran los mismos nutrientes o tengan estrategias metabólicas similares (Vaz Jauri & Kinkel, 2014). En este punto entra el concepto de partición de nicho, donde bacterias con diferentes orígenes taxonómicos particionan su nicho para evitar invasiones, es decir, si los miembros de la comunidad son muy diversos explotan mejor sus recursos y la disponibilidad de nichos es menor, lo cual evita invasiones (Eisenhauer *et al.*, 2012).

Los bienes públicos también son importantes para determinar las interacciones en las comunidades y su composición, ya que estos son elementos primordiales para toda comunidad. Es por ello que en las comunidades microbianas la producción de bienes públicos puede modificar las interacciones que en estas suceden. Los bienes públicos son muy importantes para la estabilidad de la comunidad, así que los miembros de las comunidades deben de generar estrategias para la protección de estos recursos. En *B. subtilis* se ha descrito que para proteger algunos bienes públicos, las especies desarrollan la discriminación por parentesco (en inglés, “kin discrimination”) de manera que *Bacillus subtilis* antagoniza a bacterias con un cercano parentesco a ellas pero no a las que mayormente divergen (Lyons & Kolter, 2017). Esto es diferente de otros sistemas donde se discrimina a las de menor parentesco, debido a que el objetivo del antagonismo sigue siendo la discriminación de bacterias que no forman parte de la misma población (sin importar que estas

guarden un gran parecido). Se determinó que *B. subtilis* tiene la capacidad de reconocer grados de parentesco, no solo si tiene parentesco o no. Se probaron diferentes cepas de *B. subtilis* las cuales mostraron ser discriminadas, *B. pumilus* que es cercana al clado de *B. subtilis* mostró resultados variables y *B. cereus* (ya con menor parentesco) no mostró ser antagonizada (Lyons & Kolter, 2017). Para entender cómo se determina si otra bacteria debe de ser discriminada se probó si las bacterias discriminadas por *B. subtilis* eran capaces de robar bienes públicos, utilizando como modelo la surfactina. Se observó que las bacterias discriminadas eran capaces de producir y utilizar la surfactina que *B. subtilis* usaba y las no discriminadas eran las que eran incapaces de utilizar dicho compuesto, así que no constituían una amenaza (Lyons & Kolter, 2017).

El ejemplo anterior nos demuestra como los bienes públicos pueden generar una respuesta en la comunidad para proteger a ésta de invasores. Taillefumier y colaboradores (2017) ejemplifican los anterior por medio de modelado matemático proponen cómo las bacterias en una comunidad actúan como un “cartel” donde éstas controlan la producción de los bienes públicos y el costo que estos tienen para la comunidad para que de esta manera solo miembros de ella puedan utilizarlos y evitar que invasores lo utilicen (Taillefumier *et al.*, 2017). Por otro lado las interacciones pueden generar la cooperación entre microorganismos en una comunidad. Un estudio realizado en *S. cerevisiae* muestra como una población de estas levaduras es capaz de compartir los bienes públicos producidos entre las mismas levaduras cuando se encuentran en un cocultivo con una cepa competidora de *E. coli*, la cooperación entre las levaduras aumenta debido a que de esa forma tienen una preferencia y un aumento en su capacidad de aprovechar bienes públicos debido a que en la presencia de un competidor dichos bienes llegan a ser escasos (Celiker & Gore, 2012).

Como se mencionó anteriormente la complejidad en comunidades bacterianas es inmensa y el tratar de abordar las interacciones que ocurren entre los miembros puede ser complicado en un experimento debido a la cantidad de variables y de datos que se pueden llegar a generar. Es por esto que en trabajos de ecología sintética como este se busca acotar esas variables y hacer un trabajo que permita generar información para comenzar a entender estos sistemas tan complejos y así ampliar este tipo de proyectos a sistemas más robustos.

1.2.2 Contexto social de las interacciones bacterianas

Durante años el estudio de las interacciones en una comunidad microbiana se ha limitado a ensayos de interacción entre pares de cepas y los interactores se les ha

clasificado como antagonista, sensible o resistente. Estos roles se pueden dar en combinaciones, por ejemplo, una cepa puede ser antagonista pero también resistente. Como se sabe hasta ahora las interacciones en las comunidades son mucho más complejas que la acción de un antibiótico, ya que el contexto en el que suceden las interacciones es muy importante para determinar la naturaleza de éstas. El estímulo más estudiado hasta ahora son los factores abióticos dentro de las comunidades bacterianas y como se describió en la sección anterior estos estímulos pueden tener una importante repercusión en la dinámica y la naturaleza de las interacciones. Por otro lado el contexto social, es decir el impacto de los otros miembros de la comunidad, y cómo afecta éste a las interacciones dentro de una comunidad ha sido poco estudiado hasta la fecha y esta falta de conocimiento hasta ahora no nos han permitido tener un entendimiento más amplio de las dinámicas en una comunidad bacteriana. Aunque pocos, los trabajos que estudian las interacciones por medio de cultivos o interacciones que involucran a más de dos interactores han aportado suficiente información para pensar que en una comunidad el contexto social tiene una importante repercusión en la naturaleza de las interacciones.

Las comunidades bacterianas presentan una gran cantidad de interacciones debido a su gran diversidad, y es por ello que su estudio debe de abordarse de manera más global, considerando más variables como la interacción entre varios miembros de la comunidad así como el acomodo espacial dentro de comunidades. Al acomodo espacial o estructura, se le ha dado gran importancia dentro del contexto ecológico de las interacciones tanto por evidencia experimental como por medio del modelado matemático (Evans *et al.*, 2013). El modelado matemático ha ofrecido una herramienta muy útil para el estudio de comunidades microbianas por medio de algoritmos que intentan simular las interacciones en una comunidad. Dichas simulaciones son alimentadas con datos experimentales y así permiten hipotetizar patrones y dinámicas en las comunidades que de manera experimental sería muy difícil determinar. Por medio del modelado matemático se ha estudiado cómo el acomodo espacial tiene una gran influencia sobre las interacciones en una comunidad. Trabajos enfocados al modelado de comunidades de suelo han demostrado que el acomodo espacial juega un papel crucial para la supervivencia, ya que en estas comunidades las bacterias susceptibles al antagonismo son capaces de aislarse del antagonismo ejercido por otros miembros de la comunidad gracias a la presencia de bacterias resistentes que las rodean y aíslan de ser inhibidas. A estos llamados “parches bacterianos” se les atribuye la sobrevivencia de las bacterias poco competitivas en una comunidad de suelo (Zapién-Campos *et al.*, 2015).

Como ya se comentó, normalmente se utilizan interacciones pareadas donde la importancia reside en el antagonismo, resistencia y sensibilidad. Este enfoque

funciona para explicar estabilidad en comunidades estructuradas donde existe una clara separación entre estas especies, sin embargo en la naturaleza se ha observado que bacterias con roles de “antagonista”, “resistente” y “sensible” se encuentran mezcladas incluso a muy pequeña escala (Raynaud & Nunan, 2014). Debido a que este tipo de enfoques de interacciones por pares no describen la coexistencia en ambientes no estructurados, Kelsic *et al.* (2015) encontraron que la presencia de una tercera especie es capaz de estabilizar una interacción entre antagonista y sensible. La presencia de esta tercer especie funge como la cepa resistente, pero no una resistencia intrínseca o estructural, sino resistencia activa en la cual una especie es capaz de resistir por medio de la degradación del antibiótico o metabolito en cuestión. La hipótesis es que una bacteria resistente por degradación es capaz de estabilizar las interacciones antagónicas por medio de la degradación del compuesto inhibitorio en cuestión, lo cual permite la supervivencia de la especie sensible, a diferencia de una resistencia intrínseca donde la especie sensible no sería capaz de sobrevivir. Por medio de un enfoque *in silico* realizaron simulaciones de tres especies: la especie productora del compuesto, la especie sensible y una con resistencia intrínseca. De igual forma se realizó la simulación cambiando a la cepa con resistencia intrínseca por una degradadora, y en este caso la simulación arrojó que una comunidad con especies resistentes intrínsecas culminan con la supervivencia de solo una especie, por el contrario la simulación con una especie capaz de degradar el compuesto antagónico permite una coexistencia (Kelsic *et al.*, 2015).

La presencia de más miembros de una comunidad durante una interacción entre dos especies puede alterar el fenotipo resultante comparado con la interacción pareada, es por esto que es importante considerar la presencia de la comunidad al momento de estudiar interacciones, sobre todo en interacciones de competencia. La producción de antibióticos normalmente se asocia a interacciones de inhibición de competidores, sin embargo recientes estudios revelan como las interacciones sociales son capaces de modificar estos fenotipos ya sea suprimiendo o aumentando la inhibición. Aburdan *et al.* (2015) muestran como interacciones inhibitorias entre cepas de *Streptomyces* son modificadas con la presencia de una tercer cepa, que en unos casos produce estímulos que aumentan la producción del metabolito asociado al antagonismo y por otro lado algunas otras lo suprimen. Este fenómeno se asocia al mantenimiento de la diversidad en la comunidad al convertir interacciones letales en interacciones neutras que garantizan la supervivencia de ambos interactores (Aburdan *et al.*, 2015).

La presencia de una tercera especie en una interacción puede conducir a un cambio en las interacciones que en algunos casos beneficia a las primeras dos especies. Aunque en un cocultivo la mayoría de los genotipos se benefician fuertemente, no necesariamente todas las interacciones son benéficas, ya que la tercer especie

puede entrar en una interacción no benéfica. Suponiendo una red de tres especies, en la que inicialmente solo dos están en un cocultivo y compiten por el mismo nutriente, esto conduce a una competencia que causa fenotipos negativos al menos a una de ellas, pero si después se añade a la interacción una tercera especie capaz de sintetizar el nutriente limitante y liberarlo al medio, entonces la competencia entre las dos primeras ya no ocurre ya que ahora son capaces de crecer bien y por ende terminan perjudicando a la tercera, al ya no tener disponible el nutriente que liberaba al medio (Mitri & Foster, 2013).

1.3 Modelos de interacciones microbianas

Durante los últimos años se han propuesto modelos con el propósito de explicar la dinámica de las interacciones bacterianas dentro de las comunidades. Estos modelos han aportado una gran cantidad de información que nos permite entender de mejor manera las dinámicas en las interacciones bacterianas. Actualmente no existe un modelo que logre explicar las interacciones en toda clase de comunidades, esto debido a que los modelos establecidos hasta ahora solo pueden explicar estas dinámicas para una clase específica de ambientes o comunidades. De igual forma las dinámicas pueden cambiar dependiendo del contexto ecológico, es decir, un modelo que explique las interacciones en una comunidad de suelo puede no explicar la dinámica en una comunidad marina donde el ambiente es poco estructurado. Cada modelo ha aportado algo al entendimiento de las interacciones, así como ninguno es el modelo definitivo que puede explicar toda la dinámica en una comunidad, es por esto que vale la pena repasar los modelos mayormente aceptados tomando en cuenta sus aciertos, así como sus falencias.

1.3.1 Redes de interacción intransitivas

Existen diversos mecanismos para que se de una competencia intransitiva en una red de interacciones, estos mecanismos normalmente dan como resultado el mantenimiento de la diversidad. Las interacciones intransitivas comunes son aquellas que son cíclicas, y no hay una jerarquía. No todos los mecanismos que llevan a la intransitividad involucran a la competencia por medio de la producción de antibióticos, aunque existen otros mecanismos que surgen de aspectos como mejor competitividad dependiendo del uso de algún recurso o diferentes estadios de vida. Cuando existe una diferencia en la competitividad de los miembros de una comunidad bacteriana a través de su capacidad de utilizar un recurso (Fig. 1.2 (1)) o dependiendo de su estadio de vida (Fig. 1.2 (2)) normalmente no existe una bacteria que se sobreponga a las demás en el uso de todos los recursos o en todos los estadios de vida (Palmer *et al.*, 2013; Edwards & Schreiber, 2010).

Otro mecanismo que conlleva a las interacciones intransitivas es la estrategia utilizada por las bacterias para su supervivencia. Por ejemplo, una bacteria altamente agresiva tiene una ventaja en interacciones en igualdad de condiciones, sin embargo, cuando son abundantes el costo por ser tan competitivo es muy alto y son fácilmente invadidas por bacterias de las llamadas “cheater” (que puede surgir de la misma población por pérdida de la capacidad de sintetizar la costosa molécula antagonista). De igual forma una gran abundancia de “cheaters” es fácilmente

invadida por bacterias de comportamiento menos agresivo que en cambio puede ser invadida por bacterias agresivas cuando estas son muy abundantes (Fig 1.2 (3)) (Sinervo & Lively 1996).

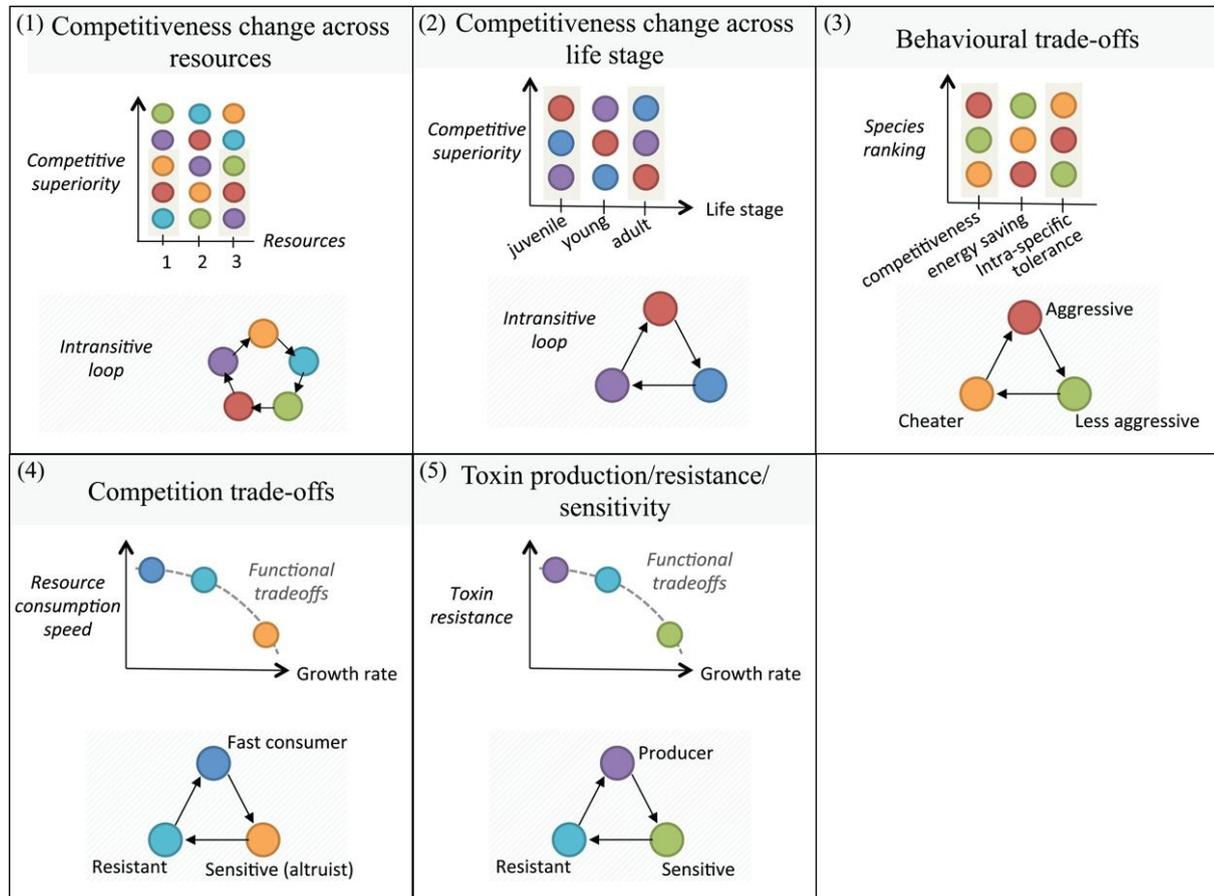


Figura 1.2. Mecanismos que favorecen las interacciones intransitivas. Las interacciones intransitivas se dan por diversos mecanismos, entre ellos están (1) el cambio de la competitividad a través de recursos, (2) a través del estadio de vida, (3) por trade-offs de comportamiento o (4) por competencia y (5) por la producción, resistencia y sensibilidad a toxinas (tomado de Gallien, 2017).

Trade-offs, en español contrapartida o compromiso, sobre velocidad de crecimiento y velocidad de utilizar nutrientes (Fig. 1.2 (4)), así como la producción de sensibilidad y resistencia a toxinas (Fig. 1.2 (5)), son mecanismos que comúnmente llevan a interacciones de tipo intransitivo. La velocidad a la cual una bacteria asimila un recurso puede generar una ventaja sobre las que lo consumen de manera lenta, que a su vez tienen una ventaja en su velocidad de crecimiento la cual genera una ventaja sobre una cepa con velocidad de consumo de recursos intermedia que tiene una ventaja competitiva sobre la que más rápido los consume (Nahum *et al.*, 2011). Por último están las redes de interacción intransitivas que cumplen con el modelo de piedra-papel-tijeras donde se encuentra una cepa capaz de producir un compuesto que inhibe a una de las bacterias, dicha bacteria a pesar de ser sensible a la inhibición tiene una ventaja competitiva sobre la tercer bacteria que es resistente a la inhibición (una resistencia activa que requiere síntesis del producto) y por ende

tiene una ventaja evolutiva contra la bacteria productora del compuesto antagonista (Kerr *et al.*, 2002, Kirkup & Riley, 2004).

1.3.2 Piedra-papel-tijeras

Quizás el tipo más estudiado de interacción intransitiva es el de piedra-papel-tijeras, donde se forma una red de interacción que asemeja al juego del mismo nombre. Este modelo se representa por medio de tres especies donde existe una competencia en donde la especie A es mejor competidor que la especie B ($A > B$), $B > C$ y la especie C es mejor competidor que la especie A lo cual genera un ciclo de interacciones intransitivas (Gilpin, 1975; May & Leonard, 1975). Este modelo anteriormente ya había sido empleado en otras áreas de la ciencia y en la ecología para tratar de entender la competencia entre diversas especies (Sinervo & Lively, 1996; Buss & Jackson, 1979; Paquin & Adams, 1983). En el área de la ecología microbiana el primero en proponer este modelo para explicar interacciones en comunidades bacterianas fue Kerr *et al.* (2002), el cual utilizó tres cepas de *E. coli* las cuales cumplen el modelo de piedra-papel-tijeras, donde una de las cepas es capaz de producir colicina (C) la cual inhibe el crecimiento de otra de las cepas (S) y la tercer cepa es capaz de resistir a la colicina (R). La red establece que C desplaza a S (por medio de la acción de la colicina), S desplaza a R (S tiene una ventaja de crecimiento) y R desplaza a C (R tiene una ventaja de crecimiento). Por medio de ensayos de confrontación y simulaciones *in silico* Kerr propone que esta clase de modelos logran mantener la diversidad en un ambiente local y estructurado, ya que se mantiene la presencia de las tres cepas.

A pesar de que el modelo de piedra-papel-tijeras ha tenido gran aceptación dentro del área de ecología bacteriana es un modelo que se encuentra muy restringido ya que solo es aplicable a ambientes estructurados, si es un ambiente no lo está como lo puede ser un ambiente marino o uno que es propenso a perturbaciones dicho modelo no explica la dinámica. El mismo trabajo de Kerr describe cómo este modelo solo funciona a nivel local ya que a nivel global, la diversidad no se mantiene pues sobrevive únicamente una de las tres bacterias. De igual forma por medio de experimentos en placa ellos mismos observan como solo cuando la placa está estática puede mantenerse la diversidad y cuando la placa se esta mezclando o el experimento se efectúa en un frasco solo una bacteria puede ser recuperada a lo largo de 70 generaciones (Kerr *et al.*, 2002). Básicamente la limitante más grande del modelo piedra-papel-tijeras es que solo puede aplicarse a ambientes estructurados y de manera local ya que sin esta estructura el modelo colapsa y la diversidad se pierde. Es de resaltar que en este modelo se utilizan cepas isogénicas, en donde sólo el factor resistencia o antagonismo se modifica. En las comunidades naturales son cientos los genes que pueden ser distintos aun dentro

de la misma especie, por lo que se puede observar un trade-off en una dirección y otro en la dirección contraria.

1.3.3 Redes de interacción jerárquicas

Algunos modelos de interacciones microbianas tratan de explicar las interacciones de manera jerárquica, es decir, donde las bacterias crean redes donde se ordenan dependiendo de su habilidad competitiva, donde las bacterias que se encuentran en la parte superior de la jerarquía son las que tienen ventajas competitivas en comparación de las que están por debajo de la jerarquía. El principio básico de estas redes está basado en el principio de exclusión competitiva donde las bacterias que interactúan entre ellas pueden ordenarse en redes jerárquicas dependiendo de su habilidad para competir y donde la dinámica es dominada por el más apto para dicho ambiente (Foster & Bell, 2012).

A diferencia del modelo de piedra-papel-tijeras esta clase de redes no ha sido estudiadas tan ampliamente, pero existen algunos trabajos que proponen la existencia de estas redes en comunidades de bacterias, en especial en comunidades de suelo o sedimento. La competencia en comunidades de suelos es muy grande debido a la gran diversidad de bacterias que en ellas habitan y a su gran capacidad metabólica. Un ejemplo de bacterias que habitan estas comunidades es el género de *Streptomyces*. Estas bacterias han sido ampliamente estudiadas debido a que forman parte activa de las interacciones de una comunidad bacteriana ya que cuentan con una gran capacidad de sintetizar antibióticos. Wright y Vetsigian (2016) realizaron una red de interacciones antagónicas entre 18 aislados de *Streptomyces*. Las interacciones se realizaron de forma pareada, en ella se clasificaban de forma en una jerarquía a las cepas dependiendo de su capacidad antagonista, donde las cepas más antagonista (con mayor capacidad competitiva) se clasificaban en lo alto de la jerarquía, a excepción de 4 interacciones que generan antagonismo en contra de la jerarquía, las otras otras interacciones cumplían con la jerarquía. El trabajo por Wright y Vetsigian entre otras cosas propone al antagonismo como un mecanismo que genera una ventaja competitiva en las comunidades, además revela una mayor complejidad en las dinámicas de las interacciones ya que el modelo jerárquico propone una enorme ventaja competitiva de las especies que están en la parte superior de la jerarquía lo cual contradice al modelo cíclico de estabilidad que propone el de piedra-papel-tijeras.

Otro trabajo de investigación realizado por Pérez-Gutiérrez *et al.* (2013) propone un modelo jerárquico en una comunidad de *Bacillus* aislados de sedimento. Se utilizaron 72 aislados pertenecientes a 5 sitios los cuales se probaron mediante

interacciones pareadas y se determinó si existía antagonismo entre ellas. Las redes construidas con dichos resultados mostraron un claro comportamiento jerárquico basado en el antagonismo de las bacterias sobre miembros de la comunidad donde bacterias que se encontraban en la cima de la jerarquía se consideraban las más antagonistas o con mayor capacidad competitiva y las de las partes inferiores son en teoría las que tienen la mayor desventaja competitiva. En los resultados de las interacciones también se encontró la presencia de cepas que no mostraron antagonismo contra ninguna de los aislados de la red y que eran resistentes a los antagonismos ejercidos por los miembros de la parte superior de la jerarquía, estas cepas se les clasificó como resistentes. Estas redes se realizaron entre los aislados de cada sitio y entre sitios y el resultado fue el mismo, lo que cabe resaltar es que cuando se realizaban las interacciones entre sitios las interacciones antagónicas aumentaban lo cual se atribuye a la importancia de las interacciones antagónicas para el ensamblaje de la comunidad (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2013).

1.4 Interacciones en comunidades bacterianas de suelo y sedimento

Los suelos ya sean agrícolas, urbanos o sedimentos están siempre poblados por una gran cantidad de bacterias que a su vez viven en comunidades y llegan a cumplir funciones tan importantes como los procesos biogeoquímicos (Kim *et al.* 2008). Al ser tan abundantes y al cumplir procesos de suma importancia en el suelo las bacterias de comunidades son de gran interés científico, sin embargo su estudio genera un gran desafío para la ecología actual, ya que se han encontrado hasta 8,300,000 genotipos en un gramo de suelo agrícola (Gans *et al.*, 2005). A pesar de la gran diversidad no todos los suelos son igualmente diversos, la diversidad cambia dependiendo de ciertos factores, en especial factores abióticos como el pH, ya que suelos ácidos tienen normalmente una baja diversidad a diferencia de suelos con pH neutral donde la diversidad aumenta (Fierer & Jackson, 2005). Debido a su gran diversidad se puede asumir que las interacciones bacterianas en una comunidad de suelo son abundantes. Algunos estudios han propuesto que una sola célula en el suelo puede tener un promedio de 120 células vecinas con las cuales interactúa (Raynaud & Nunan, 2014), estas interacciones tienen sin duda un efecto sobre los procesos del suelo, así como para el ensamblaje de las comunidades. Ahora, esto solo es una suposición y habría que explorar más ampliamente, pues la estructura espacial y formación de estructuras como biocapas pueden limitar las interacciones.

En comunidades de suelo o sedimento las interacciones son las que establecen la estructura de la comunidad. Comúnmente las interacciones van a conllevar a la competencia tanto de espacio como por recurso (Hibbing *et al.*, 2010). En el caso de competencia en las comunidades las interacciones antagonistas pueden ser favorecidas, donde uno de los interactores por lo general lanza al ambiente un compuesto tóxico para las bacterias no productoras de éste. Esta clase de interacciones en comunidades de suelo llegan a tener consecuencias menos perjudiciales para las no productoras en comparación de lo que sucedería en un ambiente líquido. Mientras que la estructura del suelo hace menos susceptibles a una extinción a las no productoras, en medios líquidos esto puede causar la extinción de las bacterias sensibles (Chao & Levin, 1981; Greig & Travisano, 2008). La coexistencia entre fenotipos antagónicos y sensibles que se obtiene en ambientes como el suelo solo puede lograrse de manera local y por los miembros de la comunidad (Kerr *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2008).

Muchos de los estudios sobre dinámica e interacciones en comunidades de suelo se han realizado en *Streptomyces*, debido a que estas bacterias son ubicuas en suelos

y sedimentos marinos. Además de su ubicuidad *Streptomyces* tiene un gran potencial de producción de antibióticos siendo de esta bacteria de donde se han aislado la mayoría de los antibióticos actuales (Tanaka & Omura, 1990; Watve *et al.*, 2001; Challis & Hopwood, 2003). Tomando en cuenta que las interacciones antagónicas se consideran las más abundantes entre las interacciones microbianas esto hace a *Streptomyces* un buen modelo de estudio. Recientes trabajos enfocados en cepas de *Streptomyces* que fueron aisladas de diversas muestras de suelo resalta cómo las interacciones inhibitorias son seleccionadas de forma positiva en bacterias aisladas del mismo sitio. Kinkel *et al.* (2014) observaron que si se confrontaban las bacterias en busca de inhibición se encontraban en mayor abundancia las interacciones inhibitorias en cepas aisladas del mismo sitio que al confrontar cepas de sitios distintos. Una explicación podría ser que en cepas del mismo sitio el sobrelape de nicho puede ser mayor, y por ende haber mayor inhibición (Kinkel *et al.*, 2014), en este caso la estructura que tienen las bacterias en el suelo pudiera evitar este sobrelape y minimizar las interacciones inhibitorias. Pero otra explicación sería que las mismas condiciones de la comunidad cause que no se exprese el antagonismo o que este sea minimizado por la presencia de otras bacterias.

1.4.1 Comunidades de sedimento en el sistema Churince de Cuatrociénegas

En recientes años el sistema de Churince en Cuatrociénegas, México ha sido objeto de estudio debido a su gran diversidad de aislados bacterianos obtenidos del agua y sedimentos de este sistema, esto debido a su peculiar historial geológico (Souza *et al.*, 2006). El sistema Churince, y en general el valle de Cuatrociénegas, es un sistema oligotrófico que a pesar de eso tiene una gran diversidad microbiológica y del cual se han aislado diversos linajes de *Bacillus spp.* (Cerritos *et al.*, 2011; Rodríguez-Torres *et al.*, 2017; Souza *et al.*, 2018). A pesar de que el sistema tiene nutrientes muy limitados las bacterias han encontrado diferentes estrategias para mantener sus comunidades y aprovechar los pocos recursos disponibles, esto al igual que lo observado en otros sistemas oligotróficos (Kuznetsov *et al.*, 1979). El estudio del sistema Churince ha mostrado tener un gran potencial para el estudio de comunidades de sedimento y el ensamblaje de estas, así como la dinámica de las interacciones.

El uso de bacterias del género *Bacillus* aisladas de Churince ha sido útil para el estudio de interacciones antagónicas ya que en trabajos previos se ha reportado que estas bacterias tienen la capacidad de sintetizar compuestos antagónicos como

lo son bacteriocinas (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2013; Aguirre-von Wobeser *et al.*, 2014). Como se explicó anteriormente, un estudio realizado con cepas de *Bacillus* spp. demuestra como el ensamblaje de estos aislados se da en base a las interacciones antagónicas y no de manera azarosa (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2013). El estudio se realizó confrontando 78 aislados de *Bacillus* spp. de sitios distintos, la confrontación se realizó de forma pareada con cuyos datos se realizaron redes jerárquica que se asemejan a redes alimenticias (Fig 1.3.), donde se encontraron cuatro niveles jerárquicos de acuerdo al nivel de antagonismo (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2013).

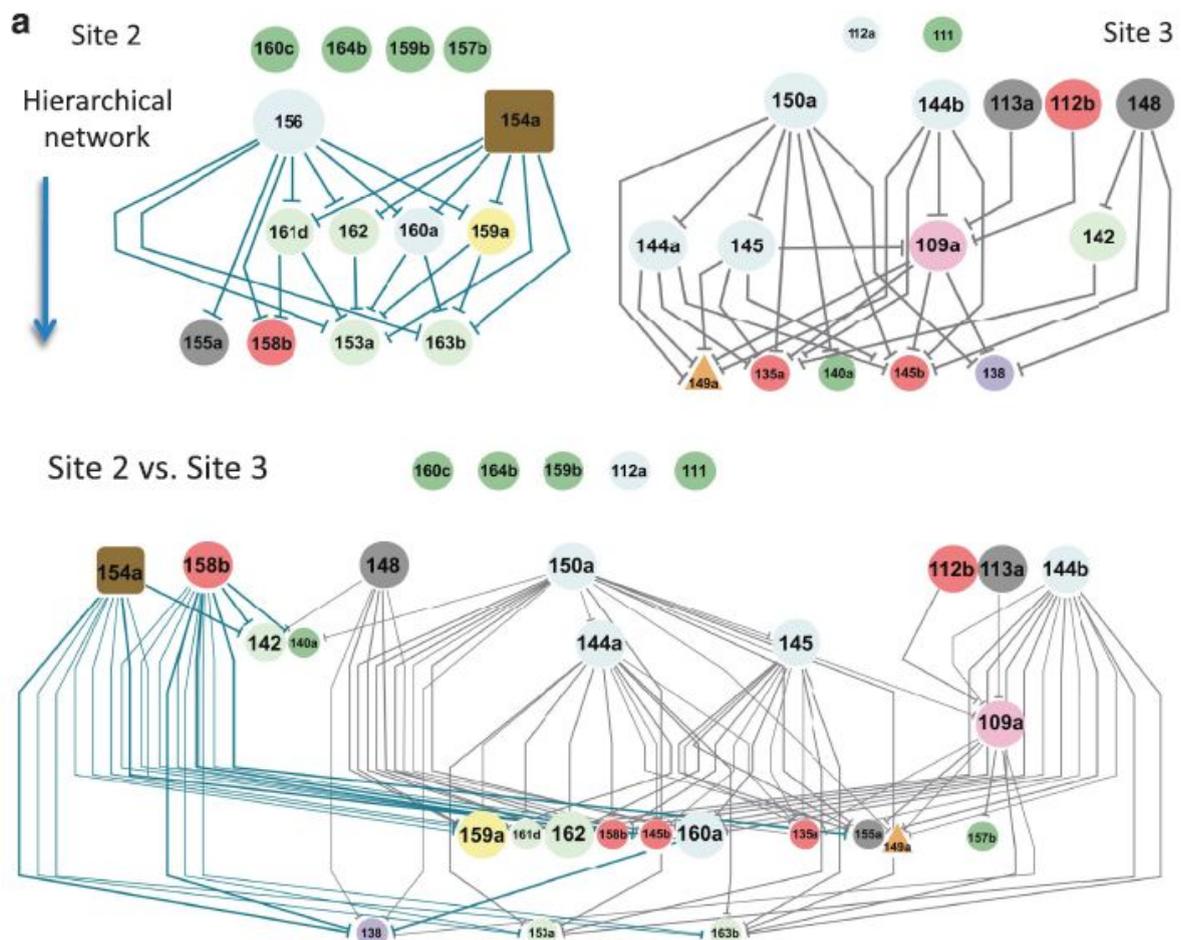


Figura 1.3. Red de antagonismo dentro de los sitios y a través de los sitios. La figura muestra redes de interacciones antagónicas aisladas de dos sitios distintos (2 y 3) en el sistema Churince en Cuatrociénegas, Coahuila, la jerarquía está basada en el grado de antagonismo, el color de los símbolos representan el grupo taxonómico al que pertenecen los aislados y el tamaño el nivel de antagonismo, las líneas representan la existencia de antagonismo entre los aislados. La red de abajo muestra las redes de interacción entre sitios (2 vs 3) en la cual las interacciones antagónicas aumentan (tomado de Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2013).

En estas redes se muestra como diferentes grupos taxonómicos juegan roles ecológicos específicos dentro de cada sitio. Las confrontaciones se realizaron para cada sitio y además se realizaron a través de sitios para observar cómo cambiaban

las redes de antagonismo. Lo observado al confrontar bacterias de diferentes sitios fue que las interacciones antagónicas aumentaron (Fig 1.3.), dicho aumento en el antagonismo entre sitios contrasta con lo reportado por Kinkel *et al.* (2014) en *Streptomyces* donde las interacciones antagónicas se favorecen entre bacterias del mismo sitio.

Zapién-Campos *et al.* (2015) de igual forma demuestra como la estructura tiene una gran influencia sobre el ensamblaje. Mediante simulaciones con un autómatas celular alimentadas por datos experimentales de las 78 cepas de *Bacillus spp.* de Pérez-Gutiérrez *et al.* (2013) se demostró como en un ambiente estructurado y bajo condiciones controladas la comunidad compuesta por los 78 aislados mantiene su diversidad y asegura la supervivencia de todos los aislados a pesar del antagonismo mostrado por algunos de los aislados. La supervivencia de las cepas más sensibles e incapaces de antagonizar se debe a la formación de “parches bacterianos” (secciones o manchas). En dichos parches la cepa sensible se rodea de una especie resistente al antagonismo e incapaz de antagonizar, la cual la protege generando una barrera contra el antagonismo. En este caso la presencia de las cepas resistentes, las cuales se creía no interaccionaban de manera importante en las redes de interacciones, representan una parte importante del ensamblaje de la comunidad y de su mantenimiento. Este resultado mantiene cierta relación con lo publicado por Kelsic *et al.* (2015) donde demuestran que especies resistentes pueden tener un papel de estabilizadoras en interacciones antagonistas.

1.5 Ecología sintética

Como se mencionó anteriormente la complejidad en comunidades bacterianas es inmensa y el tratar de abordar todas las variables puede ser complicado en un experimento debido a la cantidad de datos que se pueden llegar a generar. Es por eso que en trabajos como este se busca acotar esas variables y hacer experimentos que permitan generar los datos suficientes para entender estos sistemas tan complejos y así ampliar este tipo de proyectos a sistemas más robustos. Debido a la complejidad del estudio de sistemas biológicos en la actualidad, campos de la ciencia como la biología sintética han tenido un gran auge en los últimos años enfocándose principalmente al estudio y desarrollo de circuitos genéticos (Sprinzak & Elowitz, 2005). La biología sintética al enfocarse únicamente a nivel genético deja de lado sistemas más complejos como lo son las comunidades microbianas, por eso en los últimos años se han desarrollado estudios de lo que se le ha llamado ecología sintética, cuyo objetivo es el estudio de microorganismos y sus interacciones dentro de una comunidad (Shou *et al.* 2007; Fredrickson, 2014; Großkopf & Soyer, 2014; Escalante *et al.*, 2015; Kelsic *et al.*, 2015; Dolinsek *et al.*, 2016; Johns *et al.*, 2016; Zomorodi & Segrè, 2016).

Mientras que la biología sintética se enfoca en la construcción de circuitos genéticos utilizando genes como bloques de construcción, la ecología sintética utiliza una mezcla de especies para formar un sistema ecológico sintético, el cual obliga a las especies dentro de la mezcla a interactuar y en algunos casos a cooperar, dichos sistemas sintéticos se utilizan como base para el estudio de sistemas mucho más robustos. Dentro de lo que es la ecología sintética de microorganismos se trata del diseño, construcción y entendimiento de consorcios microbianos sintéticos (Dunham, 2007).

La ecología sintética ha sido alimentada por el gran avance de la biología sintética la cual nos ha permitido tener un entendimiento mucho mayor de microorganismos que ahora somos capaces de controlar e incluso programar para nuestro beneficio. Este avance a generado diversas aplicaciones para estos microorganismos (Khalil & Collins, 2010), es por esta razón que se han utilizado para buscar entender sistemas complejos. La ecología sintética puede enfocarse para la construcción de comunidades sintéticas que nos permitan un mayor entendimiento de lo que sucede cuando diversos microorganismos interactúan juntos en una comunidad.

1.5.1 Comunidades sintéticas

Las comunidades microbianas tienen una influencia crucial en distintas clases de procesos, desde procesos biogeoquímicos, influencia sobre la salud de plantas y animales por la transformación de nutrientes, hasta procesos biotecnológicos, sin embargo el entendimiento de las interacciones que median el ensamblaje de estas comunidades aún es escaso. La falta de información crítica es en muchos casos consecuencia de la complejidad de dichas comunidades, ya que el estudio de sistemas tan complejos implica tomar en cuenta una gran cantidad de variables y, de igual forma hay que agregar la dificultad del aislamiento o identificación de cada uno de los miembros de la comunidad. El uso de nuevas tecnologías como lo son la genómica y la transcriptómica, así como nuevos enfoques como la biología y ecología sintética nos pueden permitir un mejor entendimiento de las comunidades microbianas así como el de sus interacciones lo cual nos puede ayudar a encontrar respuestas a preguntas a las cuales antes no teníamos acceso.

La microbiología en recientes años ha utilizado este enfoque para el diseño de comunidades bacterianas sintéticas, que permitan el estudio de fenómenos altamente complejos bajo condiciones más controladas. El establecimiento de comunidades sintéticas puede hacerse bajo distintas condiciones, en algunos casos pueden ser comunidades donde coexistan combinaciones inusuales de especies silvestres, que en la naturaleza no estarían coexistiendo, o por el contrario la modificación de bacterias para crear ecosistemas artificiales. Tal vez una de las ventajas más grandes de la ecología sintética es la posibilidad de utilizar propiedades inherentes de una comunidad para poder diseñar comunidades sintéticas que realicen tareas que una sola especie es incapaz de realizar. En muchos casos estas propiedades más que ser aprovechadas son evitadas, propiedades de las comunidades como la diversidad, competencia, división de labores y la interdependencia obligada pueden ser usadas como herramientas para el estudio de comunidades (Zomorodi & Segrè, 2015).

Las propiedades emergentes de una comunidad están fuertemente influenciadas por las interacciones entre bacterias pertenecientes a estas comunidades. Dichas interacciones tienen un papel fundamental en cómo se estructuran las comunidades, la dinámica que siguen en el tiempo, así como un papel fundamental en el mantenimiento de la diversidad (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2013; Wright & Vetsigian, 2016). Las interacciones en las comunidades están fuertemente influenciadas por la presencia de compuestos difusibles en el medio, así como por el contacto directo entre células (Ryan & Dow, 2008; Keller Surette, 2006; Faust & Raes, 2012; Dubey & Ben-Yehuda, 2011; Pande *et al.*, 2015).

Como se mencionó antes existen diferentes estrategias para el diseño de estas comunidades artificiales y el principal criterio para seleccionar dicha estrategia es el entender la pregunta científica que se busca contestar o el fin o producto que se piensa obtener. Tomando en cuenta esto se pueden diseñar comunidades sintéticas con diversos fines las cuales pueden contestar preguntas como el impacto de las interacciones y factores ambientales en la evolución, dinámica y preservación de las comunidades.

Una de las estrategias para el establecimiento de comunidades sintéticas es el cocultivo de especies silvestres en un ambiente que asemeja las condiciones que pudieran encontrarse en la naturaleza. Con este tipo de estrategias se estudia normalmente la interacción de bacterias que son capaces de dividir labores, por ejemplo bacterias sulfato reductoras que utilizan lactato como única fuente de carbono y lo convierten en acetato o formato que es utilizado por otra especie metanogénica que sería incapaz de utilizar el lactato como fuente de carbono (Schink, 1997). Otra de las estrategias más usadas es la modificación genética de bacterias para inducir una interacción entre ellas, un ejemplo básico de este tipo de ensayos es cuando se modifica una bacteria para que sea capaz de producir el aminoácido esencial para otra especie incapaz de producirlo (Wintermute & Silver, 2010) o el diseño de una red de piedra-papel-tijeras donde una bacteria es capaz de producir un antibiótico que es capaz de inhibir a una segunda especie y ésta a su vez inhibe a una tercera que es capaz de inhibir a la primera ($A > B > C > A$) y donde cada una es diseñada para resistir a los otros dos antibióticos (Kerr *et al.*, 2002). La inducción de interacción por medio del quorum sensing o alguna molécula de señalización de igual forma se ha utilizado para el diseño de comunidades sintéticas y otros como los modelos de perturbación, en los cuales se cambian las condiciones para inducir una interacción o un cambio en ellas (Zomorodi & Segrè, 2015).

Objetivo

Evaluar la respuesta a la interacción antagónica en una comunidad sintética de tres especies de *Bacillus* en una dinámica con diferentes contextos.

Específicos

- Diseñar un comunidad sintética de *Bacillus* de comunidades de sedimento de Cuatrociénegas Coahuila con cepas de distintas especies, fenotipos distinguibles y distintos roles de antagonismo, sensibilidad y resistencia.
- Evaluar los fenotipos en el contexto de la comunidad sintética mediante una dinámica temporal de muerte celular.
- Medir la respuesta transcripcional de la cepa sensible en diferentes contextos de interacción.

Metodología

2.1 Selección de cepas

Las cepas que se emplearon en este trabajo se seleccionaron de entre 78 cepas que fueron aisladas de cinco comunidades de sedimentos del sistema de agua de Churince en Cuatrociénegas, México (Pérez-Gutiérrez, R. A. et al., 2013). En este trabajo se buscó seleccionar tres cepas que cumplieran tres criterios: 1) Tener distintos roles en una red de interacciones: resistente y no antagonista; resistente y antagonista; no resistente y antagonista (Figura 2.1). 2) Tener fenotipos coloniales distinguibles para su seguimiento por plaqueo, y 3) Ser genéticamente distintos (distintas especies) para poder identificar la procedencia de los genes expresados en un análisis transcriptómico.

Para la selección se procedió a la realización de ensayos de antagonismo, utilizando cinco cepas: 43 (*B. subtilis*); 112 (*B. subtilis*); 145 (*B. pumilus*); 111 (*B. cereus*); 20a (*B. horikoshii*). Para cada una de las cepas se realizaron ensayos donde una de las cepas se colocaba como tapete bacteriano dentro del agar y posteriormente se colocaron gotas del cultivo de las otras sobre el tapete para ver halos de inhibición. Los tapetes bacterianos se realizaron con cultivos en fase estacionaria los cuales fueron crecidos en medio marino líquido (MM-L) a 28° C con agitación constante.

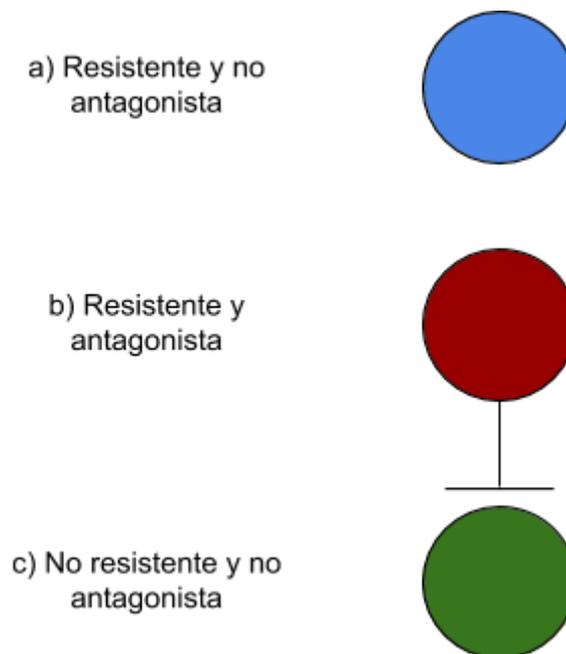


Figura 2.1 Fenotipos a seleccionar. Los fenotipos que se seleccionaron respetan las siguientes interacciones, donde encontramos tres fenotipos, el a) resistente, b) antagonista y c) sensible o antagonizada.

Los tapetes bacterianos se realizaron adicionando 5 ml del cultivo en fase estacionaria a 100 ml de medio marino con agar (MM-A) justo antes de solidificarse. El medio se vertió en placas petri de 90x15 mm. Al tapete bacteriano ya sólido se le inoculó una gota de 5 μ l de los cultivos que se buscaban probar como antagonistas. Las placas se incubaron a 28° C por 72 horas. A las 72 horas se determinó el antagonismo por medio de la formación de halos de inhibición alrededor de las colonias de las cepas a interaccionar.

Las cepas se seleccionaron no solo en base a su antagonismo, sino que se consideró que dichas interacciones fueran reproducibles, los fenotipos de las cepas también fueron un factor importante para la selección ya que se buscaron fenotipos claramente diferenciables entre ellos en una placa petri, esto para su diferenciación durante las interacciones y la cuantificación de UFC. Las tres cepas seleccionadas fueron: 111 (*Bacillus cereus*), 145 (*Bacillus pumilus*) y 20a (*Bacillus horikoshii*).

2.2 Dinámica temporal de muerte celular

2.2.1 Cinéticas de crecimiento y estandarización de las interacciones

Para explorar la dinámica de las interacciones entre bacterias con diferentes roles en una red de interacciones se realizaron ensayos de confrontación entre ellas. Como primer paso para determinar dicha dinámica se realizaron las cinéticas de crecimiento, de las tres cepas seleccionadas. Estas cinéticas se realizaron en MM-L en matraces nefelométricos con fondo bafleado con 30 ml de medio. La cinética se inició con un inóculo de 100 μ l de un cultivo de la cepa en fase estacionaria, el crecimiento se realizó a 28° C en agitación constante y se midió la absorbancia del cultivo cada hora en el equipo colorimétrico Klett-Summerson.

Para estandarizar la cantidad de cada cepa durante la interacción se realizó una curva de calibración para cada una de ellas, mediante una cinética de crecimiento en donde cada hora se midió la absorbancia en el equipo Klett-Summerson. De igual forma se tomaron 100 μ l de cultivo de los cuales se realizaron diluciones que posteriormente se plaquearon en MM-S (Fig 2.2). Las placas inoculadas de MM-S se incubaron a 28° C durante 48 horas y al final de estas se cuantificaron unidades formadoras de colonias (UFC). La absorbancia de la cinética de crecimiento se correlacionó con las UFC y se realizó una curva de calibración.

2.2.2 Ensayos de confrontación

Para determinar la dinámica temporal de muerte celular se realizaron ensayos de confrontación entre las cepas. Para dichos ensayos se realizaron por pares en todas las combinaciones posibles y una interacción triple. Para los ensayos de confrontación, al igual que para las cinéticas de crecimiento se utilizó un preinóculo en fase estacionaria inoculando 100 μl del cultivo en 30 ml de MM-L en matraces nefelométricos con fondo bafleado la cinética se llevó hasta el inicio de la fase exponencial donde se alcanzó una cantidad de 8×10^8 UFC/ml, 2×10^8 UFC/ml y 1.5×10^9 UFC/ml; para la cepa antagonista, resistente y sensible respectivamente. Cuando las cepas alcanzaron estas UFC/ml se procedió al ensayo de confrontación donde en pares y un triplete se pusieron a interactuar en un tubo Falcon estéril de 50 ml donde la proporción de los cultivos fue distinta como se indica en la Tabla 2.1 esto para todas las combinaciones, además del cultivo de las cepas se aforó con MM-L para que el volumen de todas interacciones fuera igual.

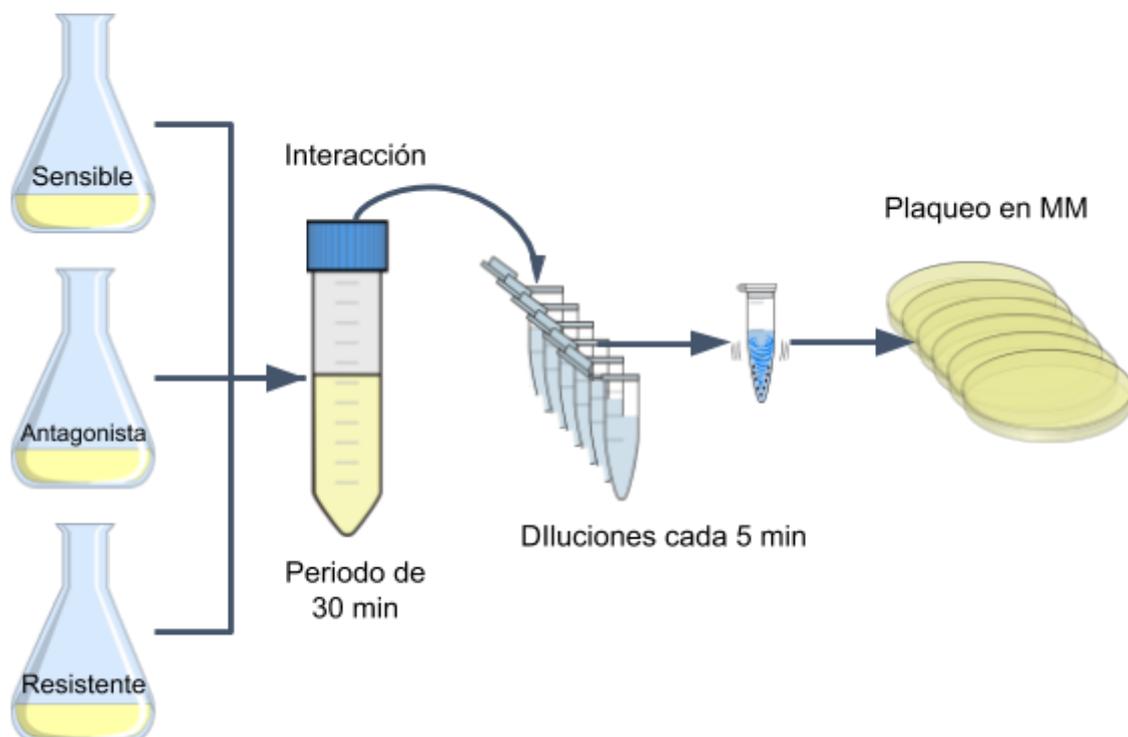


Figura 2.2 Metodología general de los ensayos de interacción. En la figura se muestra la metodología general con la cual se realizaron los ensayos de interacción, donde se parte de un cultivo individual y posteriormente se realiza con confrontación en tubos Falcon por un periodo de 30 minutos, durante este periodo se fueron tomando muestras cada 5 minutos para el plaqueo y la posterior cuantificación de UFC.

La interacción se realizó en un periodo de 30 minutos, donde cada 5 minutos se tomaron 100 µl de muestra de los cuales se realizaron diluciones y se plaquearon en MM-S. Las placas se incubaron a 28 °C durante 48 horas, y después de este periodo se procedió al conteo de las UFC para determinar las dinámicas de las interacciones.

Tabla 2.1 Proporción de las cepas en interacción. En los ensayos de interacción ya sea en pares o triple la proporción de las cepas es distinta, tomando como medida las UFC se determinó la proporción (en volumen) de cada cepa en la interacción.

Interacción	UFC totales 20a	UFC totales 145	UFC totales 111
Sensible vs Antagonista	3,4x10 ¹⁰	3,25x10 ⁹	-
Sensible vs Resistente	3,4x10 ¹⁰	-	8,4x10 ⁸
Antagonista vs Resistente	-	3,25x10 ⁹	8,4x10 ⁸
Triple	3,4x10 ¹⁰	3,25x10 ⁹	8,4x10 ⁸

Para estos ensayos se realizaron controles en los cuales las cepas se colocaron de manera individual en el tubo estéril de 50 ml durante el mismo periodo de tiempo y se aforó con MM-L para alcanzar el volumen de las interacciones.

Después de observar los resultados de la interacción entre la cepa sensible y antagonista, se realizó un ensayo de interacción en el cual al final de los 30 minutos que dura el ensayo original se le agregó nuevamente la misma cantidad de la cepa sensible con la que inició el ensayo (3,4x10¹⁰) y se continuó con el ensayo 35 minutos más. Como en los ensayos anteriores se tomó muestra cada 5 minutos para realizar diluciones y plaquear en placas de medio marino, estas se incubaron a 28 °C durante 48 horas, y de igual forma que en los ensayos anteriores se realizó el respectivo conteo de UFC.

Con el fin de observar el efecto de la especie resistente sobre la interacción antagónica se diseñó una variación de los experimentos iniciales de antagonismo. En estos ensayos se colocaba una gota del inóculo de la cepa a probar el antagonismo sobre un tapete de la cepa a probar como antagonizada, se colocó una segunda gota de la cepa resistente a apenas medio centímetro de la antagonista esto en un tapete de la cepa sensible, para observar si la presencia de la cepa resistente evita la formación del halo de inhibición lo cual sugeriría una posible degradación del compuesto antagonista.

2.2.3 Autómata celular

Con los datos generados con los ensayos de antagonismo y las cinéticas de crecimiento se realizó un ensayo de autómata celular (AC) con las tres cepas utilizadas en dichos experimentos. Los datos que alimentaban este autómata eran la velocidad de crecimiento obtenida de la cinética de crecimiento, capacidad de carga obtenida a partir de la fase estacionaria de la cinética de crecimiento, la red de antagonismo obtenida de los ensayos de antagonismo. Se realizaron distintas simulaciones del autómata celular, y la diferencia entre las simulaciones fue en el cambio de tres variables principalmente: si existe agitación en la simulación o no (estructura espacial), probabilidad de muerte extrínseca (muerte por factores no bióticos) y la proporción inicial de cada cepa dentro del autómata. Cada simulación se corrió en una matriz de 100 x 100, la cual simula una superficie de un sedimento. Las simulaciones comenzaban con el 75 % de las celdas ocupadas por la población inicial y el 25% restante era para permitirles duplicarse y expandirse dependiendo de su vecindario. En cada simulación se realizaron 500 pasos o iteraciones en las cuales existían tres escenarios posibles: que la célula se duplicara, que fuera antagonizada o no pasara nada (Fig 2.3).

En total se realizaron 48 simulaciones distintas, con las variaciones antes explicadas. De dichas simulaciones se obtuvieron gráficas que se asemejan a diagramas de calor, y los gráficos permitieron evaluar los escenarios durante los pasos de la simulación y cómo las dinámicas y proporciones de las bacterias cambiaron en el tiempo. En particular se evaluaron los últimos pasos o iteraciones de cada simulación o la interacción donde se llegó al equilibrio.

Cualquier celda sobre la cuadrícula del AC tiene únicamente 8 vecinos directos, y de acuerdo a las reglas de iteración del sistema, una vez que nos ubicamos en una celda específica sólo se elige uno de sus vecinos directos para interactuar. En este sentido, los estados iniciales posibles y sus estados finales asociados se muestran en la Figura 2.3. Tomando como referencia una bacteria A, podemos clasificar los eventos que ocurren en función del resultado para esta bacteria como: benéficos, no-benéficos e indiferentes. A su vez éstos pueden agruparse en dependientes de la Matriz de Interacción y dependientes de probabilidades. Tres eventos son dependientes de la Matriz de Interacción: Antagonismo Ejercido (ae), Antagonismo Recibido (ar) y Antagonismo Nulo (an), y sólo dos son benéficos para incrementar la población: beneficio directo (antagonismo ejercido) y beneficio indirecto (antagonismo nulo).

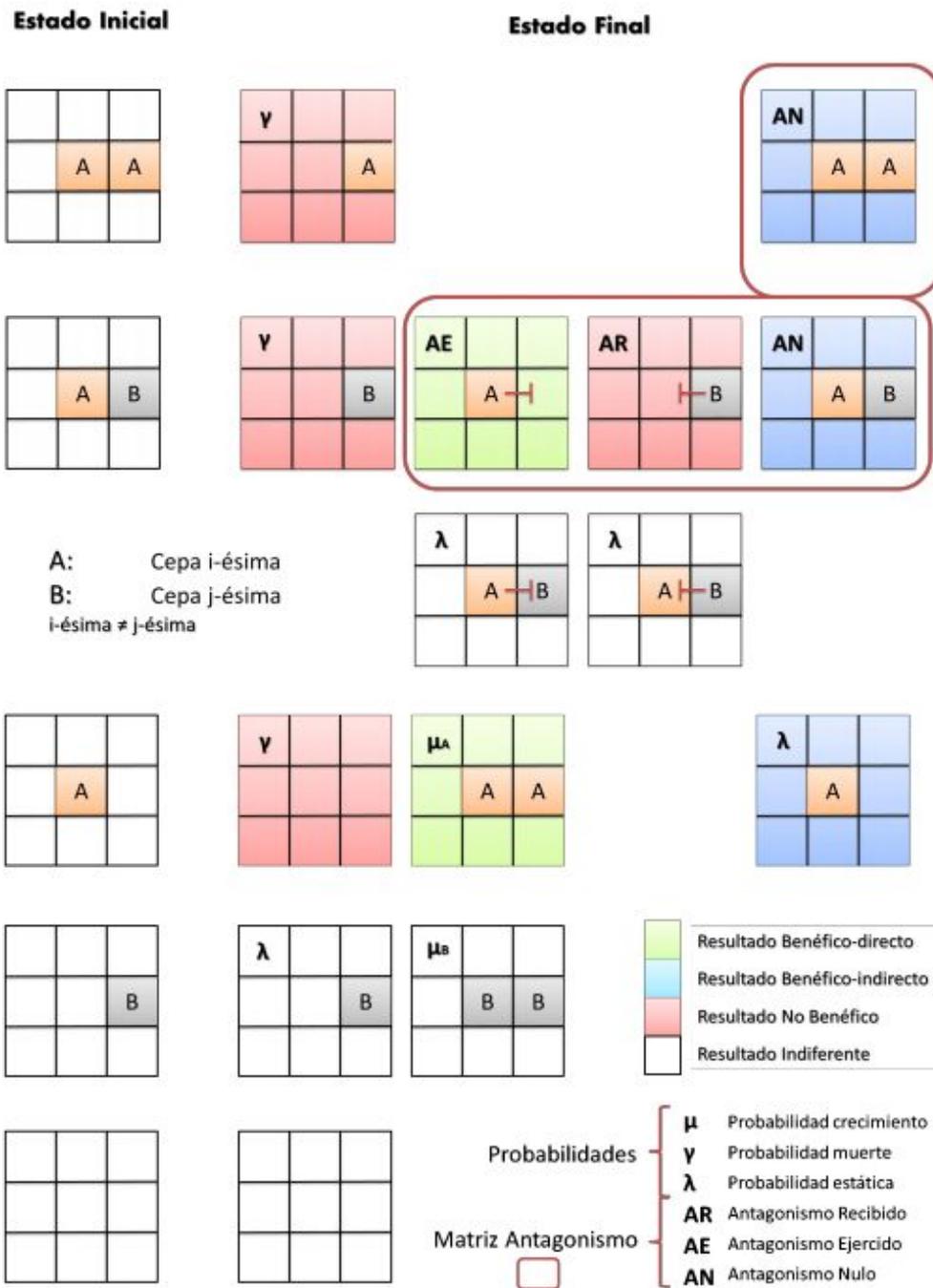


Figura 2.3 Eventos que pueden ocurrir sobre la superficie del autómata con base al estado inicial. Los eventos posibles dentro del autómata son la probabilidad de crecimiento, muerte o estática, los cuales resultan en condiciones benéficas-directas, benéficas-indirecta, no benéficas e indiferente.

2.3 Análisis transcriptómico

2.3.1 Diseño experimental, extracción y secuenciación

Para observar la respuesta a una confrontación a nivel de expresión en una interacción bacteriana se realizó un análisis transcriptómico. Se llevaron a cabo interacciones y se cuantificaron como ya fue descrito, eligiendo para el análisis transcripcional las interacciones que mostraron un fenotipo contrastante en la dinámica. En este caso fueron la interacción entre la cepa antagonista contra la sensible y la interacción triple, ya que estos son los fenotipos más contrastantes en relación con la cepa sensible. Para la extracción del RNA de las cepas durante la interacción, primeramente se realizó un ensayo de interacción igual que el utilizado para determinar la dinámica temporal de muerte celular. La metodología que se siguió para estos ensayos fue la descrita anteriormente la cual solo se modificó al momento de tomar la muestra, ya que en este caso no se hicieron diluciones. Se tomaron 1.5 ml de muestras de la interacción la cual se centrifugó para sólo conservar la pastilla la cual se congeló en nitrógeno líquido. Al igual que en los ensayos de interacción se tomó muestra en distintos tiempos del ensayo, y en este caso los tiempos fueron: 0 y 5 minutos, esto para buscar una respuesta inmediata a la interacción. Para cada cepa se realizó un control en el cual se colocó la cepa sin estar en interacción en el tubo simulando el ensayo de interacción y se tomaron muestras por los mismos tiempos. Posterior a la toma de muestra se procedió a la extracción del RNA total.

Para la extracción del RNA total se utilizó el kit The MasterPure™ (Epicentre ®) RNA Purification Kit del cual se siguieron las indicaciones del manual proporcionado por el proveedor. Dicho protocolo de extracción consta de tres pasos principales, en el primero se lisaron las células que se encontraban en el paquete celular congelado esto con la utilización de Proteinasa K, posteriormente se realizó la precipitación de los ácidos nucleicos totales empleando primero el reactivo de precipitación de proteínas MPC para precipitar las proteínas y separarlas de los ácidos nucleicos luego utilizando isopropanol para precipitar los ácidos nucleicos, y por último se utilizó DNasa para eliminar el DNA de las muestras.

Después de la extracción se obtuvo RNA total el cual fue tratado para eliminar gran parte del rRNA el cual constituye cerca del 85 - 90 % del RNA total. Para eliminación del rRNA se utilizó el kit MICROBExpress™ (Ambion ®) el cual está diseñado para la remoción del rRNA 16S y 23S con la utilización de un método de hibridación por captura. Para la utilización del kit MICROBExpress™ se siguió el protocolo descrito

en el manual proporcionado por el proveedor. Para remover el rRNA el RNA total se incubó con una mezcla de oligonucleótidos de captura y un buffer de unión durante 15 minutos. Posteriormente se agregan perlas magnéticas las cuales contienen un oligonucleótido que hibrida con el oligonucleótido de captura, y esta mezcla se incubó por 15 minutos. Las perlas magnéticas con RNAs 16S y 23S unidos se removieron utilizando un imán. El RNA al cual se le removió el rRNA se colocó en un nuevo tubo. Las perlas magnéticas se lavaron brevemente, y finalmente el RNA se precipitó con etanol. El RNA resultante contenía mRNA, tRNA, rRNA 5S y algunos RNAs pequeños.

Después de la remoción del rRNA las muestras se mandaron a los Servicios Genómicos de LANGE BIO donde se prepararon las librerías a partir del mRNA y se realizó la secuenciación utilizando la plataforma de Secuenciación por Síntesis (SBS), con el sistema NextSeq 500 1 x 75 alto rendimiento de Illumina. El transcriptoma de las cepas en interacción y sus respectivos controles (sin interacción), se realizaron por duplicado y la extracción de dichas muestras se realizó en dos lotes distintos (Tabla 2.2).

Tabla 2.2 Diseño experimental de los transcriptomas. El diseño experimental de los transcriptomas abarcó la secuenciación de las bacterias sin interacción (controles) y las combinaciones de las interacción, el símbolo + significa cada una de las réplicas que se realizaron.

Interacción/Tiempo	0 min	5 min
Sensible	++	++
Antagonista	++	++
Resistente	++	++
Sensible vs Antagonista	++	++
Triple	++	++

2.3.2 Análisis del RNA-Seq

Después de la secuenciación se obtuvieron lecturas correspondientes al RNA de las cepas ya sea individuales o en interacción, las cuales se analizaron mediante el uso de distintos tipos de software. Para el análisis de los transcriptomas se utilizaron los software mencionados en la Tabla 2.3 con su respectiva versión y referencia. Los distintos tipos de software se emplearon para el análisis del control de calidad, la

eliminación de adaptadores, el mapeo, conteo de los transcritos y en análisis de los mismos.

Tabla 2.3 Lista de software utilizado para el análisis de los transcriptomas. En la lista se encuentran mencionados los distintos tipos de software empleados para el análisis de las lecturas obtenidas en la secuenciación.

Software	Versión	Referencia
FastQC	v0.11.6	(Andrews <i>et al.</i> 2010)
MultiQC	v1.2	(Ewels <i>et al.</i> 2016)
Trimmomatic	0.36	(Bolger <i>et al.</i> 2014)
samtools	v1.4	(Li <i>et al.</i> 2009)
HISAT2	2.1.0	(Kim <i>et al.</i> 2015)
Python (HTSeq)	0.9.1	(Anders <i>et al.</i> 2015)
R	3.4.1	(R Development Core Team 2008)

2.3.2.1 Control de calidad y eliminación de adaptadores

El control de calidad de los transcriptomas se realizó con FastQC y MultiQC, que nos permitió determinar el contenido de GC, el tamaño de las lecturas obtenidas, así como detectar la presencia de adaptadores. MultiQC nos permite analizar más de una muestra a la vez, de ese modo se analizaron las muestras juntas. Para la eliminación de los adaptadores se utilizó Trimmomatic; para eliminarlos se obtuvo la secuencia de los adaptadores utilizados y con Trimmomatic estas secuencias fueron buscadas dentro de las lecturas para después eliminarlas.

2.3.2.2 Mapeo

El genoma de las tres cepas utilizadas en este trabajo fue previamente secuenciado en el laboratorio así que el mapeo se realizó en base al genoma de referencia (Zarza *et al.*, 2017; Zarza *et al.*, 2018). El mapeo nos permitió ubicar los transcritos obtenidos de la secuenciación en alguna de las regiones codificantes del genoma o rRNA/tRNA. Para el mapeo se utilizó HISAT2 el cual es un algoritmo de mapeo para RNA-seq que permitió el alineamiento de cada una de las lecturas contra un genoma de referencia. El mapeo se realizó contra el genoma de referencia, en el caso de los controles, contra un genoma doble en el caso de la interacción entre

sensible y antagonista y contra un genoma triple para la interacción entre las tres cepas. Para el mapeo de igual forma se necesitó un índice el cual indica las coordenadas de los genomas por lo que dichos índices de igual forma se elaboraron para las tres cepas y el índice doble y triple. Ya que el RNA-seq se realizó con muestras que contenían RNA de más de una especie, saber diferenciar entre lecturas pertenecientes a cada cepa era primordial, por lo que se realizaron pruebas para tratar de que los transcritos únicamente mapearan contra su genoma correspondiente. En dichas pruebas los transcritos ya mapeados a cada uno de los cepas se volvieron a mapear contra las cepas que no les corresponden y así verificar si que los transcritos mapeaban únicamente con su cepa correspondiente. Los archivos resultantes del mapeo fueron tres: uno correspondiente a las regiones codificantes (CDS), otro a los rRNAs y el último a los tRNAs. Dichos archivos se obtuvieron en formato SAM el cual fue utilizado posteriormente para el conteo de los transcritos, mientras que para los análisis posteriores solo se utilizaron los mapeos de CDS. En el caso de la interacción entre la cepa antagonista y sensible, y la triple el archivo del mapeo incluyó el mapeo de dos y tres cepas respectivamente.

2.3.2.3 Conteo de transcritos

Para realizar el conteo de cuántos transcritos corresponden a cada gen o región del genoma se utilizó HTSeq. El conteo de los transcritos se realizó utilizando el archivo SAM que resultó del mapeo de HISAT2 y un archivo GFF de anotación. El genoma se había anotado previamente por medio del servidor de RAST el cual permite una anotación basada en los subsistemas de genomas de bacterias o arqueas (Aziz *et al.* 2008) y mediante EggNOG, el cual provee una anotación basada en la anotación funcional de grupos ortólogos de proteínas (Huertas-Cepas *et al.* 2016). El conteo de los transcritos generó una matriz con los IDs de los genes en la primera columna y con el número de los transcritos contados del gen en la segunda columna; estos conteos se analizaron para obtener el nivel de expresión. Ya que el mapeo de la interacción entre antagonista y sensible, y de la interacción triple tenían genomas dobles y triples respectivamente de igual forma la matriz de los conteos tenían los conteos de más de una especie, en este caso como los genomas de referencia e índices con más de un genoma se elaboraron con un orden específico, no fue complicado separar las matrices de conteos utilizando los IDs de los genes.

2.3.2.4 Análisis de expresión diferencial

El análisis de expresión diferencial se realizó con la paquetería edgeR de R (Love *et al.* 2014). Para el análisis se utilizaron los conteos obtenidos con HTSeq. Primero se eliminaron los genes con baja expresión, se convirtieron los conteos a conteos por

millón (CPM) y se realizó una normalización de los datos por medio de la transformación voom (Law *et al.*, 2014).

De los contrastes posibles se eligió enfocarse en la especie sensible (20a), los contrastes fueron los siguientes:

- **Antagonismo:** Especie sensible antagonizada por la presencia de la especie antagonista a los 0 y 5 minutos de la interacción comparada contra la cepa sensible sin interacción a los 0 y 5 minutos (control).
- **Coexistencia:** Especie sensible que no es antagonizada en la interacción triple a los 0 y 5 minutos de la interacción comparada contra la cepa sensible sin interacción a los 0 y 5 minutos (control).
- **Antagonismo vs coexistencia:** Especie sensible antagonizada por la presencias de la especie antagonista a los 0 y 5 minutos de la interacción comparada contra la especie sensible que no es antagonizada en la interacción triple a los 0 y 5 minutos de la interacción.

Para la búsqueda de expresión diferencial se utilizó la prueba de “Modelo lineal para datos de microarreglos” (Ritchie *et al.*, 2015). Para identificar los genes con expresión diferencial se utilizó una tasa de falsos descubrimientos menor a 0.05 (FDR < 0.05).

Resultados

3.1 Selección de cepas

Se seleccionaron las cepas que se emplearon en este proyecto comenzando por los resultados de los ensayos de antagonismo. Como se menciona en la metodología los ensayos se realizaron en MM sólido donde se buscaba observar halos de inhibición y así se determinaba el antagonismo. Se hicieron tapetes bacterianos para las cinco cepas a evaluar y se probaron contra las mismas cinco cepas. En el caso del tapete de la cepa 111 (*Bacillus cereus*) no se observó antagonismo por parte de ninguna de las cepas, al igual que para el tapete de 43 (*Bacillus subtilis*); en el tapete de 145 (*Bacillus pumilus*) tampoco se observó antagonismo salvo un ligero antagonismo por parte de la cepa 43 (*B. subtilis*); en el tapete de 112 (*B. pumilus*) se observó antagonismo únicamente por parte de 145, y la cepa que fue más antagonizada fue 20a (*Bacillus horikoshii*) la cual era antagonizada por las cepas 145, 112 y 43.

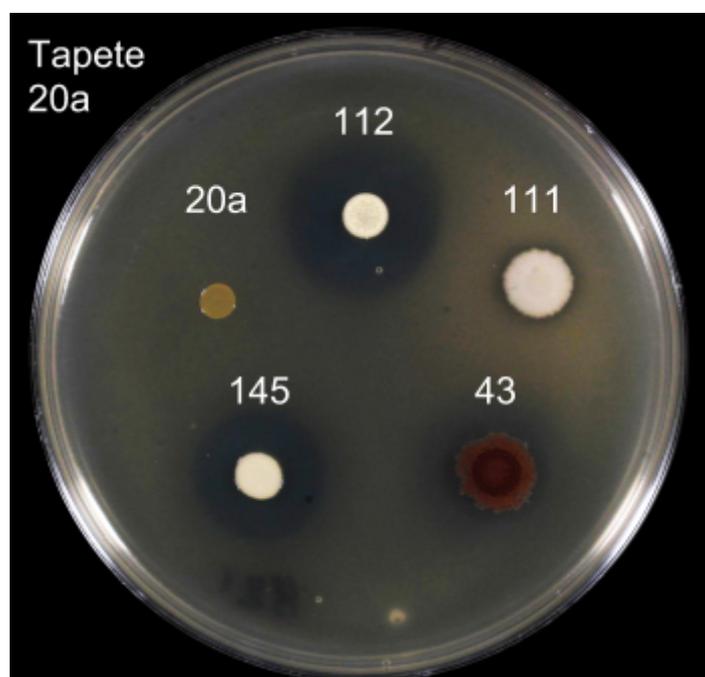


Figura 3.1 Ensayos de antagonismo en Medio Marino con la cepa 20a (*B. horikoshii*) como tapete. Con la formación de halos de inhibición se determinó el antagonismo por parte de las cepas 112, 145 y 43, de igual forma en la placa se observó cómo 111 no antagoniza a la cepa 20a.

En la Figura 3.1 se muestra la interacción de las cepas sobre un tapete de la cepa 20a donde se observa el claro antagonismo de tres cepas, entre éstas destaca la 112 y la 145, además se observa cómo 111 no tiene el mismo efecto negativo sobre el crecimiento del tapete. Se seleccionaron las cepas que cumplieron los roles en la red de interacciones antes propuesta: 111 (*B. cereus*) resistente y no antagonista; 145 (*B. pumilus*) resistente y antagonista; 20a (*B. horikoshii*) sensible y no antagonista.

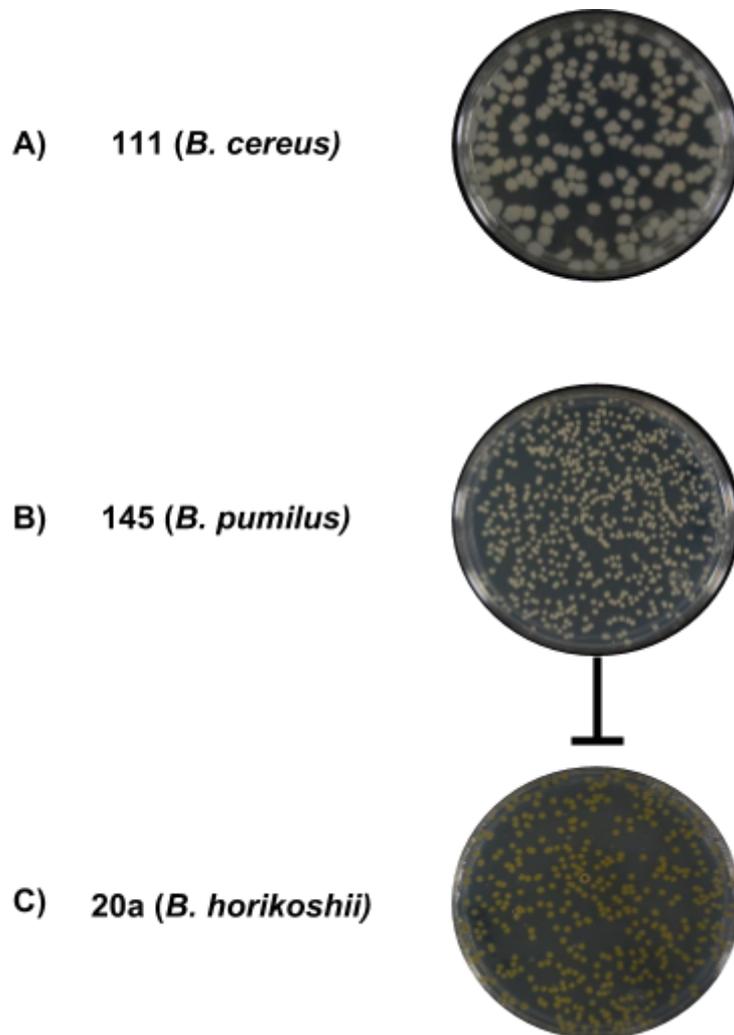


Figura 3.2 Fenotipos coloniales de las cepas seleccionada. Las tres cepas seleccionadas muestran diferentes morfologías coloniales lo cual permite su diferenciación en un co-cultivo en placa.

Como se muestra en la Figura 3.2 las cepas seleccionadas pertenecen a distintas especies de *Bacillus*, y además sus colonias tienen distinto color y morfología. La cepa 111 forma grandes colonias blancas opacas con bordes irregulares, la cepa 145 forma colonias pequeñas blancas y brillantes, y la cepa 20a forma colonias pequeñas y amarillas. Esos distintos fenotipos de las colonias sobre el medio MM-S

nos permitió la diferenciación y la cuantificación de las colonias durante los ensayos de interacción.

3.2 Cinéticas de crecimiento y curvas de calibración

Las cepas ya seleccionadas fueron caracterizadas con base en su dinámica de crecimiento ya sea en monocultivo o co-cultivo. El primer paso para determinarla fue la realización de cinéticas de crecimiento donde se observó una clara diferencia entre las curvas de las tres cepas, así como en las absorbancias que alcanzaban en la fase estacionaria. Aunque las cepas pertenecen al linaje de *Bacillus* las tres tienen velocidades de crecimiento distintas ya que la cepa 145 es la que le toma un menor tiempo llegar a su fase estacionaria, pues su fase lag fue más corta, por el contrario 111 y 20a tuvieron una fase lag mas larga (Figura 3.3). La fase lag es generalmente la menos reproducible pues depende del estado fisiológico del inóculo utilizado. Cabe resaltar que 111 tiene una fase lag muy larga la cual se compensa con su fase exponencial a la que llega rápidamente y que es más corta lo cual le da una pendiente más inclinada (es más rápido su crecimiento que el de las otras dos), además de que esta cepa es la que alcanza una mayor absorbancia.

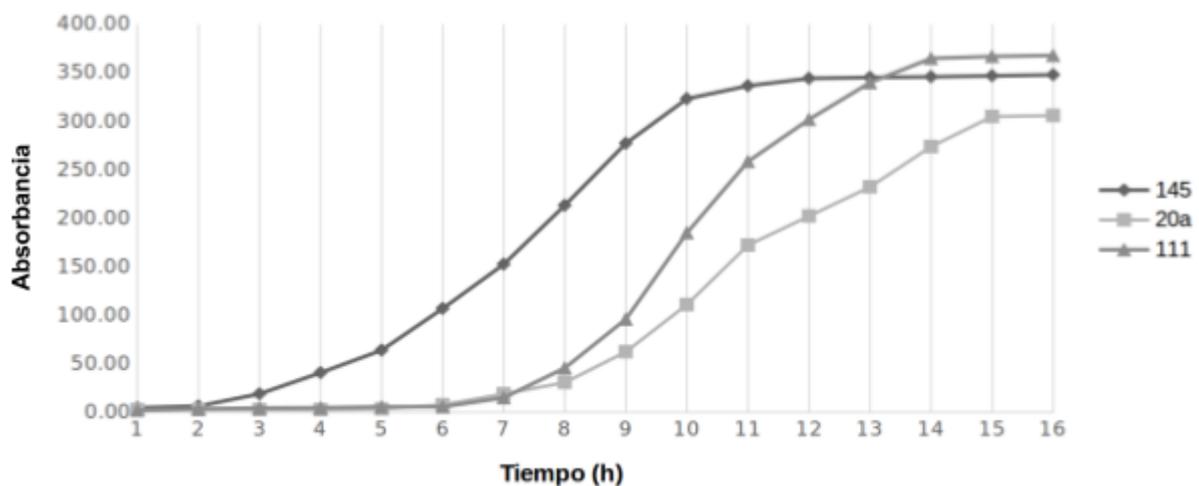


Figura 3.3 Cinéticas de crecimiento. Las cepas muestran una curva claramente distinta entre ellas, la cepa 145 es la primera en llegar a la fase estacionaria, sin embargo 111 es la que alcanza una absorbancia mayor, por otra parte 20a muestra la absorbancia más baja en su fase estacionaria y es la que tarda más en alcanzar esta fase.

Posterior a las cinéticas de crecimiento se buscó la comparación de los datos de las cinéticas (absorbancia) contra datos de UFC, para determinar de manera más precisa cuáles serían las proporciones de bacterias que se inocularían durante los ensayos de interacción. Para esto se realizaron las curvas de calibración para las lecturas de las absorbancias y saber cuántas UFC había por mL durante cada punto

de la cinética. Como se observa en la Figura 3.4, que muestra la curva de calibración de la cepa 145 se observa la correlación que se esperaba entre las UFC y la absorbancia, ya que ambas aumentan de forma lineal a excepción de una ligera variación en algunos puntos de la curva, lo cual se observó en las tres cepas.

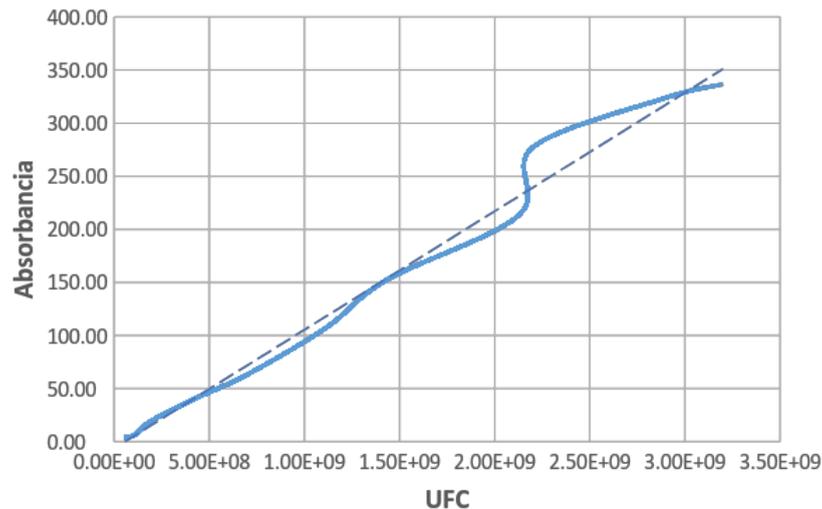


Figura 3.4 Curva de calibración de la cepa 145. Los conteos de las UFC de cada punto de la cinética muestran una relación lineal con la absorbancia, a pesar de la ligera variación se considera que los datos de absorbancia nos pueden dar un aproximado de las UFC que se obtendrían en ese punto de la cinética.

Los datos obtenidos con las curvas de calibración nos permiten considerar que la absorbancia en la fase exponencial nos puede indicar un aproximado de las UFC que las cepas pueden tener en ese punto de la curva de crecimiento. De esta forma se determinaron las proporciones que se inocularon de cada cepa para los ensayos de interacción. En base a las cinéticas y a las curvas de calibración se determinó usar la fase exponencial de las cepas para las interacciones ya que en esta fase es cuando existe una mayor tasa de duplicación y una menor muerte extrínseca.

3.3 Dinámica temporal de muerte celular

Los ensayos de interacción revelaron la dinámica que siguieron las cepas cuando se confrontaron a un competidor. Como se describió en el apartado 3.2 de Metodología, se realizaron interacciones en pares usando las tres combinaciones y una interacción triple. Los datos que se tomaron para la determinación de la dinámica fueron los conteos de las UFC/ml de las interacciones durante un periodo de 30 minutos.

En la interacción de la cepa 20a (sensible) y la cepa 145 (antagonista) se observó algo que ya se había reportado tanto en trabajos previos como en los experimentos

de antagonismo, y es que la cepa 145 tuvo un efecto de antagonismo sobre la 20a lo que propició un decremento en sus conteos de UFC en el tiempo que duró la interacción.

Durante los ensayos se observó un claro antagonismo por parte de la cepa 145, y en estas pruebas de interacción de igual forma se observó mostrando una importante reducción de las UCF durante los primeros 5 minutos (Figura 3.5) de la interacción cayendo hasta un orden de magnitud. Para la cepa 20a se comenzó el ensayo con casi diez veces más UFC/mL que para la cepa 145, y aun así fue suficiente para que la gran parte de la población fuera antagonizada de acuerdo al conteo de UFC.

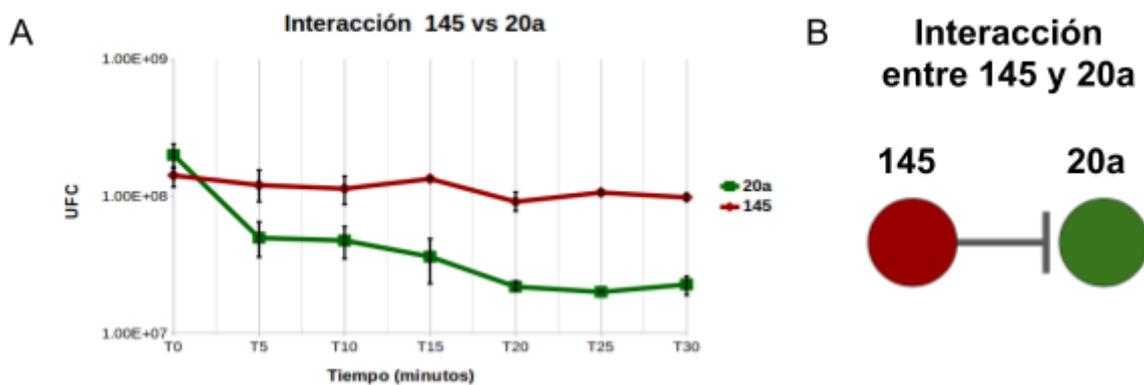


Figura 3.5 Interacción entre las cepas 145 y 20a. (A) Las UFC nos muestran una clara reducción de la cepa 20a durante la interacción con 145, aunque esta reducción se ve atenuada hacia el final de la interacción. **(B)** La interacción de 145 con 20a se muestra como un claro antagonismo hacia esta última.

Aunque la reducción más grande de UFC de las células de 20a fue durante los primeros 5 minutos, las UFC de esta cepa continuaron disminuyendo aunque en una proporción menor, y entre los 20 y 30 minutos el conteo de UFC de la cepa se estabilizó. La cepa 145 fue ligeramente afectada por la interacción ya que sus UFC disminuyeron ligeramente, la razón de esto no es clara aún, tal vez no sea significativo.

3.3.1 Cambio en el contexto, cambio en la dinámica

Cuando se realizó el ensayo de interacción con las tres cepas se observó un resultado que hasta cierto punto fue inesperado, ya que cuando las tres cepas se encuentran juntas no parece existir un antagonismo sobre la cepa 20a, o al menos eso es lo que refleja el conteo de UFC. Las UFC de las tres cepas parecen tener una ligera variación, pero en ninguna de las tres se observa una disminución de las

UFC en especial en la cepa 20a donde se mantiene con la mayor proporción durante toda la interacción (Figura 3.6). La cepa 111 tuvo un efecto sobre el antagonismo que se ejercía antes sobre 20a, dicho antagonismo fue bloqueado o atenuado durante los 30 minutos que duró la interacción en especial en los primeros 5 minutos tiempo en el que se había observado la reducción más importante de la cepa 20a en la interacción con 145. El mecanismo de esta atenuación del antagonismo por lo pronto es desconocido pero se buscará posteriormente trabajar en dilucidar en qué consiste.

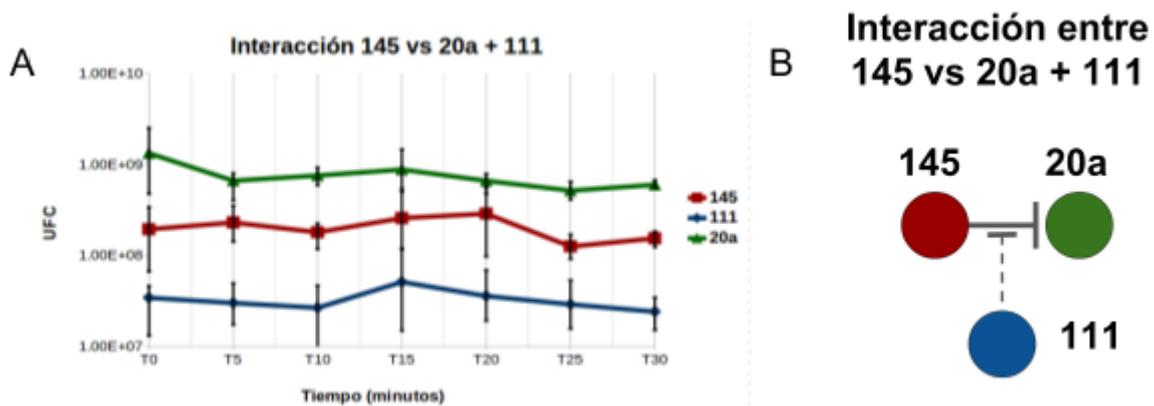


Figura 3.6 Interacción triple. (A) El conteo de UFC de la cepa 20a no se reduce en la interacción con la cepa 145 cuando también se agrega la cepa 111, **(B)** la cepa 111 parece atenuar o bloquear el antagonismo que recibe la cepa 20a por parte de la antagonista.

La interacción entre 20a y 111 resultó en un conteo donde ninguna de las dos cepas se vio mermada en sus UFC ya que se mantuvieron las mismas UFC durante todo el periodo del ensayo, esto de igual forma ya se había observado en los ensayos de antagonismo, donde no había ningún tipo de halo de inhibición entre estas dos cepas. De igual forma el ensayo entre 145 y 111 mostró una interacción que podría llamarse neutral, ya que ninguna vio afectadas sus UFC durante todo el experimento (Figura 3.7).

Además del conteo de las UFC de las placas en las cuales se inocularon las interacciones se tomó evidencia fotográfica de cada placa, esto para observar la dinámica del crecimiento colonial en placa, así como para buscar patrones en el crecimiento de las cepas en un co-cultivo. En las placas donde se inoculó la interacción entre 20a y 145 se observó una morfología colonial variable entre las colonias de 20a ya que las colonias que crecían cerca de las de 145 se veían afectadas en su tamaño, forma e incluso coloración, esto sucedía incluso aunque las colonias no estaban una junto a la otra, lo que hace suponer que es un compuesto difusible de la cepa 145 el que causa el antagonismo sobre 20a. Las

colonias que si alcanzaban su morfología normal eran las que se encontraban alejadas de las colonias de 145, formando una especie de parche de colonias de 20a como se muestra en el panel A de la Figura 3.7. Por otra parte, en el panel B de la Figura 3.7 se observa como las colonias de las cepas 20a y 111 no tienen problema con crecer en la misma placa, incluso pueden crecer una sobre la otra y no parece afectar su morfología colonial.

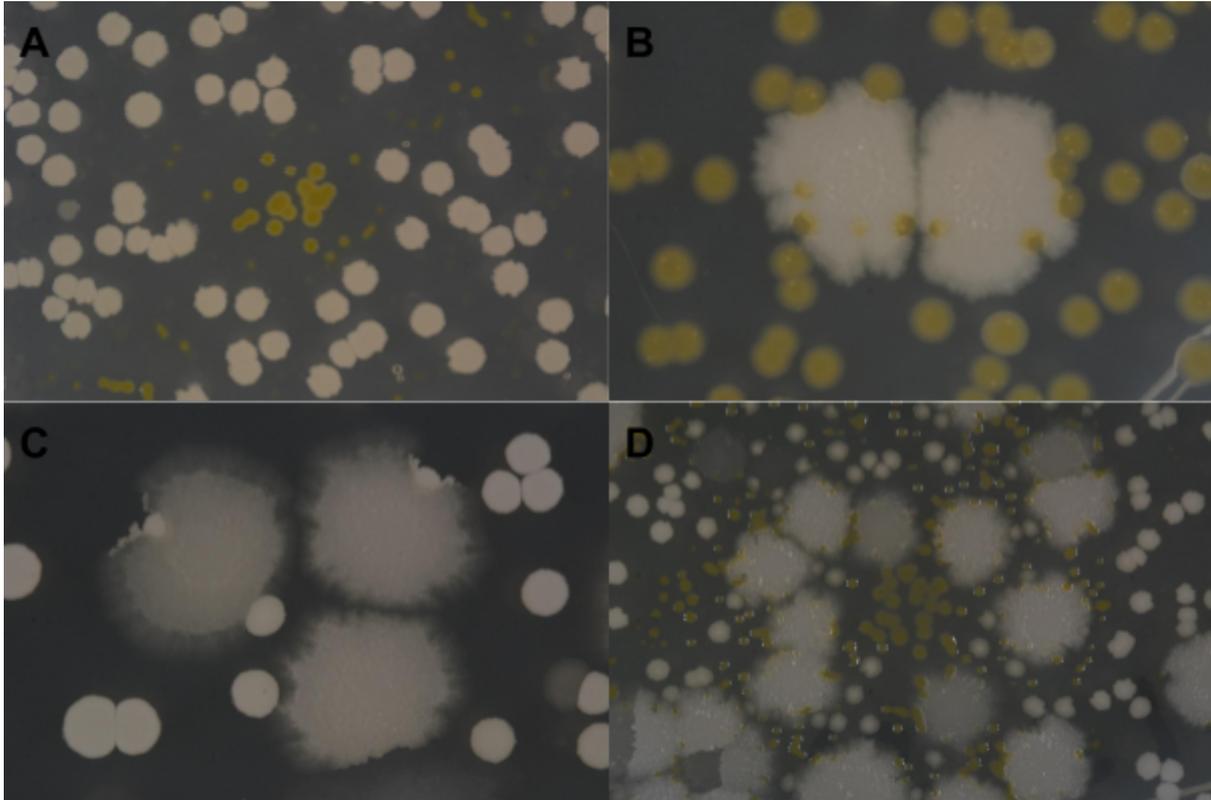


Figura 3.7 Interacciones de las cepas en placa. (A) En el panel A se muestra la interacción de la cepa 20a (colonia naranja) y la 145 (colonia blanca) donde se observa una abundancia de colonias pertenecientes a 145 y algunas colonias de 20a de las cuales las más cercanas a las colonias de la antagonista son apenas visibles y muestran lisis, (B) por otro lado la interacción de 111 con 20a es una interacción donde no se presenta antagonismo ya que estas pueden crecer prácticamente una sobre la otra (C) al igual que la interacción entre 145 y 111 aunque en esta interacción parece que las colonias de las cepas evitan el contacto entre ellas al rodearse, (D) finalmente la interacción triple muestra varios escenarios algunos donde la cepa 20a está cerca de 145 y por ende sus colonias son pequeñas y muestran lisis y por otro lado 111 formando una clase de barrera de colonias la cual aísla a 20a de 145 lo cual permite una formación de colonias de tamaño normal y sin lisis aparente.

Para la interacción entre 145 y 111 no se observó ningún efecto de antagonismo entre las cepas, sin embargo cuando las colonias entraban en contacto aparentaban evitarse y más bien se rodeaban, a diferencia de la interacción entre 20a y 111 donde podían crecer una junto a la otra. Por último, la interacción triple muestra los patrones más interesantes ya que se observan diferentes escenarios entre ellos la formación de parches bacterianos donde la cepa 111 rodea a las colonias de 20a

evita en esas zonas el contacto con la 145 y permite que crezca de manera normal. Por otro lado las colonias de 20a que se encontraron cerca de las de 145 muestran un fenotipo de colonia más pequeña y con clara lisis alrededor de ella. Cabe resaltar que la formación de estos parches bacterianos es meramente atribuible al azar, al acomodo de las colonias en un espacio físico durante el plaqueo en el cual crecen o no y en menor o mayor grado, dependiendo de la vecindad de las cepas a su alrededor, así que no puede considerarse como un comportamiento o mecanismo de defensa contra el antagonismo, aunque existen trabajos donde se describe más a fondo este fenómeno, esto se abordará más adelante en la discusión de resultados.

Con el fin de determinar si la estabilización alcanzada a los 30 min era debido a que la propia cepa 20a se estabilizaba tras su ajuste fenotípico, o bien, el medio era modificado por la presencia de la cepa 111, se decidió añadir la cepa 20a nuevamente a los 30 minutos de interacción. En el ensayo donde se realizó una re-inoculación a los 30 minutos de la cepa 20a (sensible) durante la interacción de 20a y 145 se observó como al agregar nuevamente la cepa sensible este nuevo inóculo de 20a ya no era antagonizado por 145. Desde los 35 minutos se tomó muestra de la interacción y se plaqueo hasta los 65 minutos, durante estos 35 minutos extra se observa como las UFC de 20a ya no bajan y se asemejan a la proporción inicial de la interacción (Figura 3.7).

20a vs 145 agregando 20a después de 30 minutos de interacción

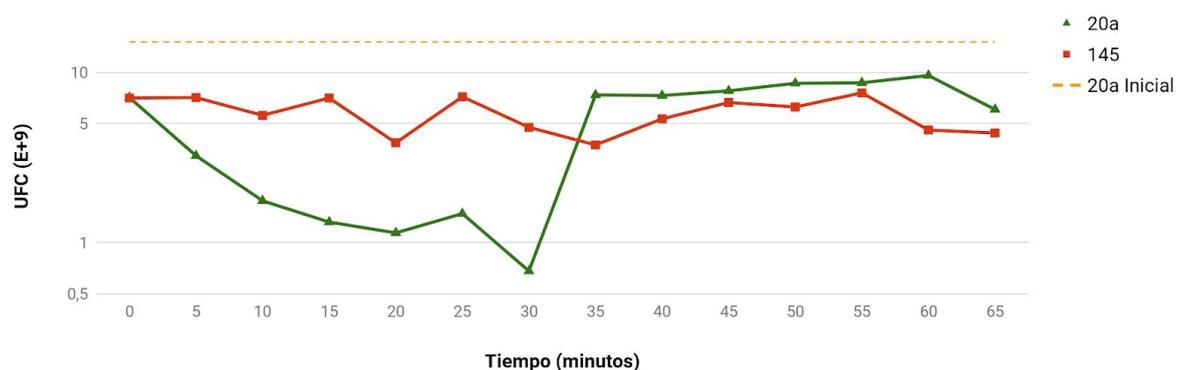


Figura 3.7 Cambio en la dinámica al re-inocular la cantidad inicial de 20a. Al agregar la proporción inicial de 20a pasados los 30 minutos de la interacción ya no se observa el antagonismo observado sobre esta cepa como cuando la interacción comienza.

Por lo observado en el experimento y en los ensayos anteriores parece que el antagonismo sobre 20a se reduce alrededor de los 20 minutos de interacción y en este caso al agregar de nuevo el inóculo inicial de la cepa 20a este nuevo inóculo ya no es antagonizado. Se puede hipotetizar que la estabilización no es a causa de una respuesta de la cepa sensible lo cual permite al nuevo inóculo sobrevivir desde el

inicio, sino a una “limpieza” del medio. Tal vez es la cepa 145 la que deja de ser antagonista o la 111 la que inactiva la sustancia antagonista. Sin embargo, estos resultados aún son preliminares y son necesarias más pruebas para corroborar cualquiera de las hipótesis.

Por otra parte, se realizó un ensayo de proximidad para probar si la presencia de la cepa 111 afectaba el antagonismo de la cepa 145 sobre la cepa 20a. El ensayo de interacción se realizó en medio marino sólido donde se colocó un tapete de 20a en el cual se inocularon una gota de 145 y otra de 111, una al lado de la otra. La presencia de 111 no evita que el halo de inhibición se forme en el tapete de 20a. El resultado sugiere que en medio semisólido la cepa 111 no es capaz de evitar el antagonismo de la cepa 145 sobre la 20a por proximidad. Esto podría explicarse si el efecto estabilizador de 111 requiere un contacto célula a célula como potencialmente podría estar ocurriendo en el ensayo líquido, o al menos en un medio donde el compuesto antagonista de 145 no esté tan concentrado en el mismo sitio. Este resultado es en realidad similar al observado al plaquear la interacción triple. La presencia de las colonias de la 111 no hace que la cepa 20a forme colonias de mayor tamaño cerca de colonias de la 145. Cualquiera que sea el mecanismo de protección de la 111 no parece difundirse en medio semisólido.

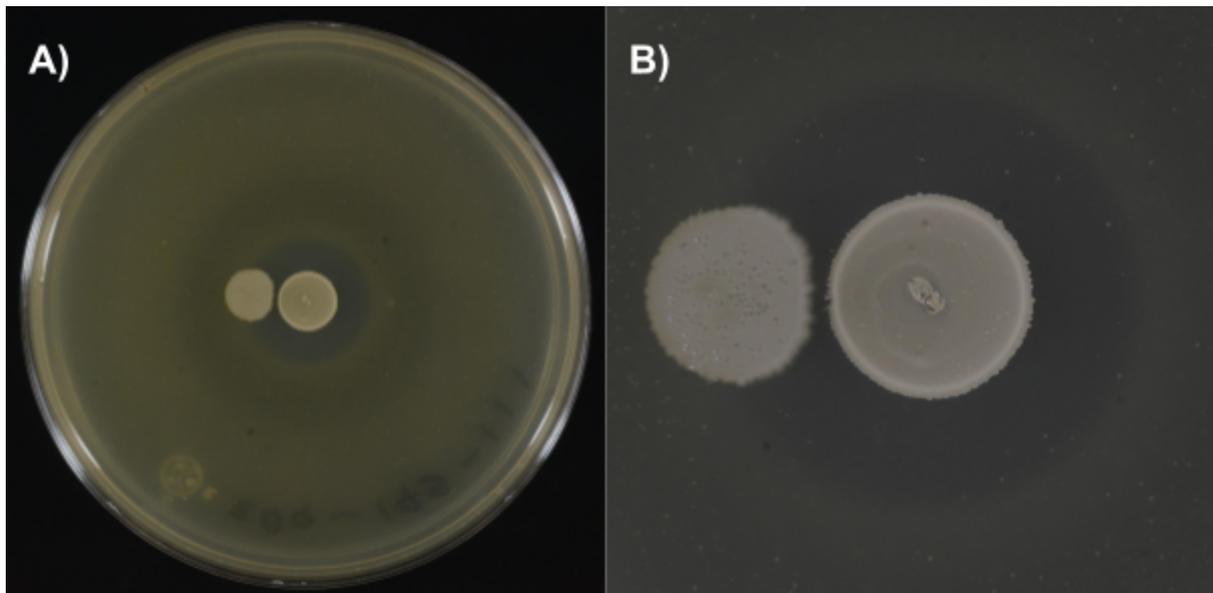


Figura 3.8 La presencia de la especie resistente no evita la formación del halo de inhibición por parte de 145 en un tapete de 20a. (A) Aunque 111 se inocule a medio centímetro de 145 en un tapete de 20a el halo de inhibición sigue formándose, **(B)** un acercamiento muestra como la inhibición sigue e incluso el crecimiento de 111 parece ser afectado al acercarse a la colonia de 145.

3.4 Autómata celular

Las simulaciones del autómata celular arrojaron diferentes escenarios, aunque el resultado más recurrente era la extinción de la cepa sensible (20a) con la supervivencia de la especie resistente (111) y antagonista (145), aunque bajo ciertas condiciones la cepa 20a era capaz de sobrevivir a la interacción (Figura 3.9). Para el autómata celular se probaron 48 condiciones distintas, en las simulaciones se cambiaron tres variables principalmente, la proporción inicial de las cepas, si existía la probabilidad de muerte extrínseca (no por antagonismo) y si existe agitación en la matriz. En el caso de las simulaciones donde no exista agitación ni muerte extrínseca, la proporción de la cepa 111 fue crucial para la supervivencia de la 20a, ya que entre más grande era la proporción inicial de 111 mayor era la proporción de 20a que sobrevivía al final de la simulación.

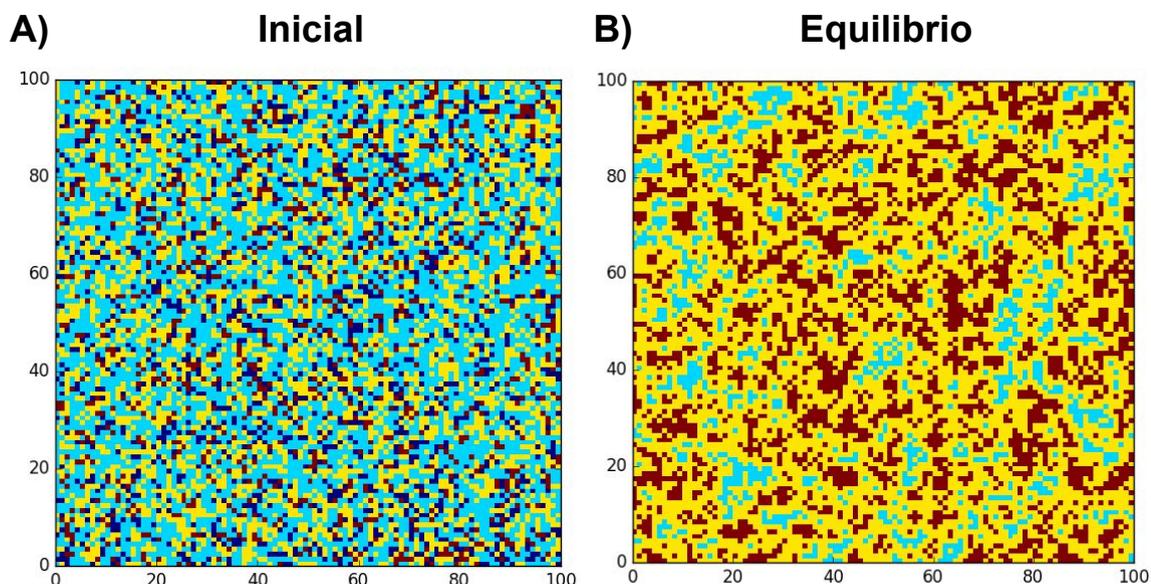


Figura 3.9 Simulación donde se alcanzó un equilibrio entre las tres especies. En el tiempo inicial **(A)** la simulación comenzó con una proporción de 0.55, 0.35 y 0.1 de 20a, 111 y 145 respectivamente, la cantidad de celdas ocupadas en la matriz fue del 75%, las celdas cian, amarillo y rojo, corresponden a la cepa 20a, 111 y 145 respectivamente, las azul marino son las celdas vacías. El equilibrio **(B)** se alcanza cuando la proporción de cada cepa no cambia, en este caso se forman “parches bacterianos” donde la cepa 20a se aísla de 145 gracias a la presencia de 111, en esta simulación no se usó probabilidad por muerte extrínseca ni agitación.

En el caso de las simulaciones en las que se consideró una muerte extrínseca con una probabilidad de 0.01 la supervivencia de la cepa 20a solo se consiguió aumentando la proporción de la 111 y en el caso de que la probabilidad por muerte extrínseca fue de 0.1 en ningún caso sobrevivió la cepa 20a ni con el aumento en la proporción de 111, el factor de la probabilidad de muerte extrínseca así como la

presencia de una cepa antagonista afecta en extremo a la cepa 20a la cual se extingue en la mayoría de los casos. En el caso de simulaciones sin muerte extrínseca, pero con agitación, de igual forma 20a termina extinguiéndose debido a la falta de estructura en la matriz, ya que esto evita la formación de los parches bacterianos que eran capaces de protegerla del antagonismo de la cepa 145 (Figura 3.10).

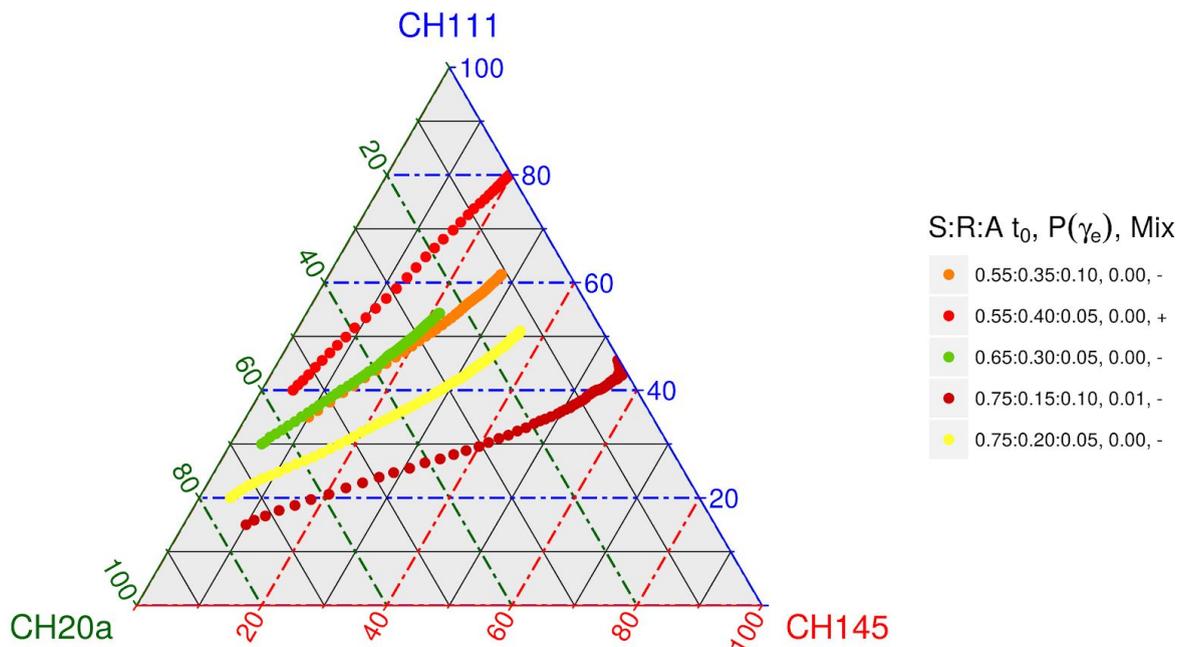


Figura 3.10 Modelo de dinámica de interacciones de tres cepas con diferentes roles. El incremento de la especie resistente y la falta de muerte extrínseca permite el equilibrio. El diagrama de fases muestra la proporción de cada una de las cepas en las cinco simulaciones que se ejemplifican, tres de ellas muestran un equilibrio alcanzado en gran medida a la presencia de la cepa resistente 111, en los otros dos casos donde la cepa 20a se extingue los factores que corresponden a dicha extinción son la presencia de muerte extrínseca (curva color vino) así como la de agitación (curva color rojo).

Cuando se combinó la probabilidad de muerte extrínseca y la agitación fue cuando se observó la extinción más rápida de la especie sensible, ya que muy pronto en las iteraciones se mostró la rápida disminución de 20a, sin importar la proporción con la que inició la interacción. En este caso tampoco interfirió el aumento de la especie resistente ya que de igual forma la extinción en 20a sucedió, lo cual indica que la estructura en este tipo de comunidades juega un papel importante para la supervivencia de ciertas especies.

3.5 Análisis transcriptómico

Como se mencionó en el apartado de metodología para el análisis transcriptómico se utilizaron las interacciones que mostraron los fenotipos más contrastantes sobre la especie sensible (20a). La interacción entre 20a y 145 fue donde se observó un fenotipo de inhibición sobre la 20a, inclusive a los 5 min y al contrario, se observó que en una interacción triple entre 20a, 145 y 111, la cepa 20a ya no era antagonizada.

Primero dentro del análisis se realizó el control de calidad con FastQC y MultiQC donde se mostró la calidad de las lecturas que se obtuvieron. Las lecturas son de una longitud promedio de 71 bp esto ya sin los adaptadores; en este paso de igual forma se corroboró el contenido de GC de cada una de las muestras que resultó de 40, 41 y 34 por ciento para las cepas 20a, 145 y 111 respectivamente, lo cual coincide con los genomas de cada cepa.

3.5.1 Mapeo contra el genoma de referencia y control de calidad del mapeo

Posterior al control de calidad se realizó el mapeo contra los genomas de referencia utilizando el mapeador HISAT2, para el que se utilizaron las lecturas ya sin adaptadores. El total de lecturas mapeadas en referencia al tamaño de la librería por muestra fue de entre el 27 y 55%, de las cuales se dividían en muestras mapeadas a regiones codificantes (CDS), rRNA o tRNA. En total se mapearon 5 muestras, 2 de interacciones y 3 de controles, cada una con su respectivo duplicado, es decir 10 librerías en total. Los resultados del mapeo nos mostraron las lecturas mapeadas a CDS, rRNA y tRNA, las lecturas que se mapearon a dicha región pero no estaban anotadas, las que alineaban con más de un gen, las que mapearon entre dos genes y las que no se mapearon (Figura 3.11). Cabe resaltar que, como se mencionó anteriormente, el mapeo se realizó contra genomas dobles y triple en el caso de las muestras en interacción.

El porcentaje de lecturas mapeadas a regiones codificantes (CDS) fue variable entre las muestras, ya que en algunos casos era mayor en relación a lo mapeado con rRNA y en otros casos inferior, en el caso de los tRNA la proporción fue poco abundante prácticamente despreciable, muchas de las lecturas mapeadas contra el genoma de referencia se encuentran sin anotación en algunos casos con porcentajes de hasta 50%, otro grupo de lecturas importantemente representadas son las que no pudieron ser alineadas y las que se alinearon a más de una región como se observa en la Figura 3.11.

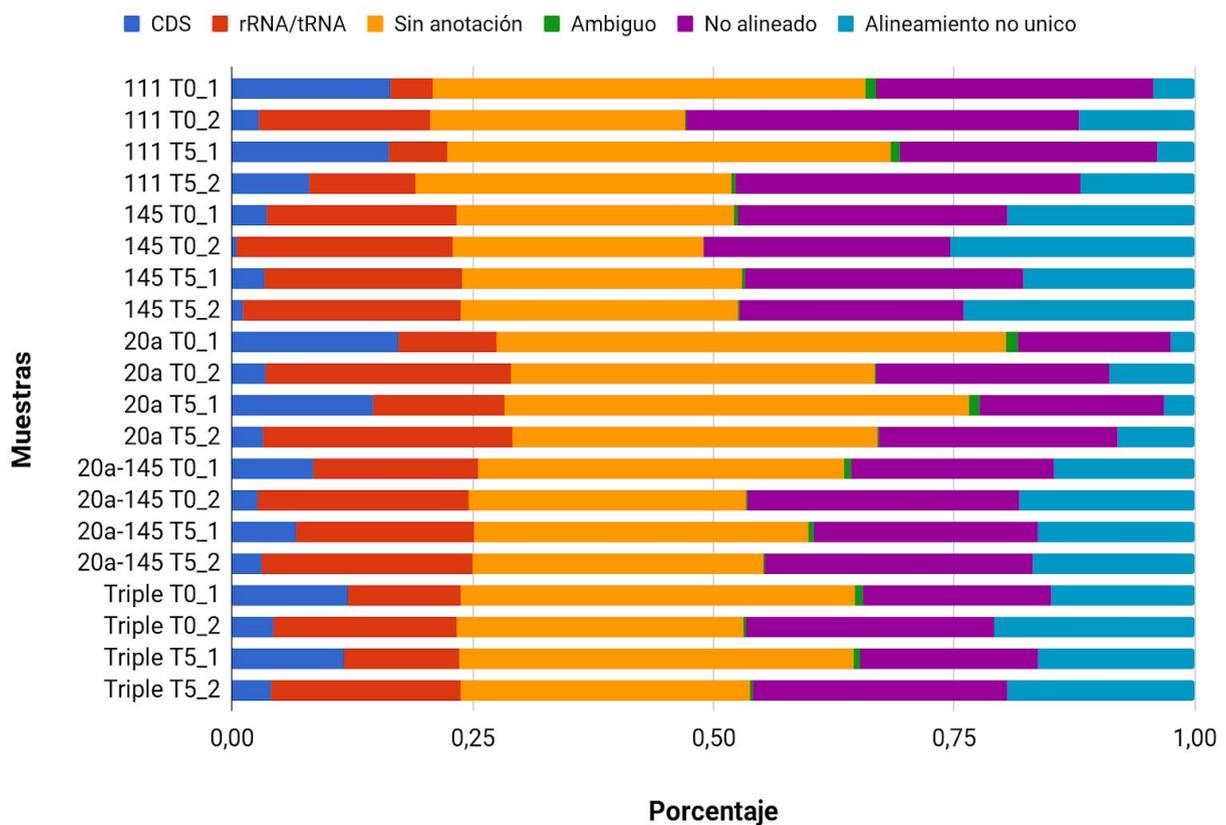


Figura 3.11 Porcentaje de lecturas mapeadas a distintas regiones del genoma. Porcentaje lecturas mapeadas a regiones codificantes (CDS), rRNA y tRNA, así como lecturas que se mapearon a regiones no anotadas, las que tuvieron un mapeo ambiguo, las que se mapearon a más de una región y las lecturas que no se alinearon a ninguna región.

Las muestras con más lecturas mapeadas a regiones codificantes fueron los controles de las cepas 20a y 111, por el contrario de 145 se mapearon muy pocas lecturas a regiones codificantes, esto pudiera ser debido a que es la especie que se coloca en menor proporción tanto en los ensayos de interacción como en los controles. De igual forma se observa un bajo porcentaje de lecturas mapeadas a regiones codificantes en la interacción entre 20a y 145 esto probablemente se deba a la disminución de la población de 20a debido al antagonismo ejercido por 145.

Una prueba posterior al mapeo fue corroborar que el mapeo de las muestras con interacción se mapearon únicamente contra su genoma correspondiente, para esto se tomaron las lecturas de los controles (cepas sin interacción) y se mapearon contra los tres genomas por separado. Lo esperado era observar cómo el porcentaje de lecturas mapeadas al genoma correspondiente era mayor que lo mapeado contra los genomas que no les correspondían, esta manera se tendría mayor certeza de que los mapeos de las muestra con interacción se realizaron correctamente (Tabla 3.1).

Tabla 3.1 Mapeos de la muestras individuales contra los tres genomas individuales. La tabla muestra la proporción de las lecturas de las muestras individuales que se mapearon a los tres genomas por separado.

Lecturas de cepa	Mapeo vs 111	Mapeo vs 145	Mapeo 20a
111 1	1.000	0.004	0.062
111 2	1.000	0.002	0.001
145 1	0.238	1.000	0.148
145 2	0.130	1.000	0.028
20a 1	0.064	0.003	1.000
20a 1	0.002	0.002	1.000

El mapeo contra los tres genomas por separado reveló que las lecturas que se habían mapeado contra los controles no se alineaban contra los genomas que no les correspondían y si lo hacían era en muy baja proporción. En las cepas 111 y 20a el porcentaje de lecturas mapeadas apenas rondaban entre 0.1 y 6%. En el caso de 145 contra los otros dos genomas la proporción aumentó hasta un 23 % contra el genoma de 111 como se observa en la Tabla 3.1, a pesar de esto este porcentaje sigue siendo bajo. El porcentaje de alineamiento tan bajo que tienen las lecturas contra los otros genomas da más seguridad sobre los mapeos de las cepas durante la interacción y que somos capaces de identificar qué lecturas son de cada cepa.

3.5.2 Análisis de expresión diferencial

Posterior al mapeo se realizaron los conteos de las lecturas alineadas a cada gen lo cual arrojó la expresión de cada una de las muestras. El conteo se realizó con HTSeq, el resultado de los conteos se plasmó en una matriz la cual contenía la cantidad de lecturas mapeadas a cada región codificante del genoma. Para los conteos no se utilizaron los rRNAs ni tRNAs. Los conteos de las librerías de las interacciones aún tenían las lecturas de las diferentes cepas juntas y es en este paso donde se separaron, pues ya que el archivo que sirvió de índice (GFF) para estas librerías tenía las coordenadas de los genomas una tras otra fue fácil su separación, únicamente contando la cantidad de regiones codificantes que tenía cada genoma.

Después de separar las muestras se realizó el análisis de expresión diferencial. Para éste se utilizaron las muestras de 20a en interacción con 145 y en la interacción triple, ya que 20a es la cepa que mostró el fenotipo más contrastante

entre dichas interacciones, esto en dos tiempos 0 y 5 minutos, el contraste se realizó entre 20a y su respectiva interacción y tiempo contra 20a en monocultivo en el mismo tiempo. Como primer paso del análisis de expresión diferencial se obtuvo el nivel de expresión general de todas las regiones codificantes de cada condición de 20a. La expresión entre las muestras resultó ser constante entre éstas, y aunque existieron algunos valores atípicos en la expresión de algunas muestras, las muestras son estadísticamente comparables (Figura 3.12).

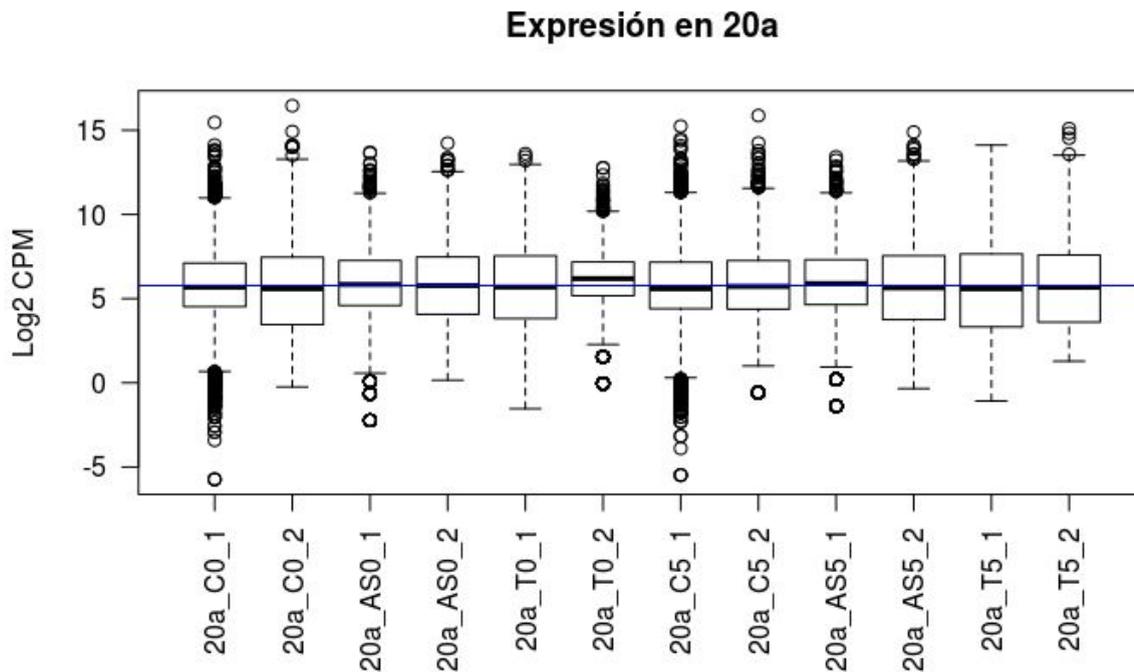


Figura 3.12 Expresión en muestras de la cepa 20a bajo interacción y en monocultivo. En el boxplot se muestran los niveles de expresión de las muestras de la cepa 20a en la interacción con la 145 (AS0 y AS5) y en la interacción triple (T0 y T5), así como en los controles (C0 y C5). Las muestras son de 0 y 5 minutos de interacción.

Los niveles de expresión de estas muestras también se compararon por medio de un análisis de componentes principales (CPA). El gráfico MDS que se realizó con este análisis muestra como existe un agrupamiento de los datos con respecto a la segunda dimensión que corresponde al tipo de interacción. Las muestras que más se agrupan son las correspondientes a la interacción entre 20a y 145 (AS) tanto las muestras del inicio de la interacción (0 minutos) y las de pasados los 5 minutos (Figura 3.13). En el caso de los controles (sin interacción) las muestras de igual forma se agrupaban respecto al tipo de muestra e incluso con respecto al tiempo con excepción de una muestra que estaba ligeramente alejada. Las muestras de 20a en la interacción triple son las que se agrupan menos, en especial una de las muestras. El agrupamiento con respecto a la dimensión 1 no es tan claro lo cual indica que las muestras se agrupan más dependiendo de la interacción que del tiempo del cual se tomó dicha muestra.

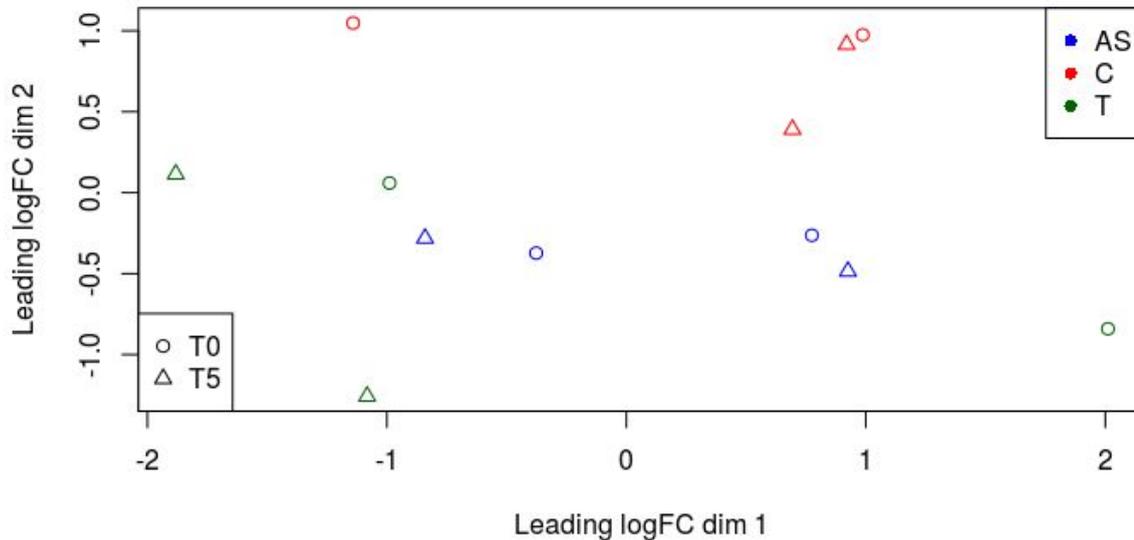


Figura 3.13 Análisis de componentes principales de las muestras de 20a en sus diferentes interacciones y controles. El MDS muestra el agrupamiento de las lecturas de 20a en interacción de 145 (AS), en la interacción triple (T) y sin interacción o controles (C).

Posterior al análisis general de la expresión se procedió a buscar expresión diferencial entre los genes, teniendo como comparaciones principales 20a (junto con 145) - 20a, 20a (en combinación triple) - 20a y 20a (junto a 145) - 20a (triple). Las comparaciones se realizaron en los dos tiempos de la interacción (0 y 5 minutos). Los genes que se consideraron con expresión diferencial fueron los que estaban por debajo de la tasa de falsos descubrimientos ($FDR < 0.05$). El número de genes que resultaron con expresión diferencial en la comparación 20a (con 145) - 20a fueron de 6 y 24, a los 0 y 5 minutos, respectivamente. En ambos casos los genes tuvieron un aumento de expresión y ninguno tuvo una reducción de su expresión (Tabla 3.2).

Tabla 3.2 Genes expresados diferencialmente (GED) en los distintos contrastes. Los contrastes muestran los genes que se expresaron diferencialmente en las comparaciones, los que tuvieron un aumento o disminución en su expresión, así como las librerías involucradas para ese análisis.

Contrastes	GED	Aumento de expresión	Disminución de expresión	Librerías involucradas
20a (vs 145) T0 - 20a T0	6	6	0	20a AS T0 vs 20a Ctrl T0
20a (vs 145) T5 - 20a T5	24	24	0	20a AS T5 vs 20a Ctrl T5
20a (Triple) T0 - 20a T0	0	0	0	20a Tri T0 vs 20a Ctrl T0
20a (Triple) T5 - 20a T5	11	11	0	20a Tri T5 vs 20a Ctrl T5
20a (vs 145) T0 - 20a (Triple) T0	0	0	0	20a AS T0 vs 20a Tri T0
20a (vs 145) T5 - 20a (Triple) T5	0	0	0	20a AS T5 vs 20a Tri T5

En el caso de la comparación entre 20a (Triple) - 20a a los 0 minutos no se obtuvieron genes con expresión diferencial por debajo de la tasas de falso descubrimiento ($FDR < 0.05$) y a los 5 minutos se obtuvieron 11 los cuales también tenían un aumento de expresión. A diferencia de los otros contrastes, en el contraste entre 20a (vs 145) - 20a (Triple) no se determinó que existieran genes con expresión diferencial por debajo de la tasa de falsos descubrimientos ($FDR < 0.05$) (Tabla 3.2).

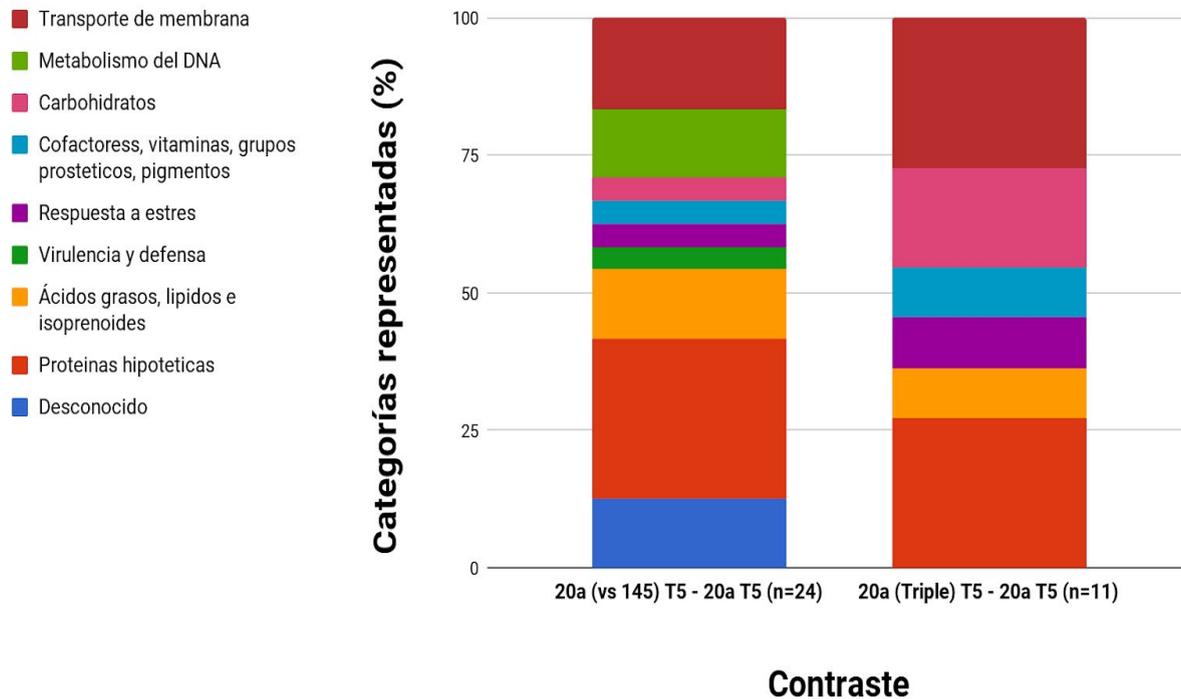


Figura 3.14 Grupos representados de genes con expresión diferencial a los 5 minutos de interacción. En las interacciones de la cepa 20a a los 5 minutos ya sea con 145 y triple existieron 24 y 11 genes expresados diferencialmente respectivamente, estos se clasificaron en categorías de acuerdo a la anotación previa del genoma.

Los genes expresados diferencialmente se categorizaron de acuerdo a la anotación que ya se tenía del genoma, las categorías más representadas en todos los contrastes fueron las asociadas al transporte de membrana, en el caso del contraste entre 20a (vs 145) - 20a a los 5 minutos de interacción una categoría muy representada fue la del metabolismo del DNA al igual que la de transporte de membrana. También vale la pena resaltar la cantidad de genes sin anotación y proteínas hipotéticas con expresión diferencial ya que estas categorías están bien representadas (Figura 3.14). Dichos genes no se tomaron en cuenta para un análisis más a fondo debido a la nula o poca información sobre ellos.

De los genes que mostraron expresión diferencial en el contraste 20a (vs 145) - 20a se resaltan tres proteínas de competencia, *comGA*, *comGB* y *comGC* los cuales

dentro de las coordenadas del genoma se encuentran consecutivamente formando un operón, estos genes son indispensables para la internalización de DNA externo y forman parte de un sistema de secreción tipo IV.

Tabla 3.3 Genes expresados diferencialmente bajo el contraste de 20a (vs 145) - 20a T5. Genes con cambio en su expresión, mostrando la categoría en la que se encuentran anotados dichos genes, de igual manera se muestra el tipo de regulación mostrando un signo + si aumento su expresión y uno - si disminuyó su expresión, la magnitud de cambio también se muestra en la tabla (logFC).

Genes	Categoría	Regulación	logFC
Sistema de secreción tipo II	Transporte de membrana	+	3,8
Acyl-CoA sintasa	Ácidos grasos, lípidos e isoprenoides	+	3,3
Catalasa	Respuesta a estrés	+	3,1
Regulador transcripcional de familia CsoR	Transporte de membrana	+	3,1
Cobalto-precursorina-3b c17-metiltransferasa	Cofactores, vitaminas, grupos prostéticos, pigmentos	+	3,1
Proteína de resistencia a fosfomicina fosb	Virulencia y defensa	+	3
ATPasa translocadora de cobre tipo-P	Transporte de membrana	+	3
Chaperona de cobre (I) copz	Transporte de membrana	+	2,9
Proteína de competencia comga	Metabolismo del DNA	+	2,9
Proteína de competencia comgc	Metabolismo del DNA	+	2,7
Acetyltransferasa familia gnat	Ácidos grasos, lípidos e isoprenoides	+	2,6
Acetyltransferasa familia gnat	Ácidos grasos, lípidos e isoprenoides	+	2,5
Proteína de competencia comgb	Metabolismo del DNA	+	2,5
Proteína ecsb	Transporte de membrana	+	2,4

Como se mencionó anteriormente, genes asociados al transporte a través de la membrana se encontraban expresados de manera diferencial en este contraste. Entre estos genes se encuentran genes anotados como pertenecientes al sistema de secreción tipo II, de igual forma los genes *csor*, *copZ* y una ATPasa translocadora de cobre se encontraban expresados diferencialmente, y estos también forman un operón relacionado con el transporte de cobre en la célula.

Además de los genes mencionados anteriormente también se encontraron genes que formaban parte de una respuesta mucho más esperada a una condición de estrés como lo es la competencia, entre estos están la catalasa que se expresa en presencia de estrés oxidativo, la cual detoxifica el medio de las especies reactivas de oxígeno, y también aumentó su expresión un gen que le confiere resistencia a antibiótico fosfomicina (Tabla 3.4).

Tabla 3.4 Genes expresados diferencialmente en el contraste de 20a (vs Triple) - 20a T5. Genes con cambio en su expresión mostrando la categoría en la que se encuentran anotados, igualmente se muestra el tipo de regulación mostrando un signo + si aumento su expresión y uno - si disminuyó, la magnitud de cambio también se muestra en la tabla (logFC).

Genes	Categoría	Regulación	logFC
Cobalto-precorrina c17-metiltransferasa	Cofactores, vitaminas, grupos prostéticos, pigmentos	+	4.3
Catalasa	Respuesta a estrés	+	4.0
Transportador ABC	Transporte de membrana	+	3.8
Pululanasa	Carbohidratos	+	3.3
Transportador ABC	Transporte de membrana	+	3.2
N-acetiltransferasa familia gnat	Ácidos grasos, lípidos e isoprenoides	+	3.2
Transportador ABC	Transporte de membrana	+	3.0
Alfa-glucosidasa	Carbohidratos	+	2.9

En el contraste entre 20a (vs Triple) - 20a a los 5 minutos algunos genes encontrados en el contraste de 20a durante el antagonismo están igualmente presentes, sin embargo, genes que indican una respuesta a estrés, a excepción de la catalasa, ya no se encuentran expresados diferencialmente. En este contraste genes de transporte de la membrana siguen expresados diferencialmente, pero no son los mismos genes, en este caso no son proteínas de competencia o sistemas de secreción, en este contraste son transportadores del tipo ABC que se han reportado por tener función de transportar carbohidratos, lípidos, aminoácidos, iones metálicos y proteínas. De igual forma otros genes como los relacionados con carbohidratos y ácidos grasos se expresan diferencialmente en este contraste.

Discusión de resultados

El primer objetivo de este proyecto fue la selección de las cepas a utilizar para los ensayos de interacción, por lo que se preseleccionaron cinco: 112, 145, 43, 111 y 20a las cuales ya habían sido probadas en el trabajo de Pérez-Gutiérrez *et al.* (2013) de las cuales 112, 145 y 43 pertenecen a cepas antagonistas, 111 es resistente y 20a la sensible. La selección se basó en la reproducibilidad de la inhibición sobre la especie sensible y que los fenotipos fueran contrastantes entre ellas, lo cual se logró con 20a (*B. horikoshii*), 145 (*B. pumilus*) y 111 (*B. cereus*); las cuales corresponde al rol de sensible/no antagonista, antagonista/resistente y resistente/no antagonista (Figura 3.2).

Los fenotipos fueron claramente distintos, ya que 20a tiene una morfología clásica de aislados marinos de *Bacillus*, colonias pequeñas naranjas y brillantes, por otro lado 145 mostró un fenotipo de colonias pequeñas blancas brillantes común en estos aislados de suelos, además de mostrar la actividad antagónica que de igual forma ya se había reportado, 111 es la más contrastante al tener colonias de mayor tamaño, opacas y con formas irregulares.

Las cinéticas de crecimiento nos permitieron encontrar el punto en la curva de crecimiento en el cual se tomarían las muestras para realizar los ensayos de interacción, sobre todo considerando que las tres especies tienen una velocidad de crecimiento distinta; de las cinéticas también se obtuvo el dato de carga máxima de las cepas para el diseño del autómatas celular. El punto de la curva seleccionado fue distinto para cada cepa, pero para las tres fue dentro de la fase exponencial, se eligió este punto asumiendo que habría menor muerte celular, ya que en la fase estacionaria muchas de las células comienzan a morir, lo cual habría podido dificultar el diferenciar entre la consecuencia del antagonismo y la muerte en el estado estacionario, al realizar los ensayos de interacción.

La cinética por sí sola no servía para calcular las proporciones de cada cepa durante los ensayos de interacción así que se realizó la curva de calibración comparando la absorbancia que se medía con el Klett-Summerson contra las UFC de cada punto de la cinética. La curva de calibración (Figura 3.4) muestra que las UFC aumentan de manera exponencial al igual que la absorbancia durante la fase exponencial, lo cual nos permitió tomar un punto de la curva y correlacionarlo con las UFC de la cepa en ese punto y así lograr una mayor precisión al momento de realizar los ensayos. Esto de cualquier forma se corroboraba cada vez al plaquear cada cepa de manera independiente.

Los ensayos de antagonismo, cinéticas de crecimiento y curvas de calibración nos permitieron encontrar la proporción adecuada para las interacciones. El saber qué interacciones tienen fenotipos negativos y cuáles no, nos permitió saber qué especie debería de ser la más abundante en el inicio de la interacción. En este caso la sensible (20a) se puso en mayor concentración, ya que una proporción mayor de la antagonista (145) propiciaría, si no una extinción de 20a dentro de las interacciones, números tan bajos que no podríamos cuantificarlos con nuestra metodología. De igual forma las cinéticas de crecimiento y curvas de calibración nos permitieron encontrar la relación entre absorbancia y UFC para tener un control de la cantidad de UFC con solo realizar la cinética de crecimiento. Los resultados de estos experimentos, aunque simples, nos permitieron estandarizar los ensayos de interacciones ya que no es algo que se hubiera realizado antes en el laboratorio y de igual forma son experimentos pocas veces reportados en la literatura.

Ya en los ensayos de interacción lo que se buscó fue observar la dinámica temporal de la interacción. El resultado de la interacción entre 20a y 145 fue el esperado, pero pudimos ver por vez primera los tiempos en que se observaba el antagonismo. Los primeros experimentos se hicieron por lapsos de media hora (datos no reportados), y tuvimos que disminuir al rango de minutos. Al ser 20a inhibida por la cepa 145 la dinámica mostró que en tan solo 5 minutos la cantidad de UFC se redujo en un orden de magnitud. El antagonismo era una respuesta esperada en esta interacción, incluso considerando que 20a se encontraba en una proporción casi diez veces mayor, lo que resultó interesante fue que la respuesta fue casi inmediata o en un tiempo muy corto y no gradual, ya que a pesar de que la cantidad de UFC sigue reduciéndose en el tiempo de la interacción, esta reducción ya no es tan importante como la de los primeros 5 minutos (Figura 3.5).

Hacia el final de la interacción, alrededor de los 20 minutos, se observó lo que parecía una especie de equilibrio, donde la cantidad de UFC dejaban de disminuir, este resultado pudiera sugerir dos alternativas, una es que la especie antagonista responde a la densidad celular de 20a (Cornforth & Foster, 2013) y cuando ésta baja el antagonismo ya no es necesario ya que 20a deja de ser competencia. Otra posibilidad es que 20a sea capaz de responder al antagonismo y equilibrar la interacción y que hacia el final de la interacción ya no sea sensible a la presencia de 145.

Lo observado en el ensayo de interacción entre 20a y 145 nos mostró una respuesta casi inmediata, ya que la inhibición más significativa se observó a los 5 minutos, pero más que la respuesta antagónica por parte de 145, que era algo que se esperaba ver, la posible respuesta de 20a para contrarrestar el antagonismo e equilibrar la interacción resultó de sumo interés, debido a que el entender cómo responde una bacteria a la competencia es uno de los principales objetivos de este

trabajo. Antes de medir una posible respuesta a la competencia se buscó determinar si el equilibrio alcanzado en la interacción entre 20a y 145 era una respuesta de 20a o si el antagonismo por parte de 145 se detuvo, para ello se realizó el ensayo donde se agregó nuevamente la especie sensible (20a) a los 30 minutos de la interacción entre 20a y 145, lo cual nos dio como resultado una dinámica muy distinta a la observada en la interacción original ya que al inocular la misma cantidad inicial de 20a a los 30 minutos ésta ya no es antagonizada, lo cual indica que 145 no responde a la densidad celular de 20a, esto sugiere que el medio puede ya haber sido detoxificado por la población inicial de 20a, o que la cepa 145 dejó de ser antagónica en la dinámica, aunque aún es mera especulación (Figura 3.7).

La respuesta de 20a al antagonismo ejercido por 145 parece lograr un equilibrio que evita la completa extinción de la especie sensible, el análisis transcriptómico nos brindó un panorama de la naturaleza de la respuesta. Genes relacionados con la respuesta al estrés eran algunos de los que se esperaba encontrar con expresión diferencial en 20a en una interacción antagónica, e.g. genes relacionados con los factores sigma los cuales son genes muy estudiados por su respuesta con el estrés de varios tipos (Hecker *et al.*, 1996). Sin embargo genes regulados por los factores sigma no se mostraron expresados de manera diferencial durante esta interacción, al menos no a los 5 minutos que fue el tiempo en el que se realizó este análisis. Esto puede explicarse debido al tiempo tan corto del transcriptoma, es posible que si la muestra se hubiera tomado más adelante estos genes pudieran haber aumentado su expresión. A pesar de que los factores sigma no se expresaron diferencialmente, si lo hicieron otros genes relacionados con otros tipos de estrés. Un ejemplo fue la catalasa asociada al estrés oxidativo al ser capaz de detoxificar el medio de especies reactivas de oxígeno (ROS) las cuales son producto del metabolismo aeróbico e incluso como productos de antibióticos no relacionados, aunque esto no es muy claro hasta el momento (Apel & Hirt, 2004; Tinajero-Trejo *et al.*, 2013). *KatA* (catalasa vegetativa) se expresa por estrés oxidativo (Mostertz *et al.*, 2004; Helmann *et al.*, 2003) o estrés por sales (Höper *et al.*, 2006). Otras catalasas, como *KatE* y *KatX* se expresan por Sigma B o inclusive durante la esporulación. Por otro lado tenemos la expresión del gen de resistencia a la fosfomicina. Este gen (*fosB*) se ha encontrado en genomas de *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* y actúa catalizando la adición de L-cisteína hacia el antibiótico fosfomicina (Cao *et al.*, 2001). La expresión de *fosB* en *B. subtilis* depende de sigma W.

Las otras interacciones dobles (145 vs 111 y 111 vs 20a) resultaron en interacciones neutrales, es decir que no se observó ningún fenotipo a resaltar o que resultara contrastante a lo esperado. Donde sí se obtuvo un fenotipo contrastante o inesperado fue en la interacción triple (20a vs 145 vs 111) donde se observó como la presencia de 111 parecía atenuar la inhibición de 20a (Figura 3.6). La presencia de la especie resistente actúa como un estabilizador en la interacción antagónica.

La supresión o atenuación del antagonismo ha sido reportado anteriormente en otros modelos de estudio donde el estímulo de una tercer especie suprime el antagonismo (Abrudan *et al.*, 2015). Cuando esto sucede en una comunidad bacteriana se promueve la conservación de la diversidad. El aumento en el número de interactores promueve un aumento en la estabilidad (como en lo observado en la interacción triple), y donde la ausencia de la cepa resistente conduce a una desestabilización en la abundancia de uno de los interactores (Gallien, 2017).

Originalmente en el trabajo de Pérez-Gutiérrez *et al.* (2013) se había considerado a cepas como 111 pertenecientes a la especie de *B. cereus* como bacterias que no jugaban un rol, o al menos no uno importante, en una red antagónica. Ahora podemos proponer la hipótesis de que el rol de este tipo de bacterias en una comunidad puede ser el de equilibrar las interacciones inhibitorias entre algunos otros miembros. Habrá que probar si otras bacterias de este grupo tienen el mismo efecto en la interacción triple de nuestro modelo sintético.

El por qué de la supresión o atenuación del antagonismo hasta ese punto no era muy claro, debido a la cantidad de variables que pudieran afectar la interacción, pero a pesar de eso se realizaron una serie de experimentos para buscar el por qué de esta supresión de este efecto antagónico sobre 20a. Primeramente se buscó determinar si de alguna forma 111 era capaz de degradar el compuesto inhibitorio como lo reportado por Kelsic *et al.* (2015) donde proponen que la manera de estabilizar por parte de especies resistentes es mediante la degradación del compuesto inhibitorio y mediante una resistencia intrínseca. Lo observado fue que por proximidad 111 no es capaz de evitar la inhibición de la cepa 145 sobre 20a lo que contrasta con lo observado por Kelsic *et al.* (2015). Es posible que la atenuación del antagonismo durante la interacción triple requiera un contacto célula a célula o por algún otro tipo de mecanismo que no involucra la degradación del compuesto inhibitorio. Lo que es claro es que la resistencia de 111 le brinda un beneficio a la cepa 20a lo que concuerda con lo propuesto por Kelsic *et al.* (2015), ya que consideran que las resistencias intrínsecas no ayudan al mantenimiento de la comunidad cosa que sí sucede si la resistencia puede ser aprovechada por otros miembros de la comunidad.

Aún sin saber de manera clara el mecanismo de cómo la cepa 111 es capaz de equilibrar la interacción antagónica entre las cepas 145 y 20a, sin duda la presencia de 111 juega un rol importante para que se de este equilibrio. Una manera de explorar la importancia de la cepa resistente (111) y generar modelos que permitan futuras aproximaciones experimentales, fue por medio de simulaciones alimentadas por datos experimentales. En dichas simulaciones se observó como la proporción inicial de la cepa 111 era la que determinaba la supervivencia de la cepa 20a ya que si la proporción de 111 era muy baja 20a difícilmente sobrevivía al antagonismo

ejercido por la cepa 145, sin importar que tan alta era la proporción de 20a, si la cepa 111 no estaba o estaba en una proporción baja esta cepa no sobrevivía.

Otro aspecto importante en estas simulaciones es que se simuló un medio estructurado, como un sedimento o suelo, lo cual permitía a la cepa 20a aislarse del antagonismo ejercido por la cepa 145, ya que si 20a se rodeaba de la cepa 111 esta no era alcanzada por el antagonismo de 145 lo cual coincide con los resultados de Zapién-Campos *et al.* (2015), que propone que la formación de estos “parches bacterianos” es la manera en que las especies sensibles sobreviven en un ambiente estructurado como un sedimento. La agitación durante las simulaciones (mix) nos ayudó a corroborar cómo dentro de ellas era importante la estructura, ya que si la simulación se realizaba con una constante agitación la cepa 20a nunca sobrevivía. La probabilidad de muerte extrínseca también fue un factor importante para la supervivencia de la cepa 20a, ya que si ésta era alta, 20a no sobrevivía. A pesar de estos resultados hay que recordar que los ensayos de interacción realizados en este trabajo fueron en medio líquido así que la formación de estos “parches bacterianos” es imposible, así que esto no explicaría el equilibrio alcanzado en la interacción triple, pero nos brinda un acercamiento a lo que pudiera suceder realmente en un sedimento.

En este punto aún falta mucho que hacer para determinar el mecanismo por el cual la cepa 111 es capaz de atenuar el antagonismo entre 145 y 20a, pero los resultados hasta ahora nos dan una guía para seguir explorando esta interacción, experimentos de dosis-respuesta modificando la proporción como en las simulaciones pero ahora de forma experimental podrían dar más información acerca de este fenómeno, de igual forma el análisis transcriptómico de la cepa 111 durante la interacción triple o experimentos de microscopía podrían ayudar a elucidar este mecanismo.

Como una forma de explorar la respuesta de la cepa 20a al antagonismo se realizó el análisis transcriptómico durante la interacción de esta cepa con la cepa 145 y en la interacción triple. Los resultados de la respuesta de la cepa 20a en la interacción antagónica con la cepa 145 ya se discutieron brevemente al inicio de esta sección, resaltando la ausencia de los genes relacionados con los factores sigma y la presencia de genes asociados con el estrés oxidativo y la resistencia a fosfomicina, sin embargo estos no fueron los únicos genes que se expresaron diferencialmente en la cepa 20a durante esta interacción. Varios genes relacionados con el transporte de membrana se expresaron diferencialmente, como por ejemplo un gen que se anotó como parte del sistema de secreción tipo II. Cabe aclarar que este tipo de sistemas de secreción solo se encuentra en Gram-negativas, así que la anotación con este gen puede ser porque es con el gen que tiene mayor similitud, que sería un factor de secreción tipo IV, como se sugiere más adelante.

Dentro de los genes asociados con transporte de membrana se encuentran expresados diferencialmente tres genes que forman parte de un operón. Estos genes son *comGA*, *comGB* y *comGC* que se ha reportado forman parte del sistema de secreción tipo IV (T4P) en bacterias Gram-positivas (Nivaskumar & Olivera, 2014). Este operón T4P se ha reportado como responsable de la internalización e integración cromosomal de DNA exógeno (Laurenceau *et al.*, 2013; Laurenceau *et al.*, 2015). Sobre este operón la mayoría de la bibliografía se enfoca en *Streptococcus pneumoniae* por su importancia clínica, y es con este modelo de estudio con el cual Wholey *et al.* (2016) propone cómo este tipo de genes de competencia se estimulan de manera importante gracias a la acción de compuestos que inhiben el crecimiento de las bacterias como lo son las bacteriocinas. Este estímulo aumenta la internalización de DNA exógeno lo cual sugiere que este DNA les puede conferir una ventaja adaptativa.

Continuando con los genes relacionados con el transporte de membrana están tres genes expresados diferencialmente en la cepa 20a en interacción con 145, estos genes son el regulador de transcripción de sensado de cobre CsoR, la chaperona CopZ y la ATPasa translocadora de cobre CopA estos genes están relacionados con la movilización de cobre a través de la célula. Estos genes también forman un operón ya que se encuentran juntos dentro del genoma. Estos genes han sido estudiados en *Bacillus subtilis* y se consideran como responsables de mantener los niveles de cobre dentro de la célula de manera que este no sea tóxico (Radford *et al.*, 2003). Un ángulo interesante del transporte del cobre deriva de estudios en ratones en donde el transporte de cobre a los macrófagos es una forma de combatir a *Salmonella typhimurium*, que a su vez se defiende exportando este cobre mediante transportadores *CopA* y *GoIT* (Ladomersky *et al.*, 2017). Sería interesante ver si 20a saca el cobre y a su vez de protegerse es una forma de contraataque a la 145.

En el caso de los genes de la cepa 20a con expresión diferencial durante la interacción triple, ya quitando genes con anotación desconocida o que se anotaron como proteínas hipotéticas sólo quedaron ocho genes de los cuales algunos pertenecían a las mismas categorías que los genes expresados diferencialmente en la interacción entre la cepa 20a y 145. Algunos de estos genes son algunos asociados a transporte de membrana o el gen de la catalasa que en esta interacción también se expresó diferencialmente. Genes como los genes de competencia *comG* y los relacionados con la movilización de cobre ya no se expresaron diferencialmente lo cual puede sugerir que estos genes están asociados con la respuesta de la cepa 20a al antagonismo de 145, aunque esto apenas es una suposición y requiere más análisis para poder ser corroborado.

En la parte transcriptómica de este proyecto aún quedan análisis por hacer sobre todo con las cepas 111 y 145 las cuales hasta ahora no se han mostrado en este trabajo y que mostrarían la respuesta transcripcional de un antagonista en el caso de la 145 y por parte de la cepa 111 una posible respuesta de resistencia al antagonismo o el cómo es capaz de proteger a la cepa 20a del antagonismo.

Si bien el modelo de *Bacillus* más estudiado es *Bacillus subtilis*, es enorme la información que tenemos sobre la respuesta a estrés. Curiosamente no vemos las respuestas clásicas descritas para los diferentes tipos de estrés que han sido probados. Por un lado los experimentos no se han hecho a tan corto plazo. En este caso, 5 y 30 minutos no son suficiente tiempo para división celular (en *Bacillus* ésta ocurre entre 35 y 45 min, dependiendo de la especie y a las condiciones de crecimiento), pero sí es suficiente para un cambio total en los genes expresados. En bacterias en cuestión de 1 o 2 minutos se expresa un transcrito y se sintetiza la proteína correspondiente, y también en este lapso de tiempo se degrada un mRNA.

Conclusiones

El diseño de una comunidad sintética de tres especies de *Bacillus* aisladas del sistema Churince en Cuatrociénegas, Coahuila, así como el análisis de sus interacciones nos permitieron entender de mejor manera como es la dinámica dentro de una comunidad bacteriana. En este caso la ecología sintética nos ha permitido acotar un experimento que de manera natural sería demasiado complejo para analizar, y de este trabajo hemos obtenido las conclusiones que se presentarán a continuación.

El antagonismo ejercido sobre la cepa 20a por parte de la cepa 145 es casi inmediato, ya que toma apenas 5 minutos en reducirse en un orden de magnitud el conteo de UFC de la cepa 20a, sin embargo, durante el tiempo de la interacción esta reducción continua ligeramente hasta que parece estabilizarse, lo cual pudiera sugerir una respuesta de 20a que equilibra el antagonismo.

Dentro de la misma interacción antagónica se observó como a los 30 minutos el medio ya no inhibía el crecimiento de la cepa 20a ya que en este punto si se agregaba nuevamente la cepa sensible (20a) este nuevo inóculo no se vió reducido, lo cual sugiere una respuesta de la cepa sensible al antagonismo de la cepa 145.

La cepa 20a no fue antagonizada por la cepa 145 cuando la cepa 111 se encontraba también en la interacción, esta atenuación del antagonismo se observó durante los 30 minutos que duró la interacción, este equilibrio alcanzado gracias a una tercer cepa ya se había reportado en la literatura (Kelsic *et al.*, 2015; Aburdan *et al.*, 2015). La degradación del compuesto inhibitorio no parece ser la causa del por qué la cepa 111 es capaz de evitar el antagonismo sobre 20a, ya que por proximidad esta no es capaz de proteger a la cepa sensible, es posible que requiera contacto célula a célula.

La proporción de la cepa 111 parecer ser primordial para la supervivencia de la cepa 20a, de igual forma un ambiente estructurado y una baja probabilidad de muerte extrínseca pueden evitar la extinción de la cepa sensible dentro de las simulaciones del autómeta celular. A pesar de estos resultados habrá que investigar el mecanismo por el cual la cepa resistente es capaz de proteger a la sensible.

Por parte del análisis transcriptómico de la cepa 20a en interacción con la cepa 145 se encontró que la catalasa se encontraba expresada diferencialmente lo cual explicaría si en una interacción entre dos bacterias modifica el medio y vuelve aun más compleja dicha interacción. Por otro lado los genes de competencia *comG* que

forman un operón que es capaz de internalizar DNA exógeno también fueron expresados diferencialmente lo cual puede sugerir que la utilización de este DNA puede ser una estrategia de la especie sensible para aumentar su adaptabilidad, y algunos esquemas sugieren que es parte de un complejo que incluye un sistema de secreción. De igual forma un operón relacionado con la movilización de cobre en la célula se expresó diferencialmente, lo cual puede ser un módulo de desionización, pues el cobre puede llegar a ser tóxico para la célula en concentraciones altas.

En el caso de la cepa 20a en la interacción triple los genes con expresión diferencial fueron más genes de transporte, de metabolismo de carbohidratos y de lípidos, el único que se repite como en la interacción doble es el de la catalasa, lo cual puede sugerir que el estrés oxidativo continúa aún con la presencia de la cepa 111.

Un análisis transcriptómico más a fondo así como el análisis de la expresión de las otras cepas parece necesario para ver un fenotipo más claro cuando estas cepas se encuentran en interacción. Además de la transcriptómica, más ensayos de dinámica de muerte celular y de microscopía pueden ser necesarios para entender el papel que juega la cepa 111 como la que equilibra el antagonismo entre la cepa 20a y 145.

Perspectivas

Como perspectivas se considera el explorar más a fondo las dinámicas antes presentadas para encontrar los mecanismos de la respuesta a las interacciones, así como la naturaleza de estos mecanismos. Los más importantes de mencionan a continuación.

¿Podría la propia muerte celular ser una señal para que la población 20a exprese genes de resistencia? Realizar experimentos donde se utilicen cultivos de la cepa 20a lisada puede ayudar a determinar si la respuesta de la cepa 20a es al contenido celular de otras células muertas.

El otro escenario al experimento con el lisado de la cepa 20a es que la cepa 145 consigue todos sus nutrientes de la lisis primaria de la 20a y deja de ser antagonica. Así le da oportunidad a 20a de restablecerse.

¿Que efecto tiene la dosis de la cepa 111 en la interacción triple? Si se baja o se aumenta la concentración de 111 en la interacción triple, ¿se modifica la atenuación del antagonismo de la cepa 145 sobre la 20a?

Ya que la atenuación del antagonismo por parte de la cepa 111 no funciona por proximidad y una posibilidad es que se requiera contacto célula a célula, se podría probar si el efecto de un lisado de la cepa 111 es capaz de equilibrar la interacción antagonica entre la cepa 145 y 20a.

¿Estamos viendo una respuesta de células vivas o muertas? Se tendrá que validar su expresión inmediatamente para su análisis por microscopía y por cell sorting para cuantificar en la población.

Referencias

- Abrudan, M. I., Smakman, F., Grimbergen, A. J., Westhoff, S., Miller, E. L., van Wezel, G. P., & Rozen, D. E. (2015). Socially mediated induction and suppression of antibiosis during bacterial coexistence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(35), 11054–11059. <https://doi.org/10.1073/pnas.1504076112>
- Aguirre-von-Wobeser, E., Soberón-Chávez, G., Eguiarte, L. E., Ponce-Soto, G. Y., Vázquez-Rosas-Landa, M., & Souza, V. (2014). Two-role model of an interaction network of free-living γ -proteobacteria from an oligotrophic environment. *Environmental Microbiology*, *16*(5), 1366–1377. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12305>
- Anders, S., Pyl, P. T., & Huber, W. (2015). HTSeq-A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, *31*(2), 166–169. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638>
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology*, *55*(1), 373–399. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., ... Zagnitko, O. (2008). The RAST Server: Rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*, *9*(1), 75. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>
- Becker, J., Eisenhauer, N., Scheu, S., & Jousset, A. (2012). Increasing antagonistic interactions cause bacterial communities to collapse at high diversity. *Ecology Letters*, *15*(5), 468–474. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2012.01759.x>
- Birch, L. C. (1957). The Meanings of Competition. *The American Naturalist*. The University of Chicago Press The American Society of Naturalists. <https://doi.org/10.1086/281957>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, *30*(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>

- Buss, L. W., & Jackson, J. B. C. (1979). Competitive Networks: Nontransitive Competitive Relationships in Cryptic Coral Reef Environments. *The American Naturalist*, 113(2), 223–234. <https://doi.org/10.1086/283381>
- Cabiscol, E., Tamarit, J., & Ros, J. (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology*, 3(1), 3–8. <https://doi.org/10.2436/im.v3i1.9235>
- Cao, M., Bernat, B. A., Wang, Z., Armstrong, R. N., & Helmann, J. D. (2001). FosB, a cysteine-dependent fosfomycin resistance protein under the control of σ^w , an extracytoplasmic-function σ factor in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 183(7), 2380–2383. <https://doi.org/10.1128/JB.183.7.2380-2383.2001>
- Case, T. J., & Gilpin, M. E. (1974). Interference Competition and Niche Theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(8), 3073–3077. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.8.3073>
- Celiker, H., & Gore, J. (2012). Competition between species can stabilize public-goods cooperation within a species. *Molecular Systems Biology*, 8(10). <https://doi.org/10.1038/msb.2012.54>
- Cerritos, R., Eguiarte, L. E., Avitia, M., Siefert, J., Travisano, M., Rodríguez-Verdugo, A., & Souza, V. (2011). Diversity of culturable thermo-resistant aquatic bacteria along an environmental gradient in Cuatro Ciénegas, Coahuila, México. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 99(2), 303–318. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9490-9>
- Chao, L., & Levin, B. R. (1981). Structured habitats and the evolution of anticompetitor toxins in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(10), 6324–6328. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.10.6324>
- Cornforth, D. M., & Foster, K. R. (2013). Competition sensing: The social side of bacterial stress responses. *Nature Reviews Microbiology*, 11(4), 285–293. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2977>
- Dolinšek, J., Goldschmidt, F., & Johnson, D. R. (2016). Synthetic microbial ecology and the dynamic interplay between microbial genotypes. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(6), 961–979. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw024>

- Dubey, G. P., & Ben-Yehuda, S. (2011). Intercellular nanotubes mediate bacterial communication. *Cell*, *144*(4), 590–600. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.01.015>
- Dunham, M. J. (2007). Synthetic ecology: A model system for cooperation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(6), 1741–1742. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611067104>
- Dunson, W. A., & Travis, J. (1991). The Role of Abiotic Factors in Community Organization. *The American Naturalist*, *138*(5), 1067–1091. <https://doi.org/10.1086/285270>
- Edwards, K. F., & Schreiber, S. J. (2010). Preemption of space can lead to intransitive coexistence of competitors. *Oikos*, *119*(7), 1201–1209. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2009.18068.x>
- Escalante, A. E., Rebolleda-Gómez, M., Benítez, M., & Travisano, M. (2015). Ecological perspectives on synthetic biology: Insights from microbial population biology. *Frontiers in Microbiology*, *6*(FEB), 143. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00143>
- Evans, M. R., Bithell, M., Cornell, S. J., Dall, S. R. X., Diaz, S., Emmott, S., ... Benton, T. G. (2013). Predictive systems ecology. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *280*(1771), 20131452–20131452. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.1452>
- Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., & Käller, M. (2016). MultiQC: Summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, *32*(19), 3047–3048. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354>
- Faust, K., & Raes, J. (2012). Microbial interactions: From networks to models. *Nature Reviews Microbiology*, *10*(8), 538–550. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2832>
- Foster, K. R., & Bell, T. (2012). Competition, not cooperation, dominates interactions among culturable microbial species. *Current Biology*, *22*(19), 1845–1850. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.08.005>
- Gallien, L. (2017). Intransitive competition and its effects on community functional diversity. *Oikos*, *126*(5), 615–623. <https://doi.org/10.1111/oik.04033>

- Gans, J., Wolinsky, M., & Dunbar, J. (2005). Microbiology: Computational improvements reveal great bacterial diversity and high toxicity in soil. *Science*, *309*(5739), 1387–1390. <https://doi.org/10.1126/science.1112665>
- Gilpin, M. E. (1975). Limit cycles in competition communities. *The American Naturalist*, *109*(965), 51–60. <https://doi.org/10.2307/2459636>
- Greig, D., & Travisano, M. (2008). Density-dependent effects on allelopathic interactions in yeast. *Evolution*, *62*(3), 521–527. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2007.00292.x>
- Großkopf, T., & Soyer, O. S. (2014). Synthetic microbial communities. *Current Opinion in Microbiology*, *18*(1), 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.02.002>
- Hecker, M., Schumann, W., & Volker, U. (1996). Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, *19*(3), 417–428. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.396932.x>
- Helmann, J. D., Wu, M. F. W., Gaballa, A., Kobel, P. A., Morshedi, M. M., Fawcett, P., & Paddon, C. (2003). The global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to peroxide stress is coordinated by three transcription factors. *Journal of Bacteriology*, *185*(1), 243–53. <https://doi.org/10.1128/JB.185.1.243-253.2003>
- Hibbing, M. E., Fuqua, C., Parsek, M. R., & Peterson, S. B. (2010). Bacterial competition: Surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Reviews Microbiology*, *8*(1), 15–25. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2259>
- Hooper, D. U., Chapin, F. S., Ewel, J. J., Hector, A., Inchausti, P., Lavorel, S., ... Wardle, D. A. (2005). Effects of biodiversity on ecosystem functioning: A consensus of current knowledge. *Ecological Monographs*, *75*(1), 3–35. <https://doi.org/10.1890/04-0922>
- Huerta-Cepas, J., Szklarczyk, D., Forslund, K., Cook, H., Heller, D., Walter, M. C., ... Bork, P. (2016). EGGNOG 4.5: A hierarchical orthology framework with improved functional annotations for eukaryotic, prokaryotic and viral sequences. *Nucleic Acids Research*, *44*(D1), D286–D293. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1248>
- Hunting, E. R., Vijver, M. G., van der Geest, H. G., Mulder, C., Kraak, M. H. S., Breure, A. M., & Admiraal, W. (2015). Resource niche overlap promotes

stability of bacterial community metabolism in experimental microcosms. *Frontiers in Microbiology*, 6(FEB), 105. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00105>

Johns, N. I., Blazejewski, T., Gomes, A. L. C., & Wang, H. H. (2016). Principles for designing synthetic microbial communities. *Current Opinion in Microbiology*, 31, 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.03.010>

Keller, L., & Surette, M. G. (2006). Communication in bacteria: An ecological and evolutionary perspective. *Nature Reviews Microbiology*, 4(4), 249–258. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1383>

Kelsic, E. D., Zhao, J., Vetsigian, K., & Kishony, R. (2015). Counteraction of antibiotic production and degradation stabilizes microbial communities. *Nature*, 521(7553), 516–519. <https://doi.org/10.1038/nature14485>

Kerr, B., Riley, M. A., Feldman, M. W., & Bohannan, B. J. M. (2002). Local dispersal promotes biodiversity in a real-life game of rock-paper-scissors. *Nature*, 418(6894), 171–174. <https://doi.org/10.1038/nature00823>

Khalil, A. S., & Collins, J. J. (2010). Synthetic biology: Applications come of age. *Nature Reviews Genetics*, 11(5), 367–379. <https://doi.org/10.1038/nrg2775>

Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F., & Hopwood, D. A. (2000). *Practical Streptomyces Genetics*. John Innes Centre Ltd. John Innes Foundation. <https://doi.org/10.4016/28481.01>

Kim, D., Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2015). HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods*, 12(4), 357–360. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3317>

Kim, H. J., Boedicker, J. Q., Choi, J. W., & Ismagilov, R. F. (2008). Defined spatial structure stabilizes a synthetic multispecies bacterial community. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(47), 18188–18193. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807935105>

Kinkel, L. L., Schlatter, D. C., Xiao, K., & Baines, A. D. (2014). Sympatric inhibition and niche differentiation suggest alternative coevolutionary trajectories among Streptomyces. *ISME Journal*, 8(2), 249–256. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.175>

- Kirkup, B. C., & Riley, M. A. (2004). Antibiotic-mediated antagonism leads to a bacterial game of rock-paper-scissors in vivo. *Nature*, *428*(6981), 412–414. <https://doi.org/10.1038/nature02429>
- Konopka, A., Lindemann, S., & Fredrickson, J. (2015). Dynamics in microbial communities: Unraveling mechanisms to identify principles. *ISME Journal*, *9*(7), 1488–1495. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.251>
- Ladomersky, E., Khan, A., Shanbhag, V., Cavet, J. S., Chan, J., Weisman, G. A., & Petris, M. J. (2017). Host and Pathogen Copper-Transporting P-Type ATPases Function Antagonistically during Salmonella Infection. *Infection and Immunity*, *85*(9), IAI.00351-17. <https://doi.org/10.1128/IAI.00351-17>
- Law, C. W., Chen, Y., Shi, W., & Smyth, G. K. (2014). Voom: Precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome Biology*, *15*(2), R29. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-2-r29>
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., ... Durbin, R. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, *25*(16), 2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- Lidicker, W. Z. (1979). A Clarification of Interactions in Ecological Systems. *BioScience*, *29*(8), 475–477. <https://doi.org/10.2307/1307540>
- Lima, S. L., & Dill, L. M. (1990). Behavioral decisions made under the risk of predation: a review and prospectus. *Canadian Journal of Zoology*, *68*(4), 619–640. <https://doi.org/10.1139/z90-092>
- Long, R. A., & Azam, F. (2001). Antagonistic Interactions among Marine Pelagic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*(3–12), 4975–4983. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.11.4975-4983.2001>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, *15*(12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lyons, N. A., & Kolter, R. (2017). *Bacillus subtilis* protects public goods by extending kin discrimination to closely related species. *mBio*, *8*(4), e00723-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00723-17>

- Maier, R. M., & Pepper, I. L. (2009). Bacterial Communities in Natural Ecosystems. *Environmental Microbiology*, 17, 347–356. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370519-8.00017-1>
- Majeed, H., Gillor, O., Kerr, B., & Riley, M. A. (2011). Competitive interactions in *Escherichia coli* populations: The role of bacteriocins. *ISME Journal*, 5(1), 71–81. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.90>
- Martinez, J. L., Fajardo, A., Garmendia, L., Hernandez, A., Linares, J. F., Martínez-Solano, L., & Sánchez, M. B. (2009). A global view of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(1), 44–65. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00142.x>
- May, R. M., & Leonard, W. J. (1975). Nonlinear Aspects of Competition Between Three Species. *SIAM Journal on Applied Mathematics*, 29(2), 243–253. <https://doi.org/10.1137/0129022>
- Mitri, S., & Richard Foster, K. (2013). The Genotypic View of Social Interactions in Microbial Communities. *Annual Review of Genetics*, 47(1), 247–273. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-111212-133307>
- Mostertz, J., Scharf, C., Hecker, M., & Homuth, G. (2004). Transcriptome and proteome analysis of *Bacillus subtilis* gene expression in response to superoxide and peroxide stress. *Microbiology*, 150(2), 497–512. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26665-0>
- Nadell, C. D., Xavier, J. B., & Foster, K. R. (2009). The sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(1), 206–224. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00150.x>
- Nahum, J. R., Harding, B. N., & Kerr, B. (2011). Evolution of restraint in a structured rock-paper-scissors community. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(Supplement_2), 10831–10838. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100296108>
- Nivaskumar, M., & Francetic, O. (2014). Type II secretion system: A magic beanstalk or a protein escalator. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1843(8), 1568–1577. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.12.020>

- Øvreås, L. (2000). Population and community level approaches for analysing microbial diversity in natural environments. *Ecology Letters*, 3(3), 236–251. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2000.00148.x>
- Palmer, T. M., Stanton, M. L., Young, T. P., Lemboi, J. S., Goheen, J. R., & Pringle, R. M. (2013). A role for indirect facilitation in maintaining diversity in a guild of African acacia ants. *Ecology*, 94(7), 1531–1539. <https://doi.org/10.1890/12-1873.1>
- Pande, S., Shitut, S., Freund, L., Westermann, M., Bertels, F., Colesie, C., ... Kost, C. (2015). Metabolic cross-feeding via intercellular nanotubes among bacteria. *Nature Communications*, 6(1), 6238. <https://doi.org/10.1038/ncomms7238>
- Paquin, C. E., & Adams, J. (1983). Relative fitness can decrease in evolving asexual populations of *S. cerevisiae*. *Nature*, 306(5941), 368–371. <https://doi.org/10.1038/306368a0>
- Pérez-Gutiérrez, R. A., López-Ramírez, V., Islas, Á., Alcaraz, L. D., Hernández-González, I., Olivera, B. C. L., ... Olmedo-Alvarez, G. (2013). Antagonism influences assembly of a *Bacillus* guild in a local community and is depicted as a food-chain network. *ISME Journal*, 7(3), 487–497. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.119>
- Radford, D. S., Kihlken, M. A., Borrelly, G. P. M., Harwood, C. R., Le Brun, N. E., & Cavet, J. S. (2003). CopZ from *Bacillus subtilis* interacts in vivo with a copper exporting CPx-type ATPase CopA. *FEMS Microbiology Letters*, 220(1), 105–112. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00095-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00095-8)
- Raes, J., & Bork, P. (2008). Molecular eco-systems biology: Towards an understanding of community function. *Nature Reviews Microbiology*, 6(9), 693–699. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1935>
- Raynaud, X., & Nunan, N. (2014). Spatial ecology of bacteria at the microscale in soil. *PLoS ONE*, 9(1), e87217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087217>
- Riley, M. A., & Gordon, D. M. (1999). The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends in Microbiology*, 7(3), 129–133. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(99\)01459-6](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(99)01459-6)
- Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., & Smyth, G. K. (2015). Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing

and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, 43(7), e47.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>

Rodríguez-Torres, M. D., Islas-Robles, África, Gómez-Lunar, Z., Delaye, L., Hernández-González, I., Souza, V., ... Olmedo-Álvarez, G. (2017). Phenotypic microdiversity and phylogenetic signal analysis of traits related to social interaction in *Bacillus* spp. from sediment communities. *Frontiers in Microbiology*, 8(JAN), 29. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00029>

Rousk, J., Bååth, E., Brookes, P. C., Lauber, C. L., Lozupone, C., Caporaso, J. G., ... Fierer, N. (2010). Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *ISME Journal*, 4(10), 1340–1351.
<https://doi.org/10.1038/ismej.2010.58>

Ryan, R. P., & Dow, J. M. (2008). Diffusible signals and interspecies communication in bacteria. *Microbiology*, 154(7), 1845–1858.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/017871-0>

Wagner, A. O., Lins, P., & Illmer, P. (2012). A simple method for the enumeration of methanogens by most probable number counting. *Biomass and Bioenergy*, 45(2), 311–314.
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.06.015>

Shou, W., Ram, S., & Vilar, J. M. G. (2007). Synthetic cooperation in engineered yeast populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(6), 1877–1882. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610575104>

Sinervo, B., & Lively, C. M. (1996). The rock-paper-scissors game and the evolution of alternative male strategies. *Nature*, 380(6571), 240–243.
<https://doi.org/10.1038/380240a0>

Souza, V., Espinosa-Asuar, L., Escalante, A. E., Eguiarte, L. E., Farmer, J., Forney, L., ... Elser, J. J. (2006). An endangered oasis of aquatic microbial biodiversity in the Chihuahuan desert. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(17), 6565–6570.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0601434103>

Sprinzak, D., & Elowitz, M. B. (2005). Reconstruction of genetic circuits. *Nature*, 438(7067), 443–448. <https://doi.org/10.1038/nature04335>

Stubbendieck, R. M., & Straight, P. D. (2016). Multifaceted interfaces of bacterial competition. *Journal of Bacteriology*, 198(16), 2145–2155.
<https://doi.org/10.1128/JB.00275-16>

- Taillefumier, T., Posfai, A., Meir, Y., & Wingreen, N. S. (2017). Microbial consortia at steady supply. *eLife*, 6, e22644. <https://doi.org/10.7554/eLife.22644>
- Takahashi, N., Gruber, C. C., Yang, J. H., Liu, X., Braff, D., Yashaswini, C. N., ... Walker, G. C. (2017). Lethality of MalE-LacZ hybrid protein shares mechanistic attributes with oxidative component of antibiotic lethality. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(34), 201707466. <https://doi.org/10.1073/pnas.1707466114>
- Tinajero-Trejo, M., Jesse, H. E., & Poole, R. K. (2013). Gasotransmitters, poisons, and antimicrobials: it's a gas, gas, gas! *F1000Prime Reports*, 5, 28. <https://doi.org/10.12703/P5-28>
- Vaz Jauri, P., & Kinkel, L. L. (2014). Nutrient overlap, genetic relatedness and spatial origin influence interaction-mediated shifts in inhibitory phenotype among *Streptomyces* spp. *FEMS Microbiology Ecology*, 90(1), 264–275. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12389>
- Wholey, W. Y., Kochan, T. J., Storck, D. N., & Dawid, S. (2016). Coordinated Bacteriocin Expression and Competence in *Streptococcus pneumoniae* Contributes to Genetic Adaptation through Neighbor Predation. *PLoS Pathogens*, 12(2), e1005413. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005413>
- Williams, D. H., Stone, M. J., Hauck, P. R., & Rahman, S. K. (1989). Why are secondary metabolites (Natural Products) biosynthesized. *Journal of Natural Products*, 52(6), 1189–1208. <https://doi.org/10.1021/np50066a001>
- Wintermute, E. H., & Silver, P. A. (2010). Emergent cooperation in microbial metabolism. *Molecular Systems Biology*, 6, 407. <https://doi.org/10.1038/msb.2010.66>
- Wright, E. S., & Vetsigian, K. H. (2016). Inhibitory interactions promote frequent bistability among competing bacteria. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms11274>
- Zapién-Campos, R., Olmedo-álvarez, G., & Santillán, M. (2015). Antagonistic interactions are sufficient to explain self-assembly of bacterial communities in a homogeneous environment: A computational modeling approach. *Frontiers in Microbiology*, 6(MAY), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00489>

Zarza, E., Alcaraz, L. D., Aguilar-salinas, B., Islas, A., & Olmedo-álvarez, G. (2018). crossm Complete Genome Sequences of Two *Bacillus pumilus* Strains. *Genome Announcements*, 6(17), 4–5. <https://doi.org/10.1128/GENOMEA.00364-18>

Zarza, E., Alcaraz, L. D., Aguilar-Salinas, B., Islas, A., & Olmedo-Álvarez, G. (2017). Complete Genome Sequence of *Bacillus horikoshii* Strain 20a from Cuatro Ciénegas, Coahuila, Mexico. *Genome Announcements*, 5(30), e00592-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00592-17>

Zomorodi, A. R., & Segrè, D. (2016). Synthetic Ecology of Microbes: Mathematical Models and Applications. *Journal of Molecular Biology*, 428(5), 837–861. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.10.019>