

**Universidad Autónoma de Querétaro**  
Facultad de Ciencias Naturales  
Licenciatura en Microbiología



## **ENSAMBLAJE DE UNA COMUNIDAD BACTERIANA SINTÉTICA MULTIESPECIE A PARTIR DE INTERACCIONES PAREADAS**

### **TESIS**

que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Licenciada en Microbiología

### **Presenta:**

Carmen Monserrat Anistro Romero

### **Dirigido por:**

Dra. Etzel Garrido Espinosa

Dra. Etzel Garrido Espinosa

Presidente

Dr. Roberto Carlos Álvarez Martínez

Sinodal Secretario

Dr. José Antonio Cervantes Chávez

Sinodal Vocal

Dra. Monica Eugenia Figueroa Cabañas

Sinodal Vocal

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Fecha de aprobación por el Consejo Universitario (mes y año)

México



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales  
de Información



ENSAMBLAJE DE UNA COMUNIDAD BACTERIANA  
SINTÉTICA MULTIESPECIE A PARTIR DE  
INTERACCIONES PAREADAS

**por**

Carmen Monserrat Anistro Romero

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons  
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

**Clave RI:** CNLIN-279474

# Índice

	2
<b>1.- Resumen</b>	<b>4</b>
1.1.- Summary	5
<b>2.- Introducción</b>	<b>6</b>
<b>3.- Antecedentes</b>	<b>7</b>
3.1.- Comunidades microbianas asociadas a plantas	7
3.2.- Comunidades microbianas foliares	8
3.3.- Comunidades bacterianas del filoplano	9
3.3.1.- Ensamblaje	9
3.3.2.- Dinámica comunitaria	10
3.3.3.- Estabilidad y funcionalidad	11
3.3.4.- Interacciones bacteria - bacteria	12
3.3.4.1.- interacciones antagónicas	12
3.3.4.2.- interacciones cooperativas	12
3.3.4.3 .- interacciones funcionales	14
3.3.4.4.- invasores	14
3.3.5.- Comunidades sintéticas	15
3.4.- Modelos matemáticos dinámicos	15
<b>4.- Hipótesis</b>	<b>18</b>
<b>5.- Justificación</b>	<b>18</b>
<b>6.- Objetivos</b>	<b>18</b>
6.1.- Objetivo general	18
6.2.- Objetivos particulares	18
<b>7.- Materiales y Métodos</b>	<b>19</b>
7.1.- Sistema de estudio	19
7.1.1.- Bacillus pumilus (e2)	19
7.1.2.- Sporosarcina sp. KP5-3 (e3) y Sporosarcina luteola (e4)	19
7.1.3.- Arthrobacter sp. (e9)	20
7.2.- Curvas de crecimiento bacteriano y conteo celular	21
7.3.- Comunidad sintética	21
7.2.1.- La perturbación	22
7.3.- Comunidad in silico	22
7.4.- Comunidad in vitro	22
7.5.- Análisis de datos	23
7.5.1.- Variables de respuesta	23
7.5.2.- Análisis estadístico	23
<b>8.- Resultados</b>	<b>24</b>
8.1.- Interacciones y tasas de crecimiento.	24
8.2.- Comunidad in silico	25
8.3.- Comunidad in vitro	27
8.2.1.- Bioensayos sin perturbación biótica	28

8.2.2.- Bioensayos con perturbación biótica	29
<b>9.- Discusión</b>	<b>31</b>
9.1.- Ensamblaje de la comunidad sintética	31
9.2.- Interacciones par vs. comunidad	32
9.2.1.- Modelo Lotka-Volterra	32
9.2.2.- Estabilidad y dinámica	33
9.2.2.1.- Propiedades emergentes	33
9.2.2.2- Perturbación	33
9.3.- Comunidades del filoplano	34
<b>10.- Conclusión</b>	<b>35</b>
<b>11.- Perspectivas</b>	<b>36</b>
<b>12.- Bibliografía</b>	<b>36</b>

# 1.- Resumen

Determinar los efectos de los diferentes factores involucrados en el establecimiento y ensamblaje de las comunidades microbianas sigue siendo un desafío en ecología microbiana. Las comunidades bacterianas multiespecíficas han sido las más estudiadas y uno de los grandes supuestos es que conociendo el resultado de todas las interacciones por pares se puede predecir cómo se forman y comportan las comunidades. Sabiendo que no necesariamente este supuesto se cumple, en esta tesis se puso a prueba la hipótesis de que conocer las interacciones pareadas en una comunidad sintética de baja diversidad nos permite predecir el comportamiento y la estabilidad de la misma. Además, se probó si la modificación al medio ambiente que las propias comunidades moldean es importante para lograr su estabilidad. Para esto, se combinó el modelaje matemático con bioensayos experimentales realizados con tres especies bacterianas previamente aisladas del filopiano de la planta *Datura innoxia*. Utilizando los parámetros de las interacciones por pares; la competencia intraespecífica y, la tasa de crecimiento se generó un modelo Lotka-Volterra generalizado para la comunidad sintética. Los valores de estos parámetros fueron obtenidos *in silico*. Posteriormente, se realizaron bioensayos que consistieron en manipular tanto la presencia de una perturbación biótica como hacer un recambio del medio de cultivo. La perturbación se realizó introduciendo una cuarta especie a la comunidad, mientras que el recambio del medio se llevó a cabo cada dos horas. En general, los resultados del modelo y de los bioensayos muestran que, después de una a dos horas, se alcanza una dinámica estable con coexistencia pero con diferencias en las abundancias relativas. Es decir, las comunidades *in silico* e *in vitro* presentaron diferencias en su estructura lo que cambió su estabilidad. Al comparar la dinámica comunitaria entre los ensayos se encontró que cuando no se realizó el recambio de medio, la comunidad es más estable y las propiedades emergentes como la resiliencia y resistencia son más evidentes. Los resultados de esta tesis comprueban la hipótesis de que un gradiente en las interacciones pareadas promueve el ensamblaje de una comunidad, pero la modificación al medio de cultivo es fundamental para que las comunidades alcancen la estabilidad. En esta tesis se muestra la importancia de considerar tanto factores bióticos como abióticos en el establecimiento y estabilidad de las comunidades bacterianas.

## 1.1.- Summary

Determining the effects of both biotic and abiotic factors involved in the establishment and assembly of microbial communities remains a challenge in microbial ecology. Multispecies bacterial communities have been extensively studied under the prevailing assumption that understanding all the pairwise interactions can predict how communities form and behave. However, because this assumption does not always hold true, this thesis sets out to test the hypothesis that knowing all the pairwise interactions in a low-diversity synthetic community enables the prediction of how the community will behave and thus if it will be stable. Additionally, this thesis explores whether modifications to the environment, shaped by the communities themselves, are crucial for achieving this stability. To address these questions, a mathematical modeling was combined with experimental bioassays using three bacterial species previously isolated from the phylloplane of the plant *Datura innoxia*. A generalized Lotka-Volterra model was generated for the synthetic community based on parameters such as the pairwise interactions, intraspecific competition, and growth rate, all obtained *in silico*. Subsequently, bioassays were conducted, involving the manipulation of both the presence of a biotic perturbation (by introducing a fourth species to the community) and the replacement of the culture medium every two hours. Overall, the results from both the model and the bioassays demonstrate that stable dynamics with coexistence are achieved within one to two hours, albeit with differences in relative abundances between the *in silico* and *in vitro* communities, impacting their stability. Comparing community dynamics between trials reveals that when the medium change was not performed, the community exhibits greater stability, with emergent properties such as resilience and resistance becoming more evident. This thesis supports the hypothesis that a gradient in pairwise interactions promotes community assembly, but underscores the critical importance of modifications to the growing medium for communities to attain stability. It emphasizes the necessity of considering both biotic and abiotic factors in the establishment and stability of bacterial communities.

## 2.- Introducción

Es universalmente aceptado que la vida surgió hace 3500 millones de años dado que hasta ese momento es posible rastrear la evidencia fósil; sin embargo, existen estudios que señalan el surgimiento de la vida hasta 600 millones de años antes (Pearce et al., 2018). Desde entonces, la vida ha seguido evolucionando dando como resultado la gran biodiversidad que nos rodea. La evolución de todos los organismos ha tenido como punto de partida al último ancestro común universal (LUCA por sus siglas en inglés). Muy probablemente, LUCA fue un microorganismo unicelular, procariota primitivo y extremófilo dada su capacidad para sobrevivir y prosperar en la Tierra primitiva (Cornish-Bowden & Cárdenas, 2017). Los seres vivos actuales más parecidos a LUCA son aquellos pertenecientes a los dos dominios procariotas: archaea y bacteria. La presencia de organismos pertenecientes a estos dos grupos es ancestral a tal punto que han logrado prosperar incluso en los ambientes más inhóspitos de nuestro planeta. Así, su distribución cosmopolita hace que la interacción entre estos microorganismos y, la interacción de éstos con otros organismos eucariontes resulte inevitable. A lo largo de la historia evolutiva las interacciones entre microorganismos han llevado al establecimiento de comunidades muy diversas, las cuales pueden asentarse sobre superficies inertes y vivas, modificando no sólo su medio ambiente sino alterando el comportamiento y metabolismo de sus integrantes (McFall-Ngai, 2008; Song et al., 2019). El efecto que tienen diversos factores bióticos y abióticos en el establecimiento, la diversidad y la estabilidad de estas comunidades microbianas sigue sin ser entendido en su totalidad. Por esta razón, en esta tesis se evaluaron, teórica y experimentalmente, las consecuencias de una perturbación biótica y abiótica en el ensamblaje y estabilidad de una comunidad sintética bacteriana.

Los microorganismos son componentes vitales de todos los ecosistemas y, dada su distribución cosmopolita se ha postulado que todos los microorganismos se encuentran de forma homogénea en todas partes siendo el medio ambiente el factor principal que regula su distribución (De Wit & Bouvier, 2006). De esta forma, esta hipótesis señala la importancia del contexto ecológico en el establecimiento de las comunidades microbianas. La composición y estructura de las comunidades microbianas varía espacial y temporalmente (Zamora et al., 2012) debido a las diferentes presiones de selección ejercidas por factores tanto bióticos como abióticos (Juby et al., 2021). Es decir, según el hábitat en el que se encuentra la comunidad microbiana ésta adquiere características particulares dependiendo de la abundancia relativa (i.e. estructura) de sus integrantes (i.e. composición) y de la función ecológica de cada uno. Al mantener estas características, las comunidades microbianas forman sistemas estables con propiedades emergentes como la resiliencia y la resistencia (Tellez, 2017). En general, se ha propuesto que la estabilidad de una comunidad microbiana suele darse en ambientes poco variables (Redford & Fierer, 2009). Por ejemplo, las comunidades de endófitos que viven dentro de los tejidos de las plantas son consideradas más estables dado que se encuentran en un ambiente en homeostasis y protegidas de las variaciones ambientales (Yao et al., 2020). Por el contrario, aún se desconoce si las comunidades de epífitos que se encuentran en la superficie vegetal, expuestas al medio ambiente y a condiciones oligotróficas, logran alcanzar la estabilidad

(Koskella, 2020; Redford & Fierer, 2009) o solo son transitorias, quizás en un estado de latencia e inactividad metabólica (Wisnoski et al., 2020).

Las bacterias son los microorganismos más abundantes de las comunidades epífitas (Lindow & Brandl, 2003). Las bacterias epífitas son capaces de mediar rasgos funcionales de las plantas, proveyendo nuevas capacidades bioquímicas y alterando vías de señalización ya existentes (Friesen et al., 2011). Todos estos efectos pueden resultar en plasticidad fenotípica que permite la expansión de su nicho y procesos evolutivos (Baltrus, 2017) o coevolutivos en *sensu lato* (Seidl & Thomma, 2017). Además, estas bacterias contienen plásmidos altamente diversos con tasas de transferencia también altas por lo que, fenotípicamente, se consideran inestables (Lindow & Brandl, 2003). Sin embargo, es precisamente esta inestabilidad lo que les permite responder rápidamente a cambios ambientales en temperatura, humedad y radiación UV (Lindow & Brandl, 2003; Remus-Emsermann et al., 2012) así como a las presiones de selección por parte de su planta huésped (Barnett et al., 2020; Friesen et al., 2011), a la interacción con los miembros de la comunidad y al arribo constante de nuevos interactuantes (Rivett et al., 2018; Ruhe et al., 2013). La complejidad de factores a los que se encuentran expuestas las comunidades epífitas hace que sea fundamental conocer la importancia relativa de cada uno de éstos en la formación y estabilidad de las comunidades. Estudios previos han identificado molecularmente y aislado varias especies de bacterias epífitas del filopiano de *Datura innoxia* (Morán, 2023). Esta planta es una especie nativa, perenne, con propiedades medicinales y de alta toxicidad que se encuentra distribuida desde el sur de los Estados Unidos hasta Honduras, Nicaragua, Antillas y Sudamérica (Vibrans et al., 2009). Se ha propuesto que la interacción de esta planta con su insecto herbívoro especialista, *Lema daturaphila*, podría estar mediada por las comunidades bacterianas epífitas (Mayoral-Peña, 2023). Si las comunidades bacterianas asociadas a las hojas son el primer contacto que tiene el insecto con la planta, entonces resulta fundamental entender cómo se establecen y mantienen dichas comunidades. Combinando el modelaje matemático con bioensayos experimentales se propuso construir una comunidad bacteriana multiespecie sintética para evaluar cómo dicha comunidad responde a perturbaciones bióticas (i.e. la llegada de nuevas especies a la comunidad) y abióticas (i.e. modificación del medio de crecimiento).

## 3.- Antecedentes

### 3.1.- Comunidades microbianas asociadas a plantas

Históricamente, los microorganismos se han estudiado a partir de cultivos axénicos. Si bien esta aproximación experimental ha sido muy útil para el desarrollo en áreas como la bioquímica y biología molecular, para comprenderlos por completo es necesario estudiarlos en su contexto ecológico. Los microorganismos se encuentran de manera natural formando comunidades, las cuales son ensambles de poblaciones microbianas que interactúan entre sí y con el ambiente (Zamora et al., 2012). Al interactuar con el ambiente lo pueden hacer estableciéndose sobre superficies vivas o inertes. Las comunidades microbianas varían estructural y funcionalmente acorde al nicho ecológico en el que se encuentren. La estructura de una comunidad puede ser descrita en términos de diversidad taxonómica, genética y funcional. La diversidad funcional de una comunidad depende del efecto



ecológico que tiene en su ambiente según las capacidades bioquímicas de sus integrantes y de sus interacciones. Los efectos de la diversidad funcional van desde modificar el fenotipo de los microorganismos miembros de dicha comunidad e incluso a otras comunidades microbianas alterando físicoquímicamente su medio ambiente hasta cambiar el fenotipo del organismo huésped (Friesen et al., 2011; Tellez, 2017). Así los efectos ecológicos de las comunidades bacterianas abarcan órdenes de magnitud, por ejemplo, al ser responsables de la oxigenación atmosférica y jugar un papel fundamental en ciclos biogeoquímicos como el ciclo del carbono, nitrógeno, fósforo y azufre (Stubbendieck et al., 2016; Tellez, 2017).

El efecto de las interacciones entre organismos ha moldeado la vida. En plantas, la interacción con microorganismos se postula como clave para el surgimiento de las plantas terrestres (Lopez, 2019). En la actualidad estas interacciones son omnipresentes, generando holobiontes. Los holobiontes son entidades que interactúan como unidad, a pesar de estar formados por organismos de diferentes especies (Lemanceau et al., 2017). En este caso, una planta y todos sus microorganismos asociados son considerados un holobionte. Los microorganismos asociados a plantas suelen ser clasificados por el tipo de interacción y el hábitat en el que se encuentran. De acuerdo al tipo de interacción los microorganismos pueden ser clasificados como antagonistas, si son causantes de enfermedades, o como cooperadores, si alteran rasgos fisiológicos de la planta que puedan promover su crecimiento (Juby et al., 2021). Por otro lado, dependiendo de la zona del tejido en el que habitan, los microorganismos pueden ser denominados endófitos, si se encuentran en el interior de los tejidos, o epífitos si se encuentran en la superficie (Yao et al., 2020). Además, las comunidades de microorganismos pueden estar asociadas a diferentes partes de la planta, por ejemplo, raíces, tallos, hojas, flores y frutos. Históricamente, la rizosfera, la zona asociada al suelo y las raíces, es la comunidad en la que se han enfocado la mayoría de las investigaciones sobre la ecología y evolución de las interacciones planta-microorganismo. Sin embargo, estas interacciones también se dan en las zonas aéreas, denominada filosfera. Ambas clasificaciones no son excluyentes pero son deterministas ya que el efecto de las interacciones y de las características de las comunidades microbianas son dependientes del contexto ecológico. Esto permite que acorde a las relaciones de costo beneficio y el equilibrio de virulencia-resistencia, los microorganismos puedan comportarse en un espectro de relaciones antagónicas a cooperativas (Partida-Martínez & Heil, 2011).

### 3.2.- Comunidades microbianas foliares

En la filosfera pueden establecerse comunidades microbianas de manera diferencial según la zona de la filosfera colonizada y el ambiente interno o externo que habiten. La filosfera es el hábitat que consiste en la totalidad de las partes aéreas de las plantas. Este hábitat se subdivide acorde a la estructura a la que nos referimos: en el tallo recibe el nombre de caulosfera; en las hojas, filoplano; en las flores, atmósfera y, en los frutos se llama carposfera (Juby et al., 2021). Los microbios que residen en estos ambientes se clasifican como endófitos y epífitos. Los endófitos viven asintóticamente en los tejidos de las plantas, en un ambiente estable pero selectivo debido a la limitación de recursos (Yao et al., 2019). La transmisión de los endófitos suele darse de manera vertical, a través de la semilla, por lo que se acepta que la microbiota endófito puede ser heredable. En cambio, los microbios epífitos son aquellos que habitan en la superficie de los tejidos de la planta (Yao et al., 2019). El ambiente en la superficie es oligotrófico, lo que provoca que los epífitos tengan alta competencia intraespecífica por los recursos (Aguilar Salinas, 2018) los cuales

proviene de deposiciones aéreas o exudados de la planta (Koskella, 2020; Yao et al., 2019). Los microbios epífitos han adquirido estrategias como la lixiviación, la modificación de la cutícula cerosa de las hojas, secreción de sustancias tensoactivas o la generación de poros en las células vegetales para generar la fuga de sacáridos y aumentar la disposición de recursos (Lindow & Brandl, 2003). Sin embargo, existen sitios discretos en la superficie foliar que posiblemente no puedan ser colonizados debido a que los nutrientes no se distribuyen uniformemente, lo que genera microambientes con gradientes de recursos y condiciones ambientales (Remus-Emsermann et al., 2012). Además, los epífitos se encuentran bajo presiones de selección por parte del huésped y del ambiente. El huésped puede ejercer presiones de selección en sus epífitos de manera pasiva según su morfología y fisiología (Juby et al., 2021); mientras que, factores abióticos como la temperatura, humedad y radiación UV pueden ser determinantes para la sobrevivencia de estos microbios, así como la interacción con otras plantas, animales y microorganismos. El ambiente externo, propicia la dispersión de los epífitos, ya sea por deposiciones aéreas o salpicaduras de agua, así como por medio de vectores. Dada su transmisión horizontal, la microbiota epífita no es heredable parentalmente; sin embargo, podría haber herencia ecológica. La herencia ecológica se refiere a la construcción o modificación del nicho por parte de los ancestros genéticos o ecológicos, lo que cambia las presiones de selección al no enfrentarse a un ambiente de *novo* (Cerqueda-García & Falcón, 2016), en este caso al tener mayor probabilidad de asociación con determinados microorganismos. Tanto microbios endófitos como epífitos conforman la microbiota de la filosfera, influyendo en el crecimiento, fisiología y la salud de la planta (Lemanceau et al., 2017). Las hojas son las estructuras más abundantes de la filosfera, seguidas por tallos, flores y frutos, siendo así congruente que las bacterias, los microbios más abundantes y diversos en el filoplano, también lo sean en toda la filosfera (Juby et al., 2021; Lindow & Brandl, 2003).

### 3.3.- Comunidades bacterianas del filoplano

Las bacterias interactúan dentro y entre especies mientras responden a estímulos externos, siendo capaces de expresar diferencialmente sus genes para crecer en entornos específicos y formar comunidades bacterianas altamente diversas (Stubbendieck et al., 2016). En términos estructurales, las comunidades bacterianas divergen en el número de unidades taxonómicas que las componen, así como en sus abundancias relativas (Nemergut et al., 2013). La estructura comunitaria es moldeada dinámicamente a partir del ensamblaje, proceso dependiente del contexto ecológico en el cual se forman dichas comunidades.

#### 3.3.1.- Ensamblaje

El ensamblaje de comunidades bacterianas es dinámico y, en un sentido amplio, está dado por dos procesos: el azar y el determinismo. En el marco de la ecología microbiana existen hipótesis y teorías que buscan dilucidar el proceso del ensamblaje de comunidades bacterianas a partir de múltiples mecanismos siendo éstos deterministas o estocásticos. Los mecanismos estocásticos son la inmigración, emigración, deriva genética, especiación y extinción (Langenheder & Székely, 2011). En particular, la deriva ecológica ocurre en ausencia de selección, cuando los individuos mueren y crecen al azar en un espacio determinado; la dispersión probabilística tiene un efecto homogeneizante al tener una tasa de dispersión muy alta entre comunidades y, la diversificación evolutiva resulta de la

divergencia adaptativa y deriva genética (Barnett et al., 2020; Luan et al., 2020). Estos mecanismos estocásticos son embebidos en la hipótesis neutral, la cual asume que las especies son ecológicamente equivalentes. Es decir, las especies comparten rasgos y éxito reproductivo similares, por lo que la estructura de la comunidad está determinada por procesos aleatorios, estocásticos o en el marco de esta hipótesis, neutrales (Burke et al., 2011; Langenheder & Székely, 2011; Nemergut et al., 2013). En contraposición a esta hipótesis se encuentra la teoría de nichos. Esta teoría asume que a partir de mecanismos deterministas se da la estructura comunitaria (Yang et al., 2022). Dichos mecanismos están dados por factores bióticos y abióticos, incluyendo interacciones interespecíficas. Los mecanismos son: la selección ecológica; la clasificación de especies que destaca las diferencias en fitness entre organismos; el filtrado ambiental que impide se establezcan especies sin ciertos rasgos fisiológicos en las comunidades locales y, la dinámica de parches el cual se centra en la dinámica de colonización-extinción entre parches idénticos y considera el efecto de masa **el cual considera la influencia que tiene la densidad o concentración de microorganismos en un ambiente determinado sobre las interacciones y procesos que ocurren dentro de esa comunidad** (Jiao et al., 2020; Langenheder & Székely, 2011; Luan et al., 2020; Walsh et al., 2021). Sin embargo, los procesos ecológicos, estocásticos y deterministas no son mutuamente excluyentes pues simultáneamente desempeñan un papel importante en el mantenimiento de especies a nivel local y global (Luan et al., 2020). La hipótesis de la lotería incorpora la neutralidad y funcionalidad sosteniendo que los nichos ecológicos son colonizados aleatoriamente a partir de un conjunto de especies con función ecológica similar que pueden coexistir en ese nicho. La hipótesis se deriva del estudio de comunidades eucariotas, pero en una comunidad bacteriana implica que existen gremios de bacterias cuyos miembros son funcionalmente equivalentes mientras que la composición de especies en una comunidad se determina estocásticamente (Burke et al., 2011). Lo anterior concuerda con la teoría de la coexistencia moderna, basada tanto en teoría de nichos como en la teoría neutral, que enuncia que la coexistencia requiere pequeñas diferencias de fitness y grandes diferencias de nicho (Blackstone, 2023; Jiao et al., 2020). Además, la observación de grupos funcionales, definidos como conjunto de organismos que muestran una respuesta similar al ambiente o tienen un efecto similar sobre la mayoría de procesos ecosistémicos, en comunidades bacterianas (Zamora et al., 2012) corrobora la hipótesis de la lotería.

La importancia relativa de los procesos estocásticos y deterministas en el ensamble de las comunidades bacterianas es dependiente del contexto ecológico pues la composición de las comunidades está influenciada por efectos heredados que surgen de eventos bióticos y abióticos que ocurren en el pasado (Langenheder & Lindström, 2019). Sin embargo, se ha observado que el ensamble comunitario inicialmente es impulsado por procesos estocásticos, mientras que los procesos deterministas dominan más adelante en la sucesión. Dicha observación se ha realizado en ambientes prístinos, estériles y perturbados (Barnett et al., 2020; Yang et al., 2022). Además, en comunidades bacterianas asociadas a plantas se ha observado una jerarquía en las fuerzas de ensamblaje. Por ejemplo, el ensamblaje del microbioma de plántulas está encabezado por la selección del huésped predominando los factores deterministas sobre la estocacidad (Walsh et al., 2021).

### 3.3.2.- Dinámica comunitaria

Las comunidades bacterianas estables siguen patrones de sucesión predecibles y repetibles. La sucesión se debe a cambios que ocurren en el ecosistema y tiene efecto en la

composición de especies (Redford & Fierer, 2009). Es decir, en la estructura comunitaria el fenómeno de sucesión es conocido como dinámica comunitaria. El estudio de la dinámica comunitaria, tiene como finalidad entender los cambios en los patrones de la comunidad, tanto en el espacio como en el tiempo, así como los mecanismos detrás de estos cambios (Kinkel, 1997). En conjunto, los mecanismos que median la dinámica comunitaria permiten, mediante la sucesión de especies, una estructura óptima con mayor estabilidad que posibilita la persistencia (Valentín-Vargas et al., 2012). En el periodo de sucesión, también conocido como clasificación ecológica, las poblaciones bacterianas estabilizan su nicho ecológico mediante la respuesta a estímulos abióticos y el establecimiento y modificación de interacciones bióticas. Se ha observado que las interacciones negativas entre bacterias a medida que la comunidad se estabiliza se vuelven más neutrales y se postula que se comienza a favorecer la cooperación (Rivett et al., 2018). En el mismo sentido, la integración de invasores a comunidades bacterianas residentes es más probable y tiene un mayor impacto en la estructura comunitaria al ser una invasión temprana, lo que además concuerda con los efectos de prioridad. Los efectos de prioridad significan la posibilidad de utilizar recursos existentes, permitiendo la monopolización de nutrientes así como la generación de nichos ecológicos a los miembros de la comunidad (Rivett et al., 2018). Ambas observaciones reflejan que las comunidades bacterianas pueden agruparse por “edades”; es decir, acorde al proceso de sucesión (Redford & Fierer, 2009).

### 3.3.3.- Estabilidad y funcionalidad

Durante la sucesión de la comunidad, los rasgos funcionales han sido claves para conocer el patrón de ensamblaje de las comunidades bacterianas y su posterior estabilidad, pues las características funcionales son menos variables que la composición de especies (Ren et al., 2020) teniendo una fuerte relación entre estructura y función en comunidades complejas (Rivett et al., 2018). Sin embargo, la diversidad de especies está correlacionada positivamente con la estabilidad (Xiong et al., 2022), lo que se puede explicar debido a la redundancia funcional comunitaria, ya que la estabilidad no es resultado de la diversidad *per se*, sino de la redundancia funcional que es asegurada por la reserva de especies capaces de realizar la misma función ecológica (Valentín-Vargas et al., 2012). Lo que corrobora el supuesto de la hipótesis de la lotería, que señala la existencia de un conjunto central de genes funcionales presentes en todas las comunidades de un hábitat particular, independientemente de la composición taxonómica o filogenética. Esto es especialmente favorecido en comunidades bacterianas debido a estrategias de intercambio genético como la transferencia horizontal de genes (Burke et al., 2011). Así, la funcionalidad de cada especie en la comunidad puede ser mediada por sus vecinos (Rivett et al., 2018) generando intrincadas redes de interacciones funcionales que propician el surgimiento de propiedades intrínsecas de la comunidad. El término de propiedades intrínsecas de la comunidad está inspirado en el fenómeno de propiedades emergentes de sistemas complejos, las cuales son definidas como aquellas que no pueden extrapolarse linealmente basándose en la suma de las partes del sistema (Madsen et al., 2018). Las propiedades intrínsecas de la comunidad es el término mayormente utilizado en la microbiología para referirse, de forma global, a las propiedades emergentes de resistencia y resiliencia de las comunidades microbianas que permiten mantener la estructura y función a lo largo del tiempo en ecosistemas dinámicos.

### 3.3.4.- Interacciones bacteria - bacteria

La teoría ecológica predice que las especies sólo pueden coexistir si la competencia intraespecífica es mayor que la interespecífica (Leinweber et al., 2017). Es decir, la coexistencia requiere pequeñas diferencias de fitness y grandes diferencias de nicho (Blackstone, 2023). Es ampliamente aceptado que la ley de Gause o el principio de exclusión competitiva y por tanto las interacciones antagónicas son las interacciones que impulsan el ensamblaje de comunidades no siendo la excepción las comunidades bacterianas. El principio de exclusión competitiva, promueve una diversidad baja, a pesar de esto, las comunidades naturales, son altamente diversas. Esta aparente contradicción fue descrita por primera vez por G. Evelyn Hutchinson en 1961 y nombrada como la paradoja del Plancton. Esta paradoja señala que aunque en el ambiente haya una fuerte competencia, es posible la coexistencia (Hutchinson, 1961). Así, las interacciones antagónicas no dejan de ser importantes, sin embargo; los organismos pueden desarrollar dentro de la comunidad diversas estrategias que también impulsan el ensamblaje de las comunidades. Estas estrategias pueden ser, la generación o partición de nichos ecológicos, la variabilidad ambiental que momentáneamente puede favorecer a determinados organismos, adaptaciones especialistas y la modificación de las interacciones bióticas (Record et al., 2014; S. Roy & Chattopadhyay, 2007).

#### 3.3.4.1.- interacciones antagónicas

Las interacciones antagónicas son clasificadas como interacciones competitivas, de presa-depredador y amensalistas. Las interacciones de depredación directa y el amensalismo entre bacterias es raro, sin embargo; está presente (Butler & O'Dwyer, 2018; Palmer & Foster, 2022). La competencia de interferencia, o directa, entre bacterias se da mediante la secreción de toxinas y bacteriocinas; mientras que la, competencia indirecta, o explotativa, se da por la competencia de recursos (Becker et al., 2012). La competencia, ya sea directa o indirecta, preserva la comunidad al prevenir invasiones (Aguilar Salinas, 2018; Becker et al., 2012). Sin embargo, estas interacciones se intensifican cuando hay alta densidad bacteriana, competencia por espacio, traslape de recursos y limitación de los mismos, lo que evita la partición de nicho generando que la competencia reduzca el funcionamiento de la comunidad y pueda dirigirla al colapso (Becker et al., 2012). Este escenario se presenta en biopelículas, las cuales a pesar de tener las condiciones idóneas para observar una alta competencia bacteriana presentan un comportamiento cooperativo, el cual ha sido explicado por plasticidad fenotípica. Las bacterias tienen alta plasticidad fenotípica debido a los genes auxiliares que son responsables de su adaptación local y se pueden transferir horizontalmente entre especies por distintas estrategias, entre las que destaca la transferencia horizontal de genes (Andreote et al., 2009). De esta forma, el fenotipo depende del contexto ecológico y la coexistencia se da, no solo por la disimilitud que reduce la competencia por recursos, sino por los diferentes fenotipos que conducen a capacidades biosintéticas complementarias (Zelezniak et al., 2015). De esta forma, se ha propuesto a las interacciones de cooperación como impulsoras de la coevolución y el ensamblaje de comunidades bacterianas (Mataigne et al., 2021).

#### 3.3.4.2.- interacciones cooperativas

La cooperación bacteriana puede ser clasificada en mutualismo, comensalismo, sintrofismo y parasitismo. El mutualismo puede ser obligado o no, el comensalismo depende de la

alimentación cruzada acorde a la direccionalidad de la misma (Mataigne et al., 2021) y el sintrofismo y el parasitismo han sido denominados tramposos sociales (Freilich et al., 2011). En este tipo de interacciones la carga metabólica se divide entre los miembros de la comunidad por lo que la interacción suele ser por intercambio de metabolitos tal como se propone en la hipótesis de la reina negra. Esta hipótesis enuncia que las comunidades bacterianas cooperativas surgen a partir de fugas de recursos que tienen algunas funciones bacterianas, lo que genera recursos de uso público y que quien usa dichos recursos se beneficia al racionalizar su genoma, evitando el gasto energético que esto representa (Sachs & Hollowell, 2012). Esta hipótesis, además, ayuda a explicar el hecho de que genomas bacterianos grandes están asociados a estrategias competitivas mientras que genomas pequeños se relacionan con cooperación (Hesse & O'Brien, 2024; Mataigne et al., 2021). El fenómeno descrito en la hipótesis de la reina negra, al cual se le denominaría posteriormente como alimentación cruzada, puede ser clasificado como mutualismo si es bidireccional y comensalismo si es unidireccional. Al igual que todas las interacciones simbióticas la alimentación cruzada no se limita a pares de bacterias, significando que varias especies pueden ser receptoras o productoras generando una red de interacciones que permite la degradación y aprovechamiento de moléculas complejas (Mataigne et al., 2021). De esta forma, las interacciones pueden ser intra e interespecíficas, siendo más común entre especies debido al uso divergente de recursos (Sachs & Hollowell, 2012). El sintrofismo se refiere al mismo mecanismo de interacción pero el organismo receptor debe ser auxótrofo, lo que sugiere que muchas bacterias no pueden crecer en un ambiente axénico debido a la dependencia obligada entre especies, destacando los efectos dramáticos que especies clave pueden tener en la comunidad debido a la jerarquía en la importancia de la alimentación cruzada y el sintrofismo (Mataigne et al., 2021; Stubbendieck et al., 2016).

Mediante la simulación de comunidades bacterianas a partir de interacciones cooperativas pareadas se ha demostrado que dichas comunidades son inestables a excepción que las interacciones sean simétricas (Butler & O'Dwyer, 2018), lo que es sumamente probable al considerar a los fenotipos tramposos como cooperadores parciales y no tramposos canónicos. En una comunidad cooperativa los bienes públicos generados por fenotipos bacterianos denominados cooperadores pueden ser utilizados por otros miembros de la comunidad, los cuales se denominan receptores. Los receptores pueden ser llamados tramposos sociales si el fitness del receptor disminuye el fitness del cooperador, estando por encima o por debajo del fitness promedio de la población, lo que permite la selección de tramposos, perjudicando la estrategia cooperativa (García-Contreras & Loarca, 2021). Sin embargo, en el marco teórico del sintrofismo los tramposos pueden ser receptores y a la vez cooperadores, por lo que la fijación de "trampas" podría definirse como la fijación de la estrategia cooperativa. En las comunidades naturales, las interacciones metabólicas son difíciles de evidenciar ya que los metabolitos no pueden atribuirse específicamente a un donante o a una fuente abiótica (Zelezniak et al., 2015). Dada la alta diversidad es probable que algunos o todos los miembros de la comunidad expresen simultáneamente varios fenotipos tramposos (García-Contreras & Loarca, 2021) los cuales ofrecen a los cooperadores beneficios, contribuyendo a la estabilidad de la cooperación bacteriana. Es decir, la optimización de recursos mantiene la abundancia de los cooperadores baja y evita la sobreproducción de bienes públicos que pueden resultar perjudiciales a la población. Por ejemplo, los fenotipos tramposos presentan generalmente quorum sensing defectuoso, por lo que son más propensos a quedar desprotegidos ante factores de estrés abióticos o bióticos, como infecciones por bacteriófagos, lo que promueve

la sobrevivencia de los fenotipos cooperadores. Así, el engaño social es un mecanismo que puede mantener la diversidad, favoreciendo la coexistencia y propiedades como la resiliencia y resistencia (García-Contreras & Loarca, 2021; Leinweber et al., 2017).

### 3.3.4.3 .- interacciones funcionales

La simbiosis, entendida como cualquier asociación de cualquier tipo dada entre organismos vivientes (Hilje, 1984) en la que a los participantes se les denomina simbioses se ha clasificado en función del beneficio obtenido por uno de los simbioses (Suárez, 2018). De forma que hay interacciones cooperativas o beneficiosas, neutrales y antagónicas o desventajosas (Zuñiga et al., 2017). Estas asociaciones en comunidades bacterianas, también han sido descritas en términos de funcionalidad, teniendo interacciones funcionales positivas y negativas según el funcionamiento de la comunidad en el ecosistema y su relación con las abundancias de especies bacterianas. Cuando la comunidad bacteriana cumple su función ecosistémica, las abundancias de las bacterias con interacciones funcionales positivas se ven aumentadas y viceversa para las interacciones funcionales negativas. Las interacciones funcionales positivas se han asociado a taxones raros y las negativas a taxones abundantes (Rivett et al., 2018). Sin embargo, los taxones raros a pesar de su baja abundancia funcionan como buffers contra las fluctuaciones ambientales al interactuar con los taxones abundantes en mayor medida que con otros taxones raros (Yang et al., 2022). Así, al ser los taxones raros ensamblados en la comunidad, principalmente por factores deterministas, a diferencia de los taxones abundantes que son ensamblados por factores estocásticos (Liao et al., 2016), se logra mantener la estructura y funcionalidad de la comunidad.

### 3.3.4.4.- invasores

Las interacciones en una comunidad bacteriana pueden ser alteradas por múltiples factores bióticos. Para fines de esta tesis, son particularmente importante las invasiones. Las comunidades bacterianas de vida libre y epífitos asociados a un huésped están expuestos a constantes eventos de invasión. Es probable que múltiples invasiones simultáneas sean la norma debido a la dispersión pasiva, su pequeño tamaño y el desarrollo de estrategias de persistencia que amortiguan las transiciones ambientales al debilitar la fuerza de clasificación de especies. El éxito de los invasores depende de la interacción entre los invasores, la comunidad residente y el medio ambiente, siendo la alteración de interacciones entre especies residentes lo que mayormente explica el establecimiento del invasor (Rivett et al., 2018). Las bacterias con estrategias de dispersión pueden ser metabólicamente inactivas o activas con efectos diferenciales en la comunidad, por lo que la dispersión entre hábitats afecta la actividad metabólica (Wisnoski et al., 2020). Cuando los invasores son metabólicamente activos suelen adoptar estrategias competitivas, como la inhibición, para lograr establecerse en la comunidad. La inhibición es un mecanismo que promueve la “supervivencia de lo común” y genera selección dependiente de la frecuencia positiva (Wright & Vetsigian, 2016). De esta forma, el establecimiento de la especie invasora se ve influenciado, en gran medida, por la cantidad de inóculo y por la tasa de producción de biomasa (Freilich et al., 2011; Wright & Vetsigian, 2016), siendo más probable el establecimiento a mayor inóculo y mayor producción de biomasa.

### 3.3.5.- Comunidades sintéticas

Barbara Hobo utilizó por primera vez el término “Biología sintética” en 1980 para describir bacterias modificadas genéticamente, fungiendo como sinónimo de bioingeniería. Sin embargo, este término ha ido evolucionando siendo utilizado como una extensión del concepto de química biomimética ya que intenta recrear propiedades emergentes propias de los seres vivos (Benner & Sismour, 2005). Actualmente, el término se acepta como la síntesis de sistemas complejos de base biológica o inspirados, que denotan funciones inexistentes en la naturaleza, de forma que se extrae de los seres vivos partes intercambiables utilizadas como unidades de construcción (Benner & Sismour, 2005; Serrano, 2007). Dichas unidades de construcción son partes estandarizadas (aminoácidos, bases nitrogenadas, proteínas, genes, vías de señalización, células, etc.) cuyas propiedades han sido caracterizadas. En la ecología microbiana, el enfoque de la biología sintética ha sido utilizado para generar lo que conocemos como comunidades sintéticas, las cuales son constructos generados a partir de especies microbianas conocidas (Widder et al., 2016). Las comunidades sintéticas utilizadas en estudios ecológicos permiten abordar la complejidad de la comunidad de manera progresiva, al facilitar la comprensión detallada de subconjuntos de la comunidad y, al combinar dichos subconjuntos, generar predicciones sobre comunidades naturales (Rodríguez Amor & Dal Bello, 2019). El ensamblaje *de novo* de comunidades microbianas de baja diversidad permite comprender los principios de organización y dinámica comunitaria, así como controlar las interacciones microbianas, los efectos no lineales dados por la adición de miembros a la comunidad y los cambios evolutivos. Al tener mayor control del sistema, se ha logrado la medición exhaustiva de parámetros cinéticos y de interacciones para comunidades complejas (Widder et al., 2016), logrando la simplificación del análisis y modelado de comunidades.

### 3.4.- Modelos matemáticos dinámicos

Comprender el fenómeno de la vida, así como la interacción entre los seres vivos con el ambiente hace que las ciencias biológicas requieran una visión integradora de múltiples disciplinas, como la química, física y matemáticas. En el sentido matemático, los seres vivos, sus poblaciones y comunidades, pueden ser entendidos como sistemas complejos. Un sistema puede definirse como un conjunto de objetos que interactúan formando un todo (Salisbury, 2011), siendo un sistema complejo aquel que presenta propiedades emergentes, las cuales son patrones o funciones que no pueden deducirse linealmente a partir de las propiedades de las partes u objetos constituyentes del sistema (van den Berg et al., 2022) y que otorgan características ecológicas importantes, como la resiliencia, expansión y partición de nichos, y la autoorganización espacial. En la ecología de comunidades se sabe que dichas propiedades se dan como consecuencia de interacciones dentro de la comunidad y su naturaleza no lineal hace que el modelado matemático sea necesario para entender a las comunidades (van den Berg et al., 2022) dado que al no poder comprender toda la complejidad, construir un modelo nos da la esperanza de encontrar la esencia del sistema.

Un modelo es una visión simplificada de algo más complejo (Lehman et al., 2019), es decir, el estudio de un fenómeno del mundo real mediante la creación de entidades hipotéticas simplificadas (Knuuttila & Loettgers, 2017). En la dinámica de poblaciones existen dos estrategias principales de modelado dinámico: el enfoque de tiempo continuo y el enfoque de tiempo discreto. Ambos enfoques asumen una escala de tiempo corta en la



que los cambios evolutivos y las mutaciones no afectan el crecimiento de la población, variando el número de individuos en la población por la tasa de natalidad, mortalidad, recursos disponibles e interacciones bióticas, es decir el contexto social. En esta tesis se utilizó el modelo generalizado Lotka-Volterra, el cual es un modelo con enfoque de tiempo continuo, útil para determinar el destino de una población a partir de las interacciones bióticas (Dilão, 2006). La base de modelos de interacción entre especies es el modelo de crecimiento exponencial o el modelo de Malthus (1) en el que el crecimiento poblacional depende solo de la tasa de crecimiento ( $r$ ), la cual está dada por la relación entre la tasa de natalidad ( $b$ ) y mortalidad ( $d$ ) (2).

$$\frac{dx}{dt} = rx \quad (1)$$

$$r = b - d \quad (2)$$

La solución de este modelo, tal como lo indica el nombre, exhibe un comportamiento exponencial, pero dado que la explosión en el crecimiento poblacional no tiene un sentido biológico, surge el concepto de capacidad de carga ( $k$ ), que se refiere a un nivel en el que el medio ambiente no puede soportar una población mayor (Lehman et al., 2019). Así, en el siglo XIX Pierre-Francoise Verhulst introduce el modelo logístico (3), este modelo retoma la importancia de la tasa de crecimiento de Malthus, limitando el crecimiento con la capacidad de carga, obteniendo una solución más realista al predecir el crecimiento poblacional como una curva logística (Dilão, 2006). Este patrón de comportamiento poblacional ha logrado predecir el crecimiento de cultivos axénicos de microorganismos, concordando las curvas de crecimiento con la ecuación logística.

$$\frac{dx}{dt} = rx\left(1 - \frac{y}{x}\right) \quad (3)$$

Tanto el modelo exponencial como el logístico modelan el crecimiento de una sola población; en cambio, el modelo Lotka-Volterra (4) modela asociaciones biológicas, es decir el crecimiento de dos poblaciones interactuantes ( $x, y$ ). Si bien este modelo surge para comprender la interacción presa-depredador, el signo de los términos puede llegar a definir otros tipos de interacciones (Tabla 1). Además el modelo contempla la intensidad de dichas interacciones ( $b, d$ ), la tasa de crecimiento de la población ( $a$ ), la tasa de inanición de la población depredadora ( $c$ ) y la competencia intraespecífica ( $e, f$ ) (5), que denota la competencia por recursos y recuerda la capacidad de carga del modelo logístico. La capacidad de carga en el modelo Lotka-Volterra se puede expresar explícitamente en las ecuaciones ( $K$ ) y retoma los parámetros de, tasa de crecimiento ( $r_1, r_2$ ), el tamaño de las poblaciones ( $x, y$ ) y la intensidad de la interacción ( $b, d$ ) (6). Así al aumentar la dimensionalidad de este modelo y agregar  $N$  número de poblaciones, se formula el modelo generalizado Lotka-Volterra (7), en el que  $r$  es la tasa de crecimiento,  $a$  el efecto e intensidad de la interacción y  $x$  el tamaño de las poblaciones.

$$\frac{dx}{dt} = ax - bxy$$

$$\frac{dy}{dt} = -cy + dxy \quad (4)$$

$$\frac{dx}{dt} = ax - ex^2 - bxy$$

$$\frac{dy}{dt} = -cy - fy^2 + dxy \quad (5)$$

$$\frac{dy}{dt} = r_1y(K_1 - y - b\frac{x}{K_1})$$

$$\frac{dx}{dt} = r_2x(K_2 - x - d\frac{y}{K_2}) \quad (6)$$

$$\frac{dx}{dt} = r_ix_i(1 - x_i + \sum_{i \neq j} a_{ij}x_j) \quad (7)$$

Los modelos dinámicos, como los que se acaban de explicar, tienen un estado para cada punto en el tiempo y el estado está sujeto a una regla de evolución dictada por la naturaleza del modelo. Esta regla evolutiva determina los estados que pueden surgir a partir de un estado inicial o actual siendo estos estados estables o inestables. La estabilidad se alcanza cuando las fuerzas opuestas en el sistema están equilibradas, haciendo que el sistema permanezca constante y sin cambios (Salisbury, 2011). En este sentido, el modelo Lotka-Volterra introduce estados de estabilidad cíclicos (Dilão, 2006) que permiten describir dinámicas ecológicas complejas, como se ha comprobado en las interacciones presa-depredador .

**Tabla 1.** Tipos de interacciones ecológicas. Las flechas hacia arriba denotan que la población se ve beneficiada por la interacción y, por lo tanto, su éxito reproductivo aumenta asociándose con un signo positivo (+), siendo lo contrario para las flechas hacia abajo.

Efecto de la interacción en el éxito reproductivo		Signo		Tipo de interacción ecológica
población $x$	población $y$	$x$	$y$	
↑	↑	+	+	Mutualismo Cooperación
↑	↓	+	-	Depredación
↓	↑	-	+	Parasitismo
↓	↓	-	-	Competencia

## 4.- Hipótesis

El tipo e intensidad de las interacciones ecológicas por pares predice el establecimiento de la comunidad mientras que, las modificaciones al medio ambiente que realizan las comunidades es un factor determinante para alcanzar la estabilidad y lograr resistir perturbaciones bióticas.

## 5.- Justificación

La investigación aquí propuesta aporta al entendimiento de la relación de los huéspedes con su microbioma. Este estudio se enfoca al bacterioma del filoplano de *Datura innoxia* debido a que estos microorganismos son los habitantes más abundantes de la filosfera (Juby et al., 2021) y son con quienes tienen la primera interacción los demás organismos que interactúan con la planta. Los organismos interactuantes como los herbívoros, tienen su propio microbioma que también interactúa con la planta y podrían mediar dicha interacción. Además, dada la posibilidad del arribo de patógenos, el bacterioma epífita de la planta puede fungir como primera línea de defensa al desfavorecer el establecimiento de microorganismos patógenos. Este desfavorecimiento se da por la generación de competencia por espacio y recursos así como al modular de manera directa o indirecta la defensa intrínseca de la planta (Fitzpatrick et al., 2020; Koskella, 2020). Así el estudio del bacterioma puede ayudar a entender la ecología del huésped y brindar la posibilidad de explorar relaciones tripartita y no solo bipartita como convencionalmente se entienden las relaciones coevolutivas, por ejemplo planta-herbívoro.

Hasta el momento no se tiene certeza de si las comunidades bacterianas que se encuentran en el filoplano son estables (Koskella, 2020) Sin embargo, dada la evidencia que estas bacterias son capaces de modular rasgos funcionales de la planta (Friesen et al., 2011), conocer los factores que determinan la formación de dichas comunidades y posteriormente conocer aquellos que posibilitan la estabilidad permite pensar en aplicaciones agrícolas y de salud vegetal. Al entender el ensamblaje de comunidades bacterianas se podría comenzar a manipular el bacterioma y con ello dar forma a fenotipos de plantas más convenientes según el área de explotación. Estas posibles aplicaciones, además pueden tener efectos en otras áreas como biocontrol de plagas y biorremediación de suelos.

## 6.- Objetivos

### 6.1.- Objetivo general

Estimar y escalar el efecto de las interacciones pareadas entre diferentes especies de bacterias epífitas aisladas del filoplano de *Datura innoxia* para ensamblar una comunidad sintética y evaluar su dinámica y estructura frente a perturbaciones bióticas y abióticas.

## 6.2.- Objetivos particulares

1. Hacer una estimación *in silico* del tipo e intensidad de las interacciones pareadas entre las bacterias epífitas *Bacillus pumilus*, *Sporosarcina luteola*, *Arthrobacter sp.* y *Sporosarcina sp. KP5-3*.
2. Predecir *in silico* el comportamiento de la comunidad formada por *Bacillus pumilus*, *Sporosarcina luteola* y *Arthrobacter sp.* a partir de las interacciones pareadas que establecen dichas especies.
3. Evaluar *in silico* el efecto en la dinámica comunitaria de la introducción de la especie *Sporosarcina sp. KP5-3* a la comunidad sintética después de presentar una dinámica estable.
4. Determinar *in vitro* el efecto de la introducción de una cuarta especie (perturbación biótica) y del recambio del medio de cultivo (perturbación abiótica) sobre el ensamblaje, la estructura y la estabilidad de la comunidad sintética.

## 7.- Materiales y Métodos

### 7.1.- Sistema de estudio

Las bacterias que se utilizaron son las especies que fueron etiquetadas como e2, e3, e4 y e9. Estas son especies epífitas del filoplano de *Datura inoxia* aisladas e identificadas molecularmente de manera previa (Morán, 2023) como *Bacillus pumilus*, *Sporosarcina spp. KP5-3*, *Sporosarcina luteola* y *Arthrobacter sp.*, respectivamente. Dichas bacterias forman parte del “Cepario Bacteriano de Plantas e Insectos” del Grupo de Evolución Teórica y Aplicada de la Unidad de Microbiología Básica y Aplicada de la Universidad Autónoma de Querétaro. Todas las bacterias pertenecientes al cepario fueron aisladas de localidades ubicadas en el municipio de El Marqués, Querétaro durante el verano del año 2020.

#### 7.1.1.- *Bacillus pumilus* (e2)

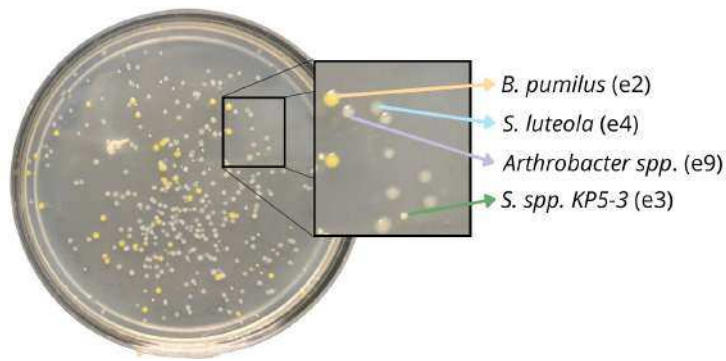
La bacteria e2, fue identificada con un porcentaje de identidad del 99.9% como *Bacillus pumilus*. Esta especie pertenece a la familia Bacillaceae, orden Bacillales, clase Bacilli y filo Basilotta. Esta especie se caracteriza por ser un bacilo gram positivo formador de endosporas, capaz de crecer en un rango de temperatura entre 5-50°C, a un pH de 5 a 11 y con tolerancia a NaCl de 10% (Branquinho et al., 2014). Morfológicamente, las colonias de *Bacillus pumilus* en medio LB son de color amarillo, con forma circular, elevación convexa, margen entero, superficie brillante y con consistencia viscosa (Fig. 1). Debido a la dispersión de esporas y a la diversidad metabólica con que está equipada esta especie es considerada cosmopolita y resistente a condiciones ambientales extremas. Esta especie es capaz de utilizar sustratos como la D-glucosa, L-arabinosa, D-xilosa, D-manitol, galactosa, fructosa y manosa. Además, al igual que otras especies pertenecientes al género *Bacillus*, *B. pumilus* es capaz de secretar enzimas como amilasa, proteasa, lipasa, fosfatasa, DNasa, gelatinasa, quitinasa, oxidasa y catalasa (Han et al., 2017). Por esta razón, esta especie tiene gran interés biotecnológico con aplicaciones como sistema de expresión, agente de biocontrol en enfermedades de plantas y probiótico en humanos y animales (Branquinho et al., 2014).

### 7.1.2.- *Sporosarcina* sp. KP5-3 (e3) y *Sporosarcina luteola* (e4)

El género *Sporosarcina* pertenece a la familia Planococcaceae, orden Bacillales, clase Bacilli y filo Basilotta. Los integrantes de este género son capaces de formar endosporas, son móviles, pueden ser aerobios estrictos o facultativos. Sin embargo, las dos especies de este género que se utilizaron en esta tesis son aerobias estrictas (Hashmi et al., 2020). La bacteria e4, fue identificada como *Sporosarcina luteola* con un porcentaje de identidad del 99.89%. *S. luteola* es una de las diez especies conocidas de este género y ha sido reportada como organismo contaminante en equipos utilizados para la producción de alimentos, por lo que se ha estudiado con el fin de evitar la contaminación. Se sabe que es una bacteria gram variable con un contenido de GC del 43.6 mol% y tolerancia al NaCl de 7.5%, con un pH óptimo de 7 y un rango de temperatura que permite su crecimiento desde los 10°C hasta 40°C, siendo la temperatura óptima 30°C. Es capaz de producir y secretar enzimas como oxidasa, catalasa y gelatinasa; utiliza como sustrato D-glucosa, D-fructosa y D-galactosa, además es capaz de reducir nitratos (Tominaga et al., 2009). En cambio, la bacteria e3, se identificó como *Sporosarcina* sp. KP5-3 con un porcentaje de identidad de 99.93%, es la cepa con identificador GenBank: JQ794609.1 reportada por primera vez en 2012 por Jantapalaboon y colaboradores como un microorganismo contaminante en alimentos; sin embargo, no ha sido posible encontrar información metabólica para esta cepa. La morfología colonial de *S. luteola* (e4) es caracterizada por colonias circulares y elevadas, con bordes completos, superficie brillante, color blanco y consistencia seca, con muy poca viscosidad. Mientras las colonias de *S. sp. KP-53* son puntiformes, con bordes completos, color beige, no son elevadas y presentan una consistencia cremosa y viscosa (Fig. 1).

### 7.1.3.- *Arthrobacter* sp. (e9)

*Arthrobacter* es un género perteneciente a la familia Micrococcaceae, orden Micrococcales, clase Actinomycetia y filo Actinomycetota. Las bacterias pertenecientes a este género son aerobias obligadas, no formadoras de esporas, gram positivas y con un contenido de GC que varía entre 55 y 66 mol%. Es común encontrar este género en suelos, en la filosfera y sedimentos de aguas residuales (P. Roy & Kumar, 2020). Han sido reportadas como bacterias con alta actividad proteolítica y capaces de degradar compuestos poliméricos, jugando así un papel importante en servicios ecosistémicos. Sin embargo, es imposible hacer aseveraciones sobre la actividad metabólica de la bacteria catalogada como e9, la cual fue identificada como *Arthrobacter* sp. con un 87.47% de identidad. Dado que no se conoce su clasificación a nivel de especie. Morfológicamente, las colonias de esta de e9 son circulares, con bordes completos, elevación pulvinate y superficie brillante con consistencia seca (Fig. 1).



**Figura 1.** Morfología colonial de cada una de las especies bacterianas que se utilizaron en esta tesis. El crecimiento de la comunidad se realizó en medio LB a una temperatura de 27°C. La bacteria *Sporosarcina spp. KP5-3* (e3) fue introducida a la comunidad para simular la llegada de una nueva especie (i.e. perturbación biótica).

## 7.2.- Curvas de crecimiento bacteriano y conteo celular

Para la obtención de las curvas de crecimiento de las bacterias utilizadas como sistema de estudio se obtuvieron cultivos axénicos sembrados mediante la técnica de estriado con el propósito de obtener colonias individuales. Se comenzó el procedimiento tomando con un asa bacteriológica calibrada y previamente esterilizada una colonia de cada cultivo para inocular 30 ml de caldo LB, del cual, posterior a su homogeneización se tomó 1 ml y se le midió la densidad óptica a 600nm en el equipo Eppendorf BioPhotometer modelo #6131. Los 29 ml restantes fueron incubados a 27°C con 120 rpm durante una hora. Transcurrido el tiempo de incubación el cultivo fue homogeneizado y se tomó 1 ml para medir la DO, los 28 ml restantes nuevamente fueron incubados bajo las mismas condiciones y transcurrido el tiempo de incubación se midió la DO, repitiendo este procedimiento durante el tiempo suficiente para observar la fase estacionaria de la curva.

La obtención del tiempo generacional (8) y la tasa de crecimiento específica (9) se realizó mediante las siguientes fórmulas:

$$n = \frac{\ln x - \ln x_0}{0.693} \quad (8)$$

Donde:

$n$  = número de generaciones o divisiones celulares

$x_0$  = concentración celular inicial

$x$  = concentración celular después del tiempo  $t$

$$\mu = \frac{\ln x - \ln x_0}{t} \quad (9)$$

Donde:

$\mu$  = tasa de crecimiento específica

$t = t_1 - t_2$

El tiempo generacional es el tiempo necesario para que las células se dupliquen mientras que  $\mu$  se refiere a la tasa máxima de crecimiento que se puede lograr dadas las

condiciones ambientales presentes (Maier & Pepper, 2015). Para lograr obtener  $x$  y  $x_0$  se aplicó el protocolo de goteo en placa (van den Berg et al., 2022) y, para obtener el número de UFC/mL se utilizó el método propuesto por Reynolds (Reynolds, 2005).

### 7.3.- Comunidad sintética

Las especies *Bacillus pumilus* (e2), *Sporosarcina luteola* (e4) y *Arthrobacter spp.* (e9) fueron seleccionadas para construir la comunidad sintética por las siguientes razones. Primero, la diferencia fenotípica en las colonias de estas especies creciendo en medio sólido Luria-Bertani (LB) es metodológicamente conveniente al permitir conocer su presencia o ausencia visualmente (Fig. 1). Segundo, las interacciones por pares entre estas especies varían desde negativas hasta interacciones ligeramente positivas (Tabla 2) por lo que se espera que en la comunidad exista coexistencia mediada por inhibición (Morán, 2023). Finalmente, tanto el tiempo generacional como las tasas de crecimiento específicas son similares entre estas tres especies (Fig. 2), por lo que una ventaja competitiva diferencial de cualquier especie sería mínima.

#### 7.2.1.- La perturbación

Con la finalidad de evaluar la estabilidad de la comunidad sintética ante perturbaciones bióticas se introdujo a *Sporosarcina sp. KP5-3* (e3), la cual se desempeñó como especie invasora. Esta especie fue seleccionada por su morfología colonial, fácilmente distinguible de las especies de la comunidad sintética (Fig. 1), y porque su tiempo generacional más corto (Fig. 3) favorece su establecimiento en la comunidad (Freilich et al., 2011). *Sporosarcina sp. KP5-3* además, es capaz de establecer interacciones cooperativas y antagonicas con los miembros de la comunidad (Tabla 2).

### 7.3.- Comunidad *in silico*

Para conocer la dinámica comunitaria a partir de las interacciones paradas se programó y corrió un modelo generalizado Lotka-Volterra en R (R Core Team, 2023). Para esto, se estimaron los parámetros de crecimiento de cada especie así como la competencia intra e interespecifica (Tabla 2). La estimación de estos parámetros se realizó con el paquete *gauseR* (*gauseR*, 2023) a partir de las curvas de crecimiento hasta la fase estacionaria de las tres especies bacterianas involucradas. Las curvas de crecimiento fueron obtenidas experimentalmente y realizadas por triplicado. El paquete *gauseR* realiza una regresión lineal del crecimiento per cápita de las curvas de crecimiento y realiza un análisis comparativo a lo largo del tiempo, de manera que se conoce la abundancia de cada bacteria en el tiempo y el rezago o adelanto respecto a las demás.

### 7.4.- Comunidad *in vitro*

La dinámica de la comunidad obtenida a partir del modelo matemático se tomó como referencia para la realización de los bioensayos. La comunidad sintética se formó al inocular 330  $\mu$ l de cada especie bacteriana para un total de 1 ml (*Bacillus pumilus*, *Sporosarcina luteola* y *Arthrobacter spp.*) con una concentración de  $2.20 \times 10^{17}$  UFC/ml en 25 ml de LB. A partir de esta comunidad se realizaron dos grupos de ensayos. En ambos grupos se monitoreó a la comunidad durante doce horas, sembrando cada dos horas 100  $\mu$ l en cajas

de petri con medio LB por la técnica de esparcido. Todas las cajas fueron incubadas a 27°C durante 24 hrs. En el primer grupo no hubo perturbación, por lo que la variable entre los dos ensayos que lo conforman fue el recambio de medio. El recambio de medio consistió en tomar 1 ml de la comunidad e inocular en 25 ml de medio nuevo (LB), ésto se realizó cada 2 hrs mientras que en su contraparte no. El segundo grupo también consistió en dos ensayos, con y sin recambio de medio; sin embargo, en este grupo después de 4 hrs, se inoculó a la comunidad 330 µl de *Sporosarcina* spp. KP5-3 a una concentración de  $2.20 \times 10^{17}$  UFC/ml, lo que representó una perturbación en la comunidad. De manera que se realizaron cuatro bioensayos: sin perturbación y sin recambio de medio; sin perturbación y con recambio de medio; con perturbación y sin recambio de medio y, con perturbación y con recambio de medio. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

## 7.5.- Análisis de datos

### 7.5.1.- Variables de respuesta

Una vez concluida su incubación, se contaron todas las colonias de cada especie en todas las cajas de petri. Para cada bioensayo se obtuvo el número de UFC/ml de cada especie a lo largo del tiempo para posteriormente estimar el índice de diversidad de Simpson (Oksanen et al., 2022). El índice de Simpson es una medida de diversidad de dominancia ya que da mayor peso a las abundancias relativas de las especies en lugar de a la riqueza. Su forma original y más simplificada se muestra en (7), donde  $p_i$  representa la proporción de  $i$  especies en la muestra. Por esta razón, el índice de Simpson es interpretado como la probabilidad de que dos individuos de la muestra que fueron seleccionados al azar pertenezcan a especies diferentes (Sommerfield et al., 2008). Los valores de este índice van del 1 al 0, donde 0 refleja que solo una especie predomina (y por ende la diversidad es baja) y 1 que todas las especies se encuentran en proporciones iguales (por lo que la diversidad medida con el índice de Simpson es máxima) (Plazas, 2020). En esta tesis, se utilizó el índice de diversidad de Simpson debido a que, por la naturaleza de nuestra comunidad sintética, la riqueza no varía ni refleja la dinámica comunitaria.

$$\lambda = \sum p_i^2 \quad (7)$$

### 7.5.2.- Análisis estadístico

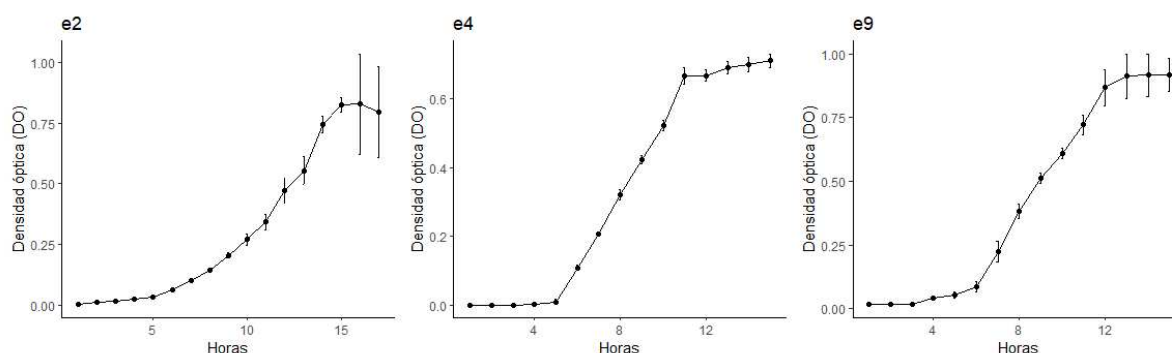
Para comparar la estructura de la comunidad bajo diferentes tratamientos se realizó un ANOVA mixto de medidas repetidas de tres vías utilizando el paquete *rstatix* (*rstatix*, 2023) de R. Este análisis se utiliza para comparar resultados obtenidos de medir a los mismos sujetos de estudio a lo largo del tiempo. En esta tesis, se estimaron valores del índice de Simpson en varios tiempos para cada bioensayo realizado. En particular, el análisis incluyó como variable de respuesta al índice de Simpson y como factores explicativos se incluyeron el tiempo, la presencia de una invasión, el recambio del medio y todas las posibles interacciones entre factores.



## 8-. Resultados

### 8.1.- Interacciones y tasas de crecimiento.

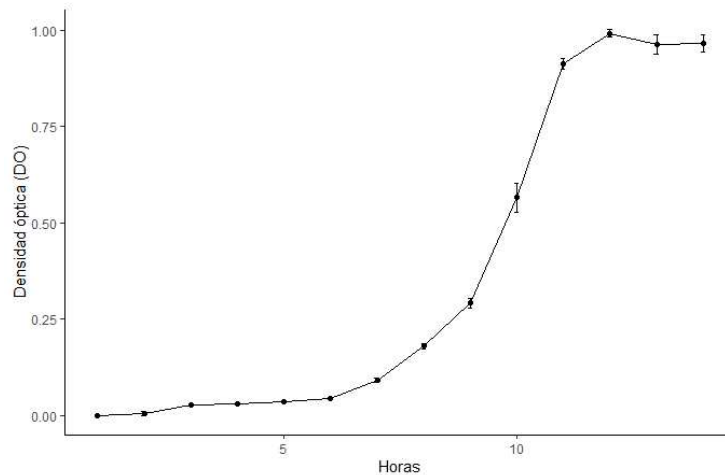
Las curvas se obtuvieron experimentalmente mediante la técnica de medición turbidimétrica utilizando la densidad óptica (DO) como indicador de crecimiento bacteriano. Para e2, la curva tuvo una duración de 17 hrs, el tiempo generacional estimado fue de 1 hr con 6 min. e4, la curva tuvo una duración de 15 hrs, el tiempo generacional estimado fue de 1 hr con 5 min. e9, la curva tuvo una duración de 15 hrs y el tiempo generacional estimado fue de 47 min (Figura 2). Para la especie invasora se realizó de igual manera la curva de crecimiento y esta tuvo una duración de 14 hrs y el tiempo generacional fue de 30 min (Figura 3). *in vitro*, también fueron estimadas las tasas de crecimiento ( $\mu$ ) (Tabla 2). A partir de estos datos se estimaron, *in silico*, el efecto y la intensidad de las interacciones entre los miembros de la comunidad y por tanto las interacciones intra e interespecíficas. El efecto de la interacción es cooperativo si el signo es positivo y antagónico si es negativo. La intensidad de la interacción disminuye cuando el valor es cercano a cero y se considera una interacción neutra (Tabla 2).



**Figura 2.** Curvas de crecimiento de las especies usadas en la comunidad sintética. Las curvas se realizaron en medio LB a 27°C y con 120 rpm.

**Tabla 2.** Interacciones ecológicas y tasas de crecimiento de las especies utilizadas.

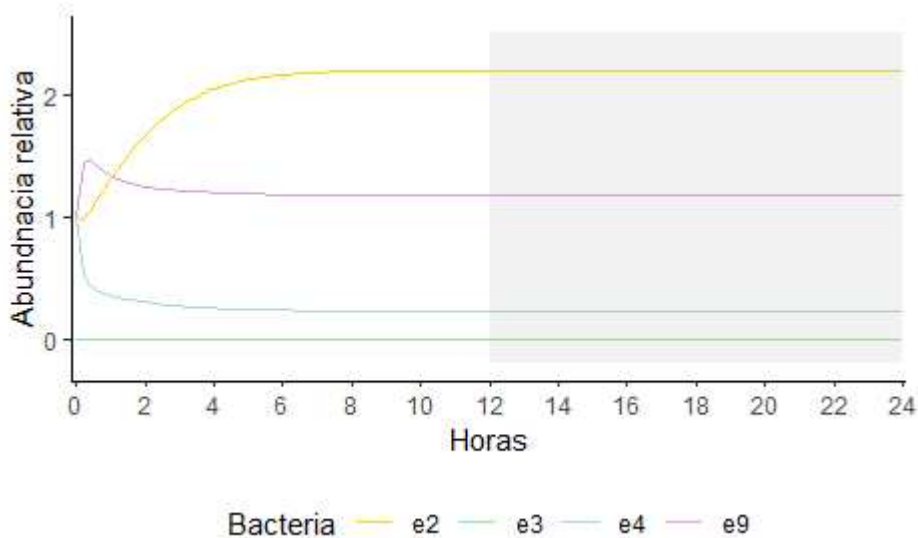
	Interacciones intra e interespecíficas				Tasas de crecimiento	
	especies de la comunidad sintética			especie invasora	<i>in silico</i>	<i>in vitro</i>
	e2	e4	e9	e3	r	$\mu$
e2	-0.472	-1.820	0.792	2.991	0.534	0.632
e4	-0.826	-10.301	2.257	4.233	1.576	0.643
e9	0.549	6.539	-2.904	-4.205	0.671	1.382
e3	-0.025	0.709	-0.126	-1.099	0.514	1.508



**Figura 3.** Curva de crecimiento de *Sporosarcina sp. KP5-3* (e3). Las curvas se realizaron en medio LB a 27°C y con 120 rpm.

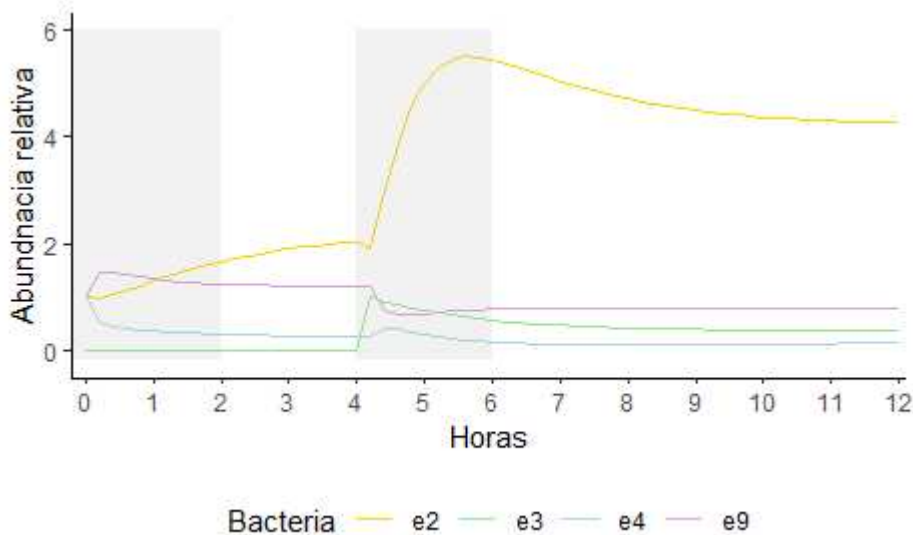
## 8.2.- Comunidad *in silico*

A partir de la simulación obtenida del modelo generalizado Lotka-Volterra la comunidad que empezó en una proporción 1:1:1 mostró coexistencia durante 12 horas, el tiempo total de la simulación (Fig. 4). En particular, de las 0 hrs a la 1.5 hrs, el modelo predice que las especies e9 y e2, incrementan su proporción respecto a la inicial, en contraste con la población de la especie e4, la cual decrece. A la 1.5 hrs la proporción se modifica a 1.4:1.1:0.4 para e9, e2 y e4 respectivamente. Estas proporciones se mantuvieron hasta las 2 hrs. En este momento se aprecia una fluctuación en las poblaciones de e9 y e2, teniendo una proporción de 1.3 de la e2 respecto a 1.33 de la e9. A las 2.5 hrs la población de la e2 se vuelve la más abundante. En este periodo, la población de e4 decae ligeramente llevándola a un valor de 0.36. La dinámica observada después de las 2.5 horas se mantiene hasta las 12 horas. Esto en términos de la predominancia; sin embargo, de las 2.5 hrs a las 12 hrs las abundancias relativas se modifican. La población de la e2 aumenta de un 48.2% a un 60.93%. La población de e9 fluctúa partiendo del 41.2% a las 2.5 hrs, después decae hasta el 34.28% a las 9 hrs, crece a las 10 hrs alcanzando el 33.85% y decae nuevamente a las 12 hrs a un 32.58%. Finalmente, la población de e4 se encuentra en constante decaimiento partiendo de un 10.6% a las 2.5 hrs y llegando a un 6.5% a las 12 hrs; sin embargo, al extender la simulación hasta las 24 hrs esta especie aún se mantiene.



**Figura 4.** Simulación de la dinámica comunitaria obtenida a partir del modelo generalizado de Lotka-Volterra. El área sombreada representa la extensión realizada para asegurar la coexistencia a pesar del decaimiento en la población de la especie e4. La especie e3 no se incluyó en esta simulación.

Tomando en consideración esta dinámica se decidió introducir la cuarta especie a las cuatro horas. En este momento la proporción entre las poblaciones fue de 1.9:1:0.28: 1.2 para e2, e3, e4 y e9, respectivamente. La introducción de la especie e3 condujo a la comunidad a un periodo de inestabilidad de dos horas. Después del cual sigue habiendo coexistencia, pero la estructura poblacional cambia (Fig. 5). Si bien la población de la especie e2 se mantiene predominante, la presencia de la e3 incrementa al doble su crecimiento. La población de la e9 decae levemente pero se mantiene como la segunda más abundante. La población de la especie e4 aumenta ligeramente aunque posterior al periodo de inestabilidad su abundancia es menor a la previa y se mantiene como la menos abundante. La especie perturbadora logró establecerse en la comunidad después de seis horas, posterior al periodo de inestabilidad, con una proporción de 5.5:0.61:0.18:0.77 para e2, e3, e4 y e9, respectivamente. En términos de predominancia, esta dinámica se vuelve estable durante 12 horas; sin embargo, las abundancias se modifican a lo largo del tiempo. Las poblaciones de e2, e3 y e4 disminuyen de manera constante. De las seis a ocho horas se da un decaimiento abrupto de la población de e2. A las 12 horas las proporciones fueron 4.3:0.38:0.14:0.8 para e2, e3, e4 y e9 respectivamente.

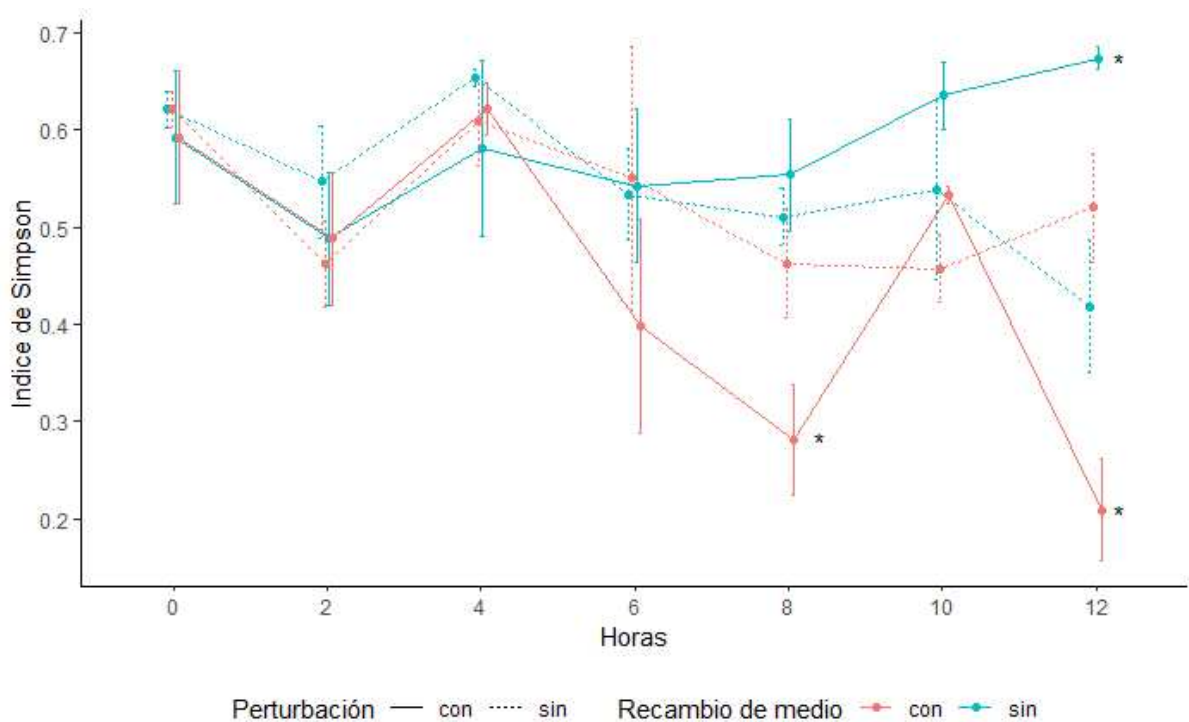


**Figura 5.** Predicción de la dinámica comunitaria a partir del modelo matemático al introducir la especie e3 a las cuatro horas. Las áreas sombreadas representan periodos de inestabilidad, siendo el primero debido al ensamblaje de la comunidad y el segundo por la introducción de la especie e3.

Este resultado reforzó la selección de las especies que conformaron la comunidad sintética (*B. pumilus*, *S. luteola* y *Arthrobacter sp.*), dado que la dinámica fue estable la mayor parte del tiempo aún con la especie perturbante. Además, esta comunidad sintética mostró coexistencia. A partir de estos resultados teóricos se diseñaron los bioensayos *in vitro* para evaluar la estabilidad de esta comunidad y discernir entre el efecto que puede llegar a tener la modificación del medio en el que se desarrolla la comunidad y las interacciones establecidas entre los miembros, así como la modificación de las mismas.

### 8.3.- Comunidad *in vitro*

La dinámica de las comunidades *in vitro* de los cuatro tipos de bioensayos que se realizaron no coincidieron con los resultados de la simulación. Sin embargo, en todas hubo coexistencia, aún con la presencia de la especie perturbante. La estructura observada en estos ensayos fue dependiente de las modificaciones a las que fueron sometidas las comunidades, de forma que los cuatro bioensayos tuvieron dinámicas diferentes (Fig. 7). Aunque las estructuras comunitarias solo fueron significativamente diferentes a las ocho y doce horas dependiendo de la realización del recambio de medio o no (Fig. 6). Esta diferencia se explica, acorde al análisis estadístico, mayormente por el efecto de la interacción triple entre el recambio de medio, la perturbación y el tiempo. Sin embargo, esto también se explica por la interacción doble entre el recambio de medio y la perturbación, así como el efecto del recambio de medio por sí mismo (Tabla 3).



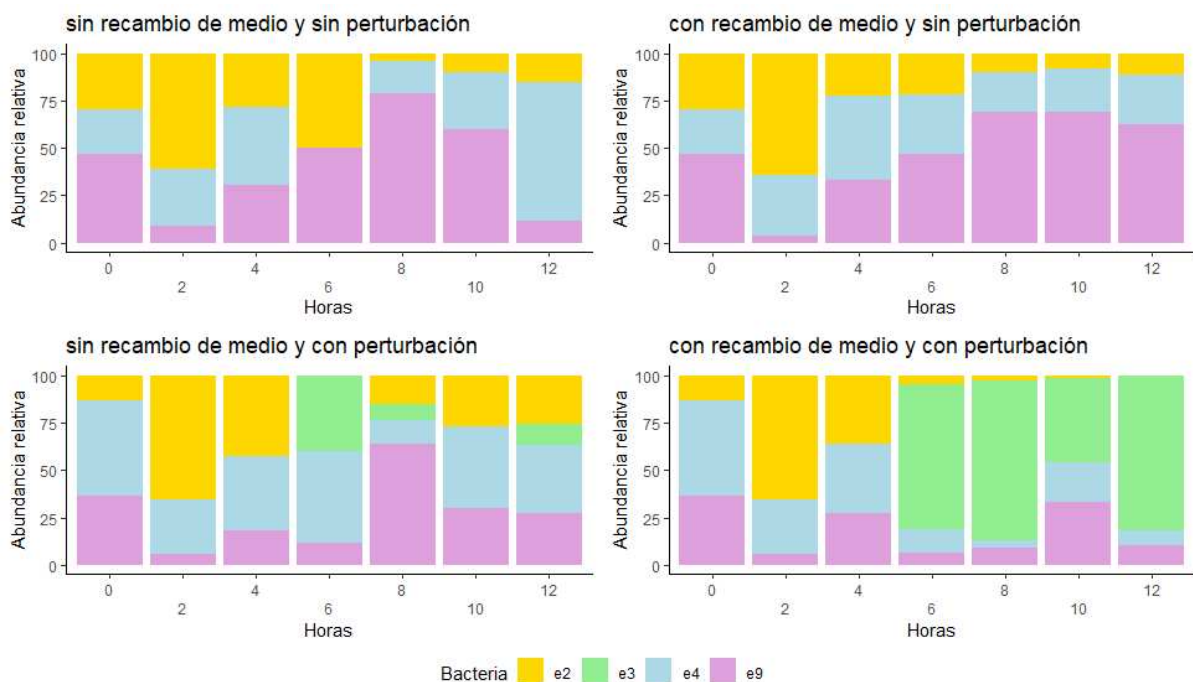
**Figura 6.** Efecto de la perturbación del recambio de medio y la introducción de una cuarta especie en la estructura comunitaria. La estructura comunitaria se muestra en términos de diversidad durante doce horas para los cuatro tipos de bioensayos realizados. Los asteriscos denotan valores significativamente diferentes ( $P < 0.0001$ ).

### 8.2.1.- Bioensayos sin perturbación biótica

Durante los bioensayos uno y dos se permitió la interacción de las tres especies que forman la comunidad sintética durante 12 hrs sin la introducción de la especie perturbante. La diferencia entre estos ensayos fue el recambio de medio. El tratamiento de recambio de medio consistió en tomar 1 ml de la comunidad e inocular en 25 ml de medio nuevo (LB). En el primero de estos ensayos no se realizó el recambio mientras que en el segundo se cambió el medio cada dos horas. Al igual que en el modelaje, en ambos ensayos se inocularon las especies en una proporción de 1:1:1; sin embargo, cuando se contabilizaron las colonias no fue posible confirmar dicha proporción. En ambos ensayos la especie e9 fue la más abundante a las 0 hrs, seguida de la especie e2 y de la e4. En cuanto a proporciones de las poblaciones en la comunidad, éstas coinciden con las proporciones observadas en el modelo a las dos horas. Ambos bioensayos coinciden en su dinámica poblacional hasta la hora cuatro y se observaron cambios hasta la hora seis. A esa hora, en el bioensayo uno la población de la especie e4 fue tan poco abundante que no fue posible observar colonias para contabilizar y, las poblaciones de e2 y e9 se encontraron abarcando el 50% de la comunidad cada una. En este momento, en el ensayo dos se modificaron las proporciones de las poblaciones siendo la especie e2 la menos abundante, seguida de la e4 y posicionando a la e9 como la especie predominante. Esta dinámica se mantuvo en el bioensayo dos hasta las 12 hrs. La dinámica en el bioensayo uno, en la hora 8 y 10, fue igual a lo ya mencionado en el bioensayo dos de la hora 6 a la 12. Pero a las 12 hrs en el bioensayo uno, la especie e4 se vuelve la especie predominante, su población representa el

73% de la comunidad, desplazando a las especies e2 y e9 al 15.3% y 11.7% respectivamente.

La comparación de estos dos ensayos permite observar el efecto del recambio de medio en el ensamblaje de la comunidad. Esto refleja que la capacidad para modificar el ambiente supone una ventaja competitiva que puede conducir a la modificación de la dinámica comunitaria. En este caso, es evidente el efecto favorecedor del recambio de medio en la población de la especie e4. Esta especie parece mediar la interacción entre las poblaciones de la especie e2 y e9 ya que, cuando la población de e4 es baja la diferencia en el tamaño de ambas poblaciones en la siguiente medición es alta. Cuando la población de e4 logra tener una abundancia intermedia entre e2 y e9, la diferencia en el tamaño de ambas poblaciones disminuye. Debido al tiempo durante el cual se monitoreo a la comunidad en ambos bioensayos, no fue posible conocer el efecto del crecimiento de la población de e4 sobre e9 y e2 pero, por tendencia, parece que ésto favorece el crecimiento de la población de e2 y desfavorece a la especie e9. Esto podría generar nuevamente que la diferencia en el tamaño de ambas poblaciones aumente, pero de manera inversa a lo observado cuando la e4 es poco abundante. Así, la diferencia en la dinámica comunitaria observada entre ambos ensayos se debe a la interacción directa e indirecta entre las bacterias.



**Figura 7.** Abundancias relativas a lo largo del tiempo en los cuatro bioensayos realizados. Se observa la dinámica comunitaria diferenciada entre los cuatro bioensayos, así como la estabilidad de la misma.

### 8.2.2.- Bioensayos con perturbación biótica

En los bioensayos tres y cuatro se introdujo una cuarta especie a la comunidad, siendo la diferencia entre ambos el haber realizado o no el recambio de medio. En el ensayo número tres no hubo recambio de medio, en el cuatro sí. Al igual que en el modelaje matemático y los bioensayos uno y dos, se comenzó la comunidad en una proporción 1:1:1, aunque el conteo de colonias no corroboró estas proporciones. A las 0 hrs, la especie e4 fue la más

abundante seguida de la e9 y e2 en ambos bioensayos. A las 2 hrs estas proporciones se modificaron, siendo, en orden ascendente a descendente, e2, e4 y e9. Este orden coincide en ambos bioensayos, al igual que con los bioensayos uno y dos. Posterior a este momento las proporciones y las abundancias relativas no vuelven a coincidir con los bioensayos uno y dos, así como entre tres y cuatro (Fig. 7). En el bioensayo tres, la dinámica observada a las 2 hrs se conserva hasta las 4 hrs, a diferencia del bioensayo cuatro. En este último, posterior a la fluctuación observada a las 4 hrs, la dinámica se estabilizó y duró hasta las 12 hrs. La especie perturbante se estableció y logró posicionarse como la especie más prevalente, mientras que la especie e2 permaneció como la menos abundante e incluso a las 12 hrs no se logró contabilizar ninguna UFC. En cambio, en el bioensayo tres las abundancias relativas fluctuaron a las 6 y 8 hrs, ya que disminuye la población de e9, se incorpora a la comunidad e3, desplazando a e2 y a las 8 hrs, la población de e9 aumenta, la de e3 disminuye y la e2 aumenta de manera que es posible volver a observar UFC. A las 10 hrs se restablece la estructura observada desde el inicio y se conserva hasta las 12 hrs.

La realización de estos dos ensayos permitió evaluar la estabilidad de la comunidad. Se encontró que en esta comunidad sintética, la modificación realizada en el ambiente durante el ensamblaje de la comunidad es esencial para la estabilidad. En el bioensayo tres es posible observar propiedades emergentes como la resiliencia al recuperar, en tan sólo dos horas, la estructura previa a pesar de la introducción de la especie e3. Es decir, la estructura de la comunidad fue resistente al evitar la predominancia de la especie perturbante, aunque ésta logre establecerse. En el bioensayo cuatro, la comunidad careció de estas propiedades y se nota una menor resistencia a la especie perturbante y nula resiliencia ya que la estructura previa no se recupera. En términos de interacciones bacterianas, estos resultados pueden reflejar la modificación de las interacciones previamente establecidas. En el bioensayo uno y dos fue posible observar un crecimiento inversamente proporcional entre la especie e2 y e9, posiblemente, mediado por la especie e4. Dadas las dinámicas de las comunidades de los bioensayos tres y cuatro, en las que no se observó un patrón de sucesión, es muy probable que hubiera una modificación fenotípica de las bacterias interactuantes aunque no se comprobó. La plasticidad fenotípica bacteriana es sumamente alta (Becker et al., 2012) por lo que las modificaciones fenotípicas podrían referirse a modificaciones metabólicas así como secreciones que median la interacción entre las tres especies al introducir la cuarta. Identificar dichas modificaciones metabólicas requiere mayor investigación y por ende representa una ventana de oportunidad.

**Tabla 3.** Resultados del análisis estadístico para determinar un efecto del recambio del medio de cultivo, la presencia de una perturbación y el tiempo sobre los índices de diversidad de Simpson. *gl*, grados de libertad para el numerador (n) y el denominador (d); ges, porcentaje de variación que explica ese factor; valores en negrita son significativos.

Fuente de variación	<i>gl</i>		<i>F</i>	<i>P</i>	ges
	n	d			
recambio	1	4	<b>14.70</b>	<b>0.0190</b>	0.42
perturbación	1	4	0.98	0.3790	0.05
tiempo	6	24	<b>10.91</b>	<b>&lt; 0.0001</b>	0.69
recambio x perturbación	1	4	<b>10.487</b>	<b>0.0320</b>	0.34
recambio x tiempo	6	24	2.162	0.0830	0.30
perturbación x tiempo	6	24	2.181	0.0810	0.31
recambio x perturbación x tiempo	6	24	<b>8.566</b>	<b>&lt; 0.0001</b>	0.63

## 9.- Discusión

### 9.1.- Ensamblaje de la comunidad sintética

Las condiciones ambientales suelen ser predictores fuertes de la estructura comunitaria (Langenheder & Lindström, 2019), abordar la hipótesis de este trabajo mediante el enfoque de la biología sintética permitió controlar dichas condiciones, evitando mecanismos de ensamblaje de comunidades bacterianas estocásticas. Esto permitió observar en un medio conocido, con especies previamente caracterizadas, los efectos de mecanismos deterministas como la filtración ambiental y la clasificación de especies. Al desarrollar los bioensayos en un medio rico (LB), el efecto de la filtración ambiental no fue evidente dado que todas las especies lograron prosperar tanto en cultivos axénicos como en la comunidad. Sin embargo, en los experimentos tres y cuatro, cuando se introdujo a la especie e3, es evidente el efecto de este mecanismo ya que, la diferencia de la composición del medio facilitó, en el caso del experimento cuatro, el establecimiento de la especie invasora. En cambio, el efecto de la clasificación de especies es evidente en los experimentos uno y dos, dado que se puede observar que entre menor es el tiempo generacional y mayor es la tasa de crecimiento específica ( $\mu$ ), mayor es la abundancia en la comunidad. Esto se ve reforzado en el experimento cuatro y denota la existencia de una relación inversamente proporcional entre el tiempo generacional y la abundancia relativa así como, la importancia de la diferencia en fitness en el ensamblaje de la comunidad.

Cuando se comienza a formar una comunidad, el ensamblaje es determinado principalmente por interacciones antagónicas (Rivett et al., 2018; Xiong et al., 2022). Es en etapas posteriores durante la sucesión ecológica que se comienzan a favorecer las



interacciones cooperativas (Mataigne et al., 2021; Rivett et al., 2018). Bajo este marco teórico, al no permitir que el proceso de sucesión ocurriera plenamente debido al recambio de medio constante, en el experimento dos, es posible que no se haya favorecido la modificación de las interacciones. Las especies “ganadoras” en interacciones competitivas suelen ser especies con mayores tasas de producción de biomasa (Freilich et al., 2011), esta información concuerda con los resultados observados en términos de abundancias relativas en el experimento dos y las  $\mu$  estimadas (Tabla 2).

Cambiar el proceso de sucesión cada que se realizó el recambio de medio, condujo a diferentes estructuras y dinámicas comunitarias (Tabla 3). Estos resultados indican que la clasificación ecológica fue diferente y, por ende, se infiere que fueron modificados dos factores que tienen un efecto significativo en el ensamblaje de la comunidad. Los dos factores fueron: el medio de cultivo y las interacciones ecológicas. El medio fue modificado únicamente por el propio metabolismo de la comunidad; mientras que, las interacciones fueron modificadas por la reestructuración del medio y la introducción de una cuarta especie.

## 9.2.- Interacciones par vs. comunidad

### 9.2.1.- Modelo Lotka-Volterra

El uso del modelaje matemático ha sido de gran ayuda para tratar de entender sistemas tan complejos como las comunidades bacterianas. En este caso, el modelo generalizado de Lotka-Volterra basado en interacciones pareadas (Venturelli et al., 2018) ha permitido predecir la coexistencia entre los miembros de la comunidad y la especie perturbadora. Además, facilitó el diseño experimental y permitió la evaluación del efecto de la perturbación en la estructura de la comunidad. El modelo logró predecir la coexistencia, pero no la dinámica y estructura comunitaria, lo cual nos indica que posiblemente las interacciones pareadas fueron modificadas, lo que concuerda con la dependencia de la intensidad de las interacciones y el resultado de las mismas del contexto ecológico (Stubbenieck et al., 2016). Razón por la cual, los parámetros estimados no fueron acertados para predecir el desarrollo de la comunidad.

El modelo Lotka-Volterra al ser un modelo de enfoque de tiempo continuo (Dilão, 2006) ha sido utilizado en ecología microbiana para predecir efectos a corto y largo plazo en la interacción entre bacterias y en la estructura de la comunidad (Picot et al., 2023). Sin embargo, las probabilidades de que la simulación refleje la realidad, en ambos casos, varía acorde a las condiciones experimentales, siendo más confiable en condiciones constantes, por ejemplo, en un quimiostato (Picot et al., 2023). Por lo que, las condiciones experimentales usadas en este trabajo no fueron óptimas para la simulación, causando mayor margen de error. Aún así, el efecto a corto plazo obtenido a partir de la simulación fue adecuado. No se evaluó experimentalmente la modificación de las interacciones ni el efecto del crecimiento bacteriano de determinada especie sobre las demás, pero en los cuatro ensayos fue posible observar patrones temporales en las abundancias relativas. A las 2 hrs, las comunidades de los cuatro ensayos reflejan la dinámica predicha por el modelo, aunque en ninguno de los cuatro ensayos se mantiene. Probablemente, porque después de este momento, el contexto ecológico ha cambiado lo suficiente para inducir el cambio en la dinámica comunitaria. A partir de estas observaciones, se ha concluido que el modelo Lotka-Volterra y las interacciones pareadas sí pueden ser útiles para conocer el

ensamblaje de una comunidad bacteriana de baja diversidad, pero no para conocer el desarrollo de las mismas (Abreu et al., 2018; Chang et al., 2023; Freilich et al., 2009)

## 9.2.2.- Estabilidad y dinámica

### 9.2.2.1.- Propiedades emergentes

Los coeficientes de interacción entre dos especies no son constantes (Song et al., 2019). Los cambios en las interacciones pueden ser causados por interacciones de orden superior o no linealidad, lo que refleja el surgimiento de propiedades emergentes (Conacher et al., 2022). Así, la resiliencia y resistencia evidenciadas en la comunidad del bioensayo tres apoyan la conclusión de la disrupción de las interacciones pareadas al permitir la interacción de las tres especies y, posteriormente, la cuarta. El surgimiento de estas propiedades emergentes, acorde al análisis estadístico, es dependiente de haber realizado o no el recambio de medio. Este resultado indica que, a pesar de no haber evaluado la modificación fenotípica, las interacciones ecológicas pueden estar mediadas de manera indirecta lo cual es congruente con lo poco frecuente que son las interacciones bacterianas dadas por contacto (Butler & O'Dwyer, 2018). La modificación realizada por el metabolismo de la comunidad no fue evaluado, de manera que, la modificación de las interacciones pudo deberse a múltiples factores. Entre los que destacan el efecto del agotamiento de recursos y espacio (Ghenu et al., 2024); la acumulación de bienes públicos (García-Contreras & Loarca, 2021); la acumulación de productos de desecho y, la capacidad, reportada en la bibliografía, de secreción previamente conocida en las especies utilizadas en la comunidad sintética. De esta forma, se puede concluir que la estabilidad fue dada por el establecimiento de redes complejas de interacciones entre las especies, a pesar de no saber cómo fueron mediadas dichas interacciones.

### 9.2.2.2- Perturbación

La introducción de una cuarta especie generó una perturbación biótica en la comunidad. Esto permitió evaluar la estabilidad de las comunidades generadas en los ensayos. En la comunidad del bioensayo dos, en el que se realizó recambio de medio y no se introdujo la especie e3, se obtuvo un patrón en las abundancias relativas “estable”. Al introducir la especie perturbante en el ensayo cuatro, en el que también se realizó recambio de medio, podemos observar cómo dicha estabilidad no existe. Así, estos patrones de abundancias se atribuyeron a la relación de las tasas de crecimiento específicas ( $\mu$ ), las cuales no coincidieron con las estimaciones de la tasa de crecimiento in silico ( $r$ ) (Tabla 1). El que no hayan coincidido se puede explicar dado que  $r$  es un valor idealizado y, por tanto, independiente de las condiciones experimentales; mientras que,  $\mu$  es un valor obtenido experimentalmente por lo que es específico de esas condiciones (Ghenu et al., 2024). Las condiciones en las que se obtuvo  $\mu$  fueron similares a las de los bioensayos (tubo Falcon 50 ml, medio de cultivo LB, incubación a 120 rpm y 27°C), por lo que es congruente que sea un valor más certero. Esta discrepancia, además, pudo influir en la confiabilidad de los resultados del modelo. La especie e3, exhibió la  $\mu$  más rápida, lo que la convirtió en una especie invasora ideal (Freilich et al., 2011).

El establecimiento de una especie invasora, depende de múltiples factores. Entre estos factores están, el estado fisiológico del invasor, la cantidad de invasores, la interacción con la comunidad residente y las condiciones ambientales (Rivett et al., 2018; Wright & Vetsigian, 2016). El estado fisiológico del inóculo de la especie e3 fue ideal porque,

acorde al tiempo de incubación previo, se encontraba en la fase exponencial de su curva de crecimiento. La cantidad de inóculo utilizada representó el 22.75% de la comunidad, siendo mayor que la población de e4, un poco menor que la población de e9 y, aproximadamente, la mitad de la población de e2. La respuesta a la perturbación se da rápidamente (Friedman et al., 2017), incluso se ha reportado ocurre durante los primeros quince minutos de interacción (Aguilar-Salinas & Olmedo-Álvarez, 2023). De hecho, el que las interacciones ocurran rápidamente puede justificar el no haber podido comprobar la relación inicial de 1:1:1, dado que no fue posible implementar el protocolo experimental requerido en menos de 15 min. Así, se especula que la proporción cambió en respuesta a la interacción tripartita. De igual forma, la respuesta de la comunidad ante la perturbación debió darse de manera rápida para lograr una resistencia a la invasión. La comunidad del bioensayo cuatro no logró esta respuesta dado que, al realizar el recambio de medio y no permitir la modificación de su ambiente, la sucesión ecológica no fue posible permaneciendo la comunidad en una edad temprana. De igual forma, ésto evitó los efectos del orden de arribo que, especialmente en comunidades del filoplano, puede suponer un factor de selección determinante (Koskella et al., 2017). Aunado al hecho que la realización del recambio de medio permitió alta disponibilidad de recursos y espacio que posiblemente evitaron la modificación de su tasa de crecimiento específica. Así, esta especie fue sumamente favorecida en este bioensayo en contraparte con el bioensayo tres.

### 9.3.- Comunidades del filoplano

A partir de este trabajo sabemos que las bacterias epífitas del filoplano de *D. inoxia* son capaces de formar comunidades estables con posibles dinámicas previsibles. El efecto del tiempo en la estructura y dinámica comunitaria, independientemente de los otros dos factores evaluados (perturbación y recambio de medio) tuvo un efecto significativo (Tabla 3). Es decir, la composición de la comunidad se altera por sucesos que ocurren en el pasado. Estos eventos, suponen que las comunidades no se establecen en un ambiente *de novo*, sino en un ambiente modificado por sus ancestros genéticos y ecológicos (Cerqueda-García & Falcón, 2016). Estas modificaciones suponen cambios en las presiones de selección, por lo que la herencia ecológica va de la mano con los efectos del orden de arribo. En los bioensayos desarrollados en esta tesis, se muestra evidencia de herencia ecológica al comparar las abundancias relativas en los cuatro bioensayos (Fig. 5), siendo que la dinámica comunitaria no fue la misma en ninguno, principalmente debido al recambio de medio. Cambiar el medio de cultivo sí fue significativo e indica la modificación de su ambiente y cómo afecta las posibilidades del establecimiento de nuevas especies, en este caso de la e3. Sin embargo, que se formen comunidades estables en el filoplano aún no lo sabemos, debido a la diferencia de las condiciones de los ensayos y en la superficie de la hoja. Dado que el contexto ecológico modifica las dinámicas comunitarias, de haber utilizado medio mínimo en lugar de un medio rico, posiblemente hubiera cambiado los resultados, sin embargo, dada la capacidad de carga diferencial en el filoplano (Remus-Emsermann et al., 2012), utilizar ambos tipos de medios puede reflejar dinámicas que suceden en este hábitat.

Las bacterias que fueron utilizadas para la formación de la comunidad sintética son bacterias que, previamente, fueron catalogadas con baja abundancia en el filoplano (Mayoral-Peña, 2023). Los taxones raros en las comunidades naturales suelen comportarse como buffers ante las perturbaciones bióticas al interactuar mayormente con taxones abundantes (Yang et al., 2022), pero también debido a que las especies productoras en una

relación cooperativa metabólicamente suelen ser de baja abundancia (Becker et al., 2012; Leinweber et al., 2017). Estas especies son quienes realizan las modificaciones claves al ambiente que rigen el orden de arribo evitando altas tasas de rotación comunitaria que son comunes en ambientes heterogéneos (Langenheder & Lindström, 2019), como lo es el filoplano. Esto aunado a la posibilidad de patrones estructurales, espaciales y temporales (Fuhrman et al., 2006) debido a la capacidad de carga diferencial en la superficie de las hojas (Remus-Emsermann et al., 2012) así como a la selección por parte del huésped en los epífitos (Fitzpatrick et al., 2020), permite abrir la posibilidad de que, a pesar de la heterogeneidad del ambiente en el filoplano se puedan encontrar comunidades complejas que sean estables.

Lo que es un hecho, es que las bacterias del filoplano, como se evidenció en esta tesis, tienen la capacidad de modificar su nicho ecológico. Esto implica la modificación de un ser vivo; desentrañar estas relaciones ecológicas para conocer las presiones de selección a las que se enfrentan los epífitos así como las relaciones funcionales y posiblemente evolutivas ayudará a entender la ecología bacteriana y la del huésped, así como el impacto del holobionte en la interacción con demás miembros del ecosistema.

## 10.- Conclusión

En este trabajo se modificaron dos factores con efecto significativo en la formación de la comunidad con la que se trabajó. Estos dos factores son, el medio de cultivo y las interacciones ecológicas. Realizar el recambio de medio cada dos horas, permitió que se mantuviera la conformación del medio y por tanto que no se diera un proceso de sucesión, dado que las condiciones ambientales fueron constantes. En contraparte al no realizar el recambio de medio el proceso de sucesión condujo a una comunidad madura, dado que se realizaron modificaciones a ese ambiente. Al cambiar el contexto ecológico las interacciones bacterianas también fueron modificadas, como evidencia de ello, el que la dinámica de la comunidad sea diferente *in vitro* e *in silico*. Además el surgimiento de propiedades emergentes como la resiliencia en el bioensayo tres, también indica la modificación de dichas interacciones. Así se concluye que a las 12 hrs, en los cuatro bioensayos se obtuvieron estructuras comunitarias distintas como reflejo de la clasificación ecológica y que la estabilidad, medida en términos de resiliencia y resistencia está fuertemente ligada a la generación de redes complejas de interacciones entre las especies involucradas.

## 11.- Perspectivas

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, surgieron preguntas que sería interesante abordar en un futuro. Primero, dada la observación del efecto de la población de e4 sobre e2 y e9, evaluar cómo se desarrolla esta interacción y si hay efectos denso dependientes que la rigen o selección dependiente de la frecuencia. Segundo, conocer si los efectos de la modificación ambiental son claves en determinado momento y, a su vez, evaluar en qué momento una comunidad bacteriana es lo suficientemente madura para soportar el efecto de perturbaciones bióticas. Esto último podría indicarnos si los efectos del orden de arribo y la herencia ecológica se intensifican con el tiempo o se diluyen, posibilidad que ya ha sido reportada con anterioridad (Langenheder & Lindström, 2019). Tercero, las modificaciones al ambiente donde se desarrolla la comunidad parecen ser graduales, por lo que la respuesta de la comunidad también podría serlo. En cambio, las perturbaciones bióticas son abruptas y la respuesta ante éstas debe ser rápida para mantener la comunidad. En este trabajo, la interacción entre el recambio del medio y la perturbación con el tiempo (interacciones dobles en el análisis estadístico) no fueron significativos, esto posiblemente debido al diseño experimental que no permitió el detalle necesario para observar la respuesta por parte de la comunidad. En este sentido, estudiar con qué velocidad se obtiene una respuesta por parte de una comunidad bacteriana ante perturbaciones bióticas y abióticas en el filoplano podría aportar al entendimiento del ensamblaje de las comunidades en este hábitat.

## 12.- Bibliografía

- Abreu, C., Ortiz Lopez, A., & Gore, J. (2018). Pairing off: A bottom-up approach to the human gut microbiome. *Molecular Systems Biology*, 14(6), e8425.  
<https://doi.org/10.15252/msb.20188425>
- Aguilar Salinas, B. (2018). *Propiedades emergentes de las interacciones bacterianas en una comunidad sintética* [masterThesis, Tesis (M.C.)--Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. Unidad Irapuato. Departamento de Ingeniería Genética.]. <https://repositorio.cinvestav.mx/handle/cinvestav/1572>
- Aguilar-Salinas, B., & Olmedo-Álvarez, G. (2023). A three-species synthetic community model whose rapid response to antagonism allows the study of higher-order dynamics and emergent properties in minutes. *Frontiers in Microbiology*, 14.  
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2023.1057883>
- Andreote, F. D., Azevedo, J. L., & Araújo, W. L. (2009). Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. *Brazilian Journal of Microbiology: [Publication of*

*the Brazilian Society for Microbiology*], 40(3), 417–432.

<https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000300001>

Baltrus, D. A. (2017). Adaptation, specialization, and coevolution within phytobiomes.

*Current Opinion in Plant Biology*, 38, 109–116.

<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.04.023>

Barnett, S. E., Youngblut, N. D., & Buckley, D. H. (2020). Soil characteristics and land-use drive bacterial community assembly patterns. *FEMS Microbiology Ecology*, 96(1),

fiz194. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz194>

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>

Benner, S. A., & Sismour, A. M. (2005). Synthetic biology. *Nature Reviews Genetics*, 6(7),

Article 7. <https://doi.org/10.1038/nrg1637>

Blackstone, K. (2023). *EFFECTS OF COMPETITION, NICHE COMPLEMENTARITY, AND*

*ENEMY ATTACK ON SPECIES CO-EXISTENCE AND PRODUCTIVITY* [Thesis,

Purdue University Graduate School]. <https://doi.org/10.25394/PGS.23751054.v1>

Branquinho, R., Meirinhos-Soares, L., Carriço, J. A., Pintado, M., & Peixe, L. V. (2014).

Phylogenetic and clonality analysis of *Bacillus pumilus* isolates uncovered a highly

heterogeneous population of different closely related species and clones. *FEMS*

*Microbiology Ecology*, 90(3), 689–698. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12426>

Burke, C., Steinberg, P., Rusch, D., Kjelleberg, S., & Thomas, T. (2011). Bacterial community

assembly based on functional genes rather than species. *Proceedings of the*

*National Academy of Sciences*, 108(34), 14288–14293.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1101591108>

Butler, S., & O'Dwyer, J. P. (2018). Stability criteria for complex microbial communities.

*Nature Communications*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05308-z>

Cerqueda-García, D., & Falcón, L. I. (2016). La construcción del nicho y el concepto de

holobionte, hacia la reestructuración de un paradigma. *Revista Mexicana de*

- Biodiversidad*, 87(1), 239–241. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2015.11.001>
- Chang, C.-Y., Bajić, D., Vila, J. C. C., Estrela, S., & Sanchez, A. (2023). Emergent coexistence in multispecies microbial communities. *Science*, 381(6655), 343–348. <https://doi.org/10.1126/science.adg0727>
- Conacher, C. G., Naidoo-Blassoples, R. K., Rossouw, D., & Bauer, F. F. (2022). A Transcriptomic Analysis of Higher-Order Ecological Interactions in a Eukaryotic Model Microbial Ecosystem. *mSphere*, 7(6), e00436-22. <https://doi.org/10.1128/msphere.00436-22>
- Cornish-Bowden, A., & Cárdenas, M. L. (2017). Life before LUCA. *Journal of Theoretical Biology*, 434, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2017.05.023>
- De Wit, R., & Bouvier, T. (2006). ‘Everything is everywhere, but, the environment selects’; what did Baas Becking and Beijerinck really say? *Environmental Microbiology*, 8(4), 755–758. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01017.x>
- Dilão, R. (2006). Mathematical models in population dynamics and ecology. En *Biomathematics* (pp. 399–449). WORLD SCIENTIFIC. [https://doi.org/10.1142/9789812774859\\_0015](https://doi.org/10.1142/9789812774859_0015)
- Fitzpatrick, C. R., Salas-González, I., Conway, J. M., Finkel, O. M., Gilbert, S., Russ, D., Teixeira, P. J. P. L., & Dangl, J. L. (2020). The Plant Microbiome: From Ecology to Reductionism and Beyond. *Annual Review of Microbiology*, 74(1), 81–100. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-022620-014327>
- Freilich, S., Kreimer, A., Borenstein, E., Yosef, N., Sharan, R., Gophna, U., & Ruppin, E. (2009). Metabolic-network-driven analysis of bacterial ecological strategies. *Genome Biology*, 10(6), R61. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-6-r61>
- Freilich, S., Zarecki, R., Eilam, O., Segal, E. S., Henry, C. S., Kupiec, M., Gophna, U., Sharan, R., & Ruppin, E. (2011). Competitive and cooperative metabolic interactions in bacterial communities. *Nature Communications*, 2(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/ncomms1597>
- Friedman, J., Higgins, L. M., & Gore, J. (2017). Community structure follows simple

- assembly rules in microbial microcosms. *Nature Ecology & Evolution*, 1(5), Article 5.  
<https://doi.org/10.1038/s41559-017-0109>
- Friesen, M. L., Porter, S. S., Stark, S. C., von Wettberg, E. J., Sachs, J. L., & Martinez-Romero, E. (2011). Microbially Mediated Plant Functional Traits. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 42(1), 23–46.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-102710-145039>
- Fuhrman, J. A., Hewson, I., Schwalbach, M. S., Steele, J. A., Brown, M. V., & Naeem, S. (2006). Annually reoccurring bacterial communities are predictable from ocean conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(35), 13104–13109. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602399103>
- García-Contreras, R., & Loarca, D. (2021). The bright side of social cheaters: Potential beneficial roles of “social cheaters” in microbial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 97(1), fiae239. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae239>
- gauseR: Modelos Lotka-Volterra para la “lucha por la existencia” de Gause.* (2023). [Software]. <https://cran.r-project.org/web/packages/gauseR/index.html>
- Ghenu, A.-H., Marrec, L., & Bank, C. (2024). Challenges and pitfalls of inferring microbial growth rates from lab cultures. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fevo.2023.1313500>
- Han, L.-L., Shao, H.-H., Liu, Y.-C., Liu, G., Xie, C.-Y., Cheng, X.-J., Wang, H.-Y., Tan, X.-M., & Feng, H. (2017). Transcriptome profiling analysis reveals metabolic changes across various growth phases in *Bacillus pumilus* BA06. *BMC Microbiology*, 17(1), 156. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1066-7>
- Hashmi, I., Bindschedler, S., & Junier, P. (2020). Chapter 18—Firmicutes. En N. Amaran, M. Senthil Kumar, K. Annapurna, K. Kumar, & A. Sankaranarayanan (Eds.), *Beneficial Microbes in Agro-Ecology* (pp. 363–396). Academic Press.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00018-6>
- Hesse, E., & O'Brien, S. (2024). Ecological dependencies and the illusion of cooperation in microbial communities. *Microbiology*, 170(2), 001442.



<https://doi.org/10.1099/mic.0.001442>

Hilje, L. (1984). Simbiosis: Consideraciones terminológicas y evolutivas. *Uniciencia*, 1(1), 57–60.

Hutchinson, G. E. (1961). The Paradox of the Plankton. *The American Naturalist*, 95(882), 137–145. <https://doi.org/10.1086/282171>

Jiao, S., Yang, Y., Xu, Y., Zhang, J., & Lu, Y. (2020). Balance between community assembly processes mediates species coexistence in agricultural soil microbiomes across eastern China. *The ISME Journal*, 14(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0522-9>

Juby, S., Jishma, P., & Radhakrishnan, E. K. (2021). 1—Emerging insights on the potential role of plant-associated microorganisms in sustainable agriculture. En M. K. Solanki, P. L. Kashyap, R. A. Ansari, & B. Kumari (Eds.), *Microbiomes and Plant Health* (pp. 3–28). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819715-8.00001-X>

Kinkel, L. L. (1997). Microbial Population Dynamics on Leaves. *Annual Review of Phytopathology*, 35(1), 327–347. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.35.1.327>

Knuuttila, T., & Loettgers, A. (2017). Modelling as Indirect Representation? The Lotka–Volterra Model Revisited. *The British Journal for the Philosophy of Science*, 68(4), 1007–1036. <https://doi.org/10.1093/bjps/axv055>

Koskella, B. (2020). The phyllosphere. *Current Biology*, 30(19), R1143–R1146. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.07.037>

Koskella, B., Hall, L. J., & Metcalf, C. J. E. (2017). The microbiome beyond the horizon of ecological and evolutionary theory. *Nature Ecology & Evolution*, 1(11), 1606–1615. <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0340-2>

Langenheder, S., & Lindström, E. S. (2019). Factors influencing aquatic and terrestrial bacterial community assembly. *Environmental Microbiology Reports*, 11(3), 306–315. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12731>

Langenheder, S., & Székely, A. J. (2011). Species sorting and neutral processes are both important during the initial assembly of bacterial communities. *The ISME Journal*,

5(7), 1086–1094. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.207>

Lehman, C. L., Loberg, S., & Clark, A. (2019). *Quantitative ecology: A new unified approach* (Edition 1.0). University of Minnesota Libraries Publishing.

Leinweber, A., Fredrik Inglis, R., & Kümmerli, R. (2017). Cheating fosters species co-existence in well-mixed bacterial communities. *The ISME Journal*, 11(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.195>

Lemanceau, P., Blouin, M., Muller, D., & Moënne-Loccoz, Y. (2017). Let the Core Microbiota Be Functional. *Trends in Plant Science*, 22(7), 583–595. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.04.008>

Liao, J., Cao, X., Zhao, L., Wang, J., Gao, Z., Wang, M. C., & Huang, Y. (2016). The importance of neutral and niche processes for bacterial community assembly differs between habitat generalists and specialists. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(11), fiw174. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw174>

Lindow, S. E., & Brandl, M. T. (2003). Microbiology of the Phyllosphere. *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.*, 69.

Lopez, P. (2019, marzo 4). *Detallan la historia evolutiva de hongos y plantas*. Gaceta UNAM. <https://www.gaceta.unam.mx/detallan-la-historia-evolutiva-de-hongos-y-plantas/>

Luan, L., Liang, C., Chen, L., Wang, H., Xu, Q., Jiang, Y., & Sun, B. (2020). Coupling Bacterial Community Assembly to Microbial Metabolism across Soil Profiles. *mSystems*, 5(3), e00298-20. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00298-20>

Madsen, J. S., Sørensen, S. J., & Burmølle, M. (2018). Bacterial social interactions and the emergence of community-intrinsic properties. *Current Opinion in Microbiology*, 42, 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.11.018>

Maier, R. M., & Pepper, I. L. (2015). Chapter 3—Bacterial Growth. En I. L. Pepper, C. P. Gerba, & T. J. Gentry (Eds.), *Environmental Microbiology (Third Edition)* (pp. 37–56). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394626-3.00003-X>

Mataigne, V., Vannier, N., Vandenkoornhuysen, P., & Hacquard, S. (2021). Microbial Systems Ecology to Understand Cross-Feeding in Microbiomes. *Frontiers in Microbiology*, 12.

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.780469>

Mayoral-Peña, Z. (2023). *Efecto de los microorganismos en la ecología y evolución de las interacciones entre las plantas y sus insectos herbívoros*. Universidad Autónoma de Querétaro.

McFall-Ngai, M. (2008). Are biologists in “future shock”? Symbiosis integrates biology across domains. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), 789–792.

<https://doi.org/10.1038/nrmicro1982>

Morán, A. (2023). *Interacciones ecológicas entre bacterias, una aproximación para entender el efecto de la microbiota de los insectos sobre las defensas de las plantas*.

Universidad Autónoma de Querétaro.

Nemergut, D. R., Schmidt, S. K., Fukami, T., O’Neill, S. P., Bilinski, T. M., Stanish, L. F.,

Knelman, J. E., Darcy, J. L., Lynch, R. C., Wickey, P., & Ferrenberg, S. (2013).

Patterns and Processes of Microbial Community Assembly. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 77(3), 342–356.

<https://doi.org/10.1128/MMBR.00051-12>

Oksanen, J., Simpson, G. L., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O’Hara, R. B., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Szoecs, E., Wagner, H., Barbour, M., Bedward, M., Bolker, B., Borcard, D., Carvalho, G., Chirico, M., Caceres, M. D., Durand, S., ... Weedon, J. (2022). *vegan: Community Ecology Package (2.6-4)* [Software].

<https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html>

Palmer, J. D., & Foster, K. R. (2022). Bacterial species rarely work together. *Science*, 376(6593), 581–582. <https://doi.org/10.1126/science.abn5093>

Partida-Martínez, L. P., & Heil, M. (2011). The Microbe-Free Plant: Fact or Artifact? *Frontiers in plant science*, 2, 100. <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00100>

Pearce, B. K. D., Tupper, A. S., Pudritz, R. E., & Higgs, P. G. (2018). Constraining the Time Interval for the Origin of Life on Earth. *Astrobiology*, 18(3), 343–364.

<https://doi.org/10.1089/ast.2017.1674>

Picot, A., Shibasaki, S., Meacock, O. J., & Mitri, S. (2023). Microbial interactions in theory

- and practice: When are measurements compatible with models? *Current Opinion in Microbiology*, 75, 102354. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2023.102354>
- Plazas, S. B. (2020). *PATRONES DE DIVERSIDAD ALFA Y BETA PARA QUINCE COMPLEJOS DE PÁRAMO DE COLOMBIA*.
- R Core Team. (2023). *R: A Language and Environment for Statistical Computing* [Software]. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Record, N. R., Pershing, A. J., & Maps, F. (2014). The paradox of the “paradox of the plankton”. *ICES Journal of Marine Science*, 71(2), 236–240. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fst049>
- Redford, A. J., & Fierer, N. (2009). Bacterial Succession on the Leaf Surface: A Novel System for Studying Successional Dynamics. *Microbial Ecology*, 58(1), 189–198. <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9495-y>
- Remus-Emsermann, M. N. P., Tecon, R., Kowalchuk, G. A., & Leveau, J. H. J. (2012). Variation in local carrying capacity and the individual fate of bacterial colonizers in the phyllosphere. *The ISME Journal*, 6(4), 756–765. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.209>
- Ren, Y., Xun, W., Yan, H., Ma, A., Xiong, W., Shen, Q., & Zhang, R. (2020). Functional compensation dominates the assembly of plant rhizospheric bacterial community. *Soil Biology and Biochemistry*, 150, 107968. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107968>
- Reynolds, J. (2005, septiembre 30). *Serial Dilution Protocols*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Serial-Dilution-Protocols-Reynolds/6a3728ef4275db5a0dd8cb95958d71e98a9e1797>
- Rivett, D. W., Jones, M. L., Ramoneda, J., Mombrikotb, S. B., Ransome, E., & Bell, T. (2018). Elevated success of multispecies bacterial invasions impacts community composition during ecological succession. *Ecology Letters*, 21(4), 516–524. <https://doi.org/10.1111/ele.12916>
- Rodríguez Amor, D., & Dal Bello, M. (2019). Bottom-Up Approaches to Synthetic

- Cooperation in Microbial Communities. *Life*, 9(1), Article 1.  
<https://doi.org/10.3390/life9010022>
- Roy, P., & Kumar, A. (2020). Chapter 1—Arthrobacter. En N. Amaresan, M. Senthil Kumar, K. Annapurna, K. Kumar, & A. Sankaranarayanan (Eds.), *Beneficial Microbes in Agro-Ecology* (pp. 3–11). Academic Press.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00001-0>
- Roy, S., & Chattopadhyay, J. (2007). Hacia una resolución de ' la paradoja del plancton ': Una breve reseña de los mecanismos propuestos. *Ecological Complexity*, 4(1), 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.ecocom.2007.02.016>
- rstatix: Marco compatible con tuberías para pruebas estadísticas básicas.* (2023). [Software]. <https://cran.r-project.org/web/packages/rstatix/index.html>
- Ruhe, Z. C., Low, D. A., & Hayes, C. S. (2013). Bacterial contact-dependent growth inhibition. *Trends in Microbiology*, 21(5), 230–237.  
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.02.003>
- Sachs, J. L., & Hollowell, A. C. (2012). The Origins of Cooperative Bacterial Communities. *mBio*, 3(3), 10.1128/mbio.00099-12. <https://doi.org/10.1128/mbio.00099-12>
- Salisbury, A. (2011). *MATHEMATICAL MODELS IN POPULATION DYNAMICS*.
- Seidl, M. F., & Thomma, B. P. H. J. (2017). Transposable Elements Direct The Coevolution between Plants and Microbes. *Trends in Genetics*, 33(11), 842–851.  
<https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.07.003>
- Serrano, L. (2007). Synthetic biology: Promises and challenges. *Molecular Systems Biology*, 3(1), 158. <https://doi.org/10.1038/msb4100202>
- Somerfield, P. J., Clarke, K. R., & Warwick, R. M. (2008). Simpson Index. En *Encyclopedia of Ecology* (pp. 3252–3255). Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/B978-008045405-4.00133-6>
- Song, H.-S., Lee, J.-Y., Haruta, S., Nelson, W. C., Lee, D.-Y., Lindemann, S. R., Fredrickson, J. K., & Bernstein, H. C. (2019). Minimal Interspecies Interaction Adjustment (MIIA): Inference of Neighbor-Dependent Interactions in Microbial Communities. *Frontiers in*

- Microbiology*, 10, 1264. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01264>
- Stubbenieck, R. M., Vargas-Bautista, C., & Straight, P. D. (2016). Bacterial Communities: Interactions to Scale. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.01234>
- Suárez, J. (2018). 'The importance of symbiosis in philosophy of biology: An analysis of the current debate on biological individuality and its historical roots'. *Symbiosis*, 76(2), 77–96. <https://doi.org/10.1007/s13199-018-0556-1>
- Tellez, Z. J. B. (2017). *RASGOS FUNCIONALES DE COMUNIDADES BACTERIANAS ASOCIADAS A ECOSISTEMAS NATURALES: REVISIÓN SISTEMÁTICA*. PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA.
- Tominaga, T., An, S.-Y., Oyaizu, H., & Yokota, A. (2009). *Sporosarcina luteola* sp. Nov. Isolated from soy sauce production equipment in Japan. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 55(3), 217–223. <https://doi.org/10.2323/jgam.55.217>
- Valentín-Vargas, A., Toro-Labrador, G., & Massol-Deyá, A. A. (2012). Bacterial Community Dynamics in Full-Scale Activated Sludge Bioreactors: Operational and Ecological Factors Driving Community Assembly and Performance. *PLOS ONE*, 7(8), e42524. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042524>
- van den Berg, N. I., Machado, D., Santos, S., Rocha, I., Chacón, J., Harcombe, W., Mitri, S., & Patil, K. R. (2022). Ecological modelling approaches for predicting emergent properties in microbial communities. *Nature Ecology & Evolution*, 6(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/s41559-022-01746-7>
- Vibrans, H., Hanan Alipi, A. M., Mondragón Pichardo, J., & Tenorio Lezama, P. (2009, agosto 13). *Datura inoxia—Ficha informativa*. *Datura inoxia* P. Mill. <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/solanaceae/datura-inoxia/fichas/ficha.htm>
- Walsh, C. M., Becker-Uncapher, I., Carlson, M., & Fierer, N. (2021). Variable influences of soil and seed-associated bacterial communities on the assembly of seedling microbiomes. *The ISME Journal*, 15(9), Article 9.

<https://doi.org/10.1038/s41396-021-00967-1>

Widder, S., Allen, R. J., Pfeiffer, T., Curtis, T. P., Wiuf, C., Sloan, W. T., Cordero, O. X., Brown, S. P., Momeni, B., Shou, W., Kettle, H., Flint, H. J., Haas, A. F., Laroche, B., Kreft, J.-U., Rainey, P. B., Freilich, S., Schuster, S., Milferstedt, K., ... Soyer, O. S. (2016). Challenges in microbial ecology: Building predictive understanding of community function and dynamics. *The ISME Journal*, *10*(11), Article 11.

<https://doi.org/10.1038/ismej.2016.45>

Wisnoski, N. I., Muscarella, M. E., Larsen, M. L., Peralta, A. L., & Lennon, J. T. (2020). Metabolic insight into bacterial community assembly across ecosystem boundaries. *Ecology*, *101*(4), e02968. <https://doi.org/10.1002/ecy.2968>

Wright, E. S., & Vetsigian, K. H. (2016). Inhibitory interactions promote frequent bistability among competing bacteria. *Nature Communications*, *7*(1), Article 1.

<https://doi.org/10.1038/ncomms11274>

Xiong, Y., Tang, L., Jia, H., Shao, C., Tang, J., Xu, Y., Yan, L., & Zhang, D. (2022). Microbial Networks Reveal the Structure of Water Microbial Communities in Kalamaili Mountain Ungulate Nature Reserve. *Water*, *14*(14), Article 14.

<https://doi.org/10.3390/w14142188>

Yang, Y., Cheng, K., Li, K., Jin, Y., & He, X. (2022). Deciphering the diversity patterns and community assembly of rare and abundant bacterial communities in a wetland system. *Science of The Total Environment*, *838*, 156334.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156334>

Yao, H., Sun, X., He, C., Li, X.-C., & Guo, L.-D. (2020). Host identity is more important in structuring bacterial epiphytes than endophytes in a tropical mangrove forest. *FEMS Microbiology Ecology*, *96*(4), fiae038. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae038>

Yao, H., Sun, X., He, C., Maitra, P., Li, X.-C., & Guo, L.-D. (2019). Phyllosphere epiphytic and endophytic fungal community and network structures differ in a tropical mangrove ecosystem. *Microbiome*, *7*(1), 57.

<https://doi.org/10.1186/s40168-019-0671-0>

Zamora, A., Malaver, N., & Ramoa, J. (2012, enero). ANÁLISIS FUNCIONAL DE MICROORGANISMOS: UN ESTIMADOR DE DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA COMUNITARIA. *ACTA BIOLOGICA VENEZUELICA*, 32(1), 57–86.

Zelezniak, A., Andrejev, S., Ponomarova, O., Mende, D. R., Bork, P., & Patil, K. R. (2015). Metabolic dependencies drive species co-occurrence in diverse microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(20), 6449–6454. <https://doi.org/10.1073/pnas.1421834112>

Zuñiga, C., Zaramela, L., & Zengler, K. (2017). Elucidation of complexity and prediction of interactions in microbial communities. *Microbial Biotechnology*, 10(6), 1500–1522. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12855>