



**Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo, A. C.**

**INTERACCIONES ANTAGONISTAS ENTRE *Bacillus* spp. DE  
UNA COMUNIDAD SINTÉTICA MODELO DE  
CUATROCIÉGENAS, COAHUILA.**

---

Por:

**Valeria Guzmán Mellado**

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Valeria Guzmán Mellado, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.

---

Dr. Jorge Gustavo Rocha Estrada  
Director de tesis

---

Dra. Gabriela Olmedo Álvarez  
Co-directora de tesis

---

Dr. Eneas Aguirre von-Wobeser  
Integrante del comité de tesis

---

Dra. María Claudia Villicaña Torres  
Integrante del comité de tesis

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Interacciones Antagonistas entre *Bacillus* spp. de una Comunidad Sintética Modelo de Cuatrociénegas, Coahuila” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Valeria Guzmán Mellado, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN  
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**  
Coordinación de Programas Académicos

  
Dr. Pablo Wong González  
Director General

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante todo el posgrado, y por el apoyo hacia el proyecto, a través del cual se logró realizar el proceso experimental.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD) por darme la oportunidad de estudiar el posgrado de Maestría en Ciencias, pero sobre todo a la Unidad Regional de Hidalgo por abrirme las puertas de sus instalaciones.

Al proyecto 39589 “Patrones y Dinámica de Ensamblaje de Comunidades Microbianas Sintéticas Basadas en Interacciones Competitivas” por el financiamiento para llevar a cabo la fase experimental de esta tesis.

Al director de mi tesis, el Dr. Jorge Rocha por hacerme parte de su equipo, por instruirme y guiarme todo este tiempo. Por todo lo que me enseñó en el laboratorio y la paciencia que me tuvo, así como también por mostrarme lo que significa hacer ciencia.

A la Co-directora de tesis Dra. Gabriela Olmedo por sus atenciones y sugerencias a lo largo del posgrado y por recibirme en el laboratorio de Biología Molecular y Ecología Microbiana del Cinvestav Irapuato, como parte de una estancia de investigación durante la fase experimental inicial del proyecto.

A la Dra. Claudia Villicaña y el Dr. Eneas Aguirre que forman parte del comité de revisión, por su colaboración y la forma en la que me apoyaron, enseñaron y transmitieron sus conocimientos.

A mis compañeros de laboratorio, esta etapa de mi vida no habría sido la misma sin su cálida amistad, por apoyarme siempre, y enseñarme el verdadero significado del trabajo en equipo.

A mi familia: mamá, hermanos y mi tita, por las muestras de apoyo incondicional a la distancia durante todo el posgrado.

## **DEDICATORIA**

A mi tito en el cielo.

## CONTENIDO

<b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL</b> .....	3
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	4
<b>DEDICATORIA</b> .....	5
<b>CONTENIDO</b> .....	6
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	8
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	9
<b>RESUMEN</b> .....	10
<b>ABSTRACT</b> .....	11
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	12
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	14
2.1. Papel de las Comunidades Microbianas en los Ecosistemas. ....	14
2.2. Interacciones Microbianas.....	16
2.2.1. Efecto de las Interacciones en las Comunidades Microbianas. ....	17
2.2.2. Interacciones Microbianas de Suelo y Sedimento. ....	20
2.3. Estudio de las Interacciones Microbianas .....	22
2.3.1. Modelos de Estudio. ....	22
2.3.2. Comunidades Microbianas Sintéticas.....	23
2.4. Cuatrociénegas como Hábitat Modelo de Estudio de las Interacciones Microbianas. ....	24
2.4.1. Comunidades Microbianas del Sedimento de la Laguna Churince. ....	25
2.4.2. Comunidad Sintética BARS. ....	26
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	29
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	30
4.1. Objetivo General. ....	30
4.2. Objetivos Específicos. ....	30
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	31
5.1. Generalidades. ....	31
5.1.1. Cepas.....	31
5.1.2. Medios de Cultivo.....	32
5.1.3. Condiciones de Crecimiento.....	33
5.2. Predicción de <i>Clusters</i> de Genes para la Síntesis de Metabolitos Secundarios. ....	33
5.3. Equivalencia Ecológica. ....	34
5.3.1. Obtención y Selección de Mutantes Espontáneas Resistentes a Rifampicina. ....	35
5.3.2. Ensayos de Confrontación Doble. ....	36
5.3.3. Ensayos de Confrontación Triple. ....	37
5.4. Ensayos de Inhibición en Agar.....	37
5.4.1. Búsqueda de Equivalencia Ecológica.....	38
5.4.2. Prueba de Sinergismo y Cooperación.....	38

## CONTENIDO (continuación)

5.4.3. Determinación de la Utilización de Fuentes de Hierro.....	39
5.5. Predicción Computacional del Metabolito Involucrado en la Interacción Antagonista.....	39
5.5.1. Estimación de la Actividad Biológica.....	40
5.5.2. Predicción de la Estructura Molecular.....	40
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
6.1. Perfil de BGCs Codificados en los Genomas de las Cepas de Estudio.....	42
6.2. Interacciones en Medio Líquido.....	46
6.2.1. Mutantes Resistentes a Rifampicina.....	46
6.2.2. Equivalencia Ecológica entre las Cepas.....	48
6.3. Interacciones en Agar.....	52
6.3.1. Sinergismo y Equivalencia Ecológica.....	52
6.3.2. Participación de Sideróforos.....	53
6.4. Caracterización del Metabolito Antagonista.....	55
6.4.1. Actividad Biológica Potencial de los Genomas.....	55
6.4.2. Identificación de Genes Biosintéticos del <i>cluster Bp-ZmA-Like</i> .....	56
6.4.3. Estructura Molecular.....	58
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>61</b>
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>69</b>
<b>9. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>71</b>
<b>10. REFERENCIAS.....</b>	<b>73</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Naturaleza multiescala de los ecosistemas microbianos.....	14
2	Servicios de soporte y regulación de la microbiota a los ecosistemas.....	15
3	Interacciones ecológicas entre dos especies diferentes.....	18
4	Interacciones entre las cepas de la comunidad BARS.....	27
5	Análisis de BGCs presentes en las cepas cercanas a Bp145.....	43
6	Alineamiento múltiple de <i>clusters</i> sin referencia.....	44
7	Análisis AntiSMASH de los <i>clústers</i> presentes en cepas cercanas a Bp145, Sh20a y Bc111. ....	45
8	Caracterización de las mutantes espontáneas resistentes a rifampicina. ....	47
9	Comparación microscópica de <i>Sutcliffiella horikoshii</i> .....	48
10	Confrontaciones en medio marino líquido.....	50
11	<i>Cluster</i> de genes de <i>Bp-ZmA-Like</i> .....	51
12	Ensayos de inhibición y sobrevivencia.....	53
13	Prueba de utilización de Fe <sup>+3</sup> en el antagonismo.....	54
14	Predicción de la actividad biológica de los BGC con ID de antibióticos.....	56
15	Perfil de genes involucrados en la actividad biológica antimicrobiana.....	57
16	Predicción de estructura molecular.....	59



## LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Metabolitos secundarios producidos por <i>Bacillus</i> spp. y su potencial biológico.....	19
2 Cepas cercanas a la cepa antagonista.....	31
3 Cepas cercanas a la cepa sensible.....	31
4 Cepas cercanas a la cepa resistente.....	32
5 Preparación del medio marino a partir de soluciones de sales.....	33
6 Genes del <i>Bp-ZmA-Like</i> . ....	51
7 Formato SMILE de las estructuras moleculares predichas. ....	58
8 Asignación de nombre molecular acorde a la IUPAC. ....	60

## RESUMEN

La laguna Churince es un sistema acuático oligotrófico ubicado en Cuatrociénegas, México, en donde la biodiversidad es estable espacial y temporalmente; por lo tanto, las comunidades microbianas en este hábitat están compuestas por linajes antiguos y son de interés científico. Utilizando estrategias de ecología sintética para el estudio de *Bacillus* spp., se ha encontrado que el ensamblaje de las comunidades de sedimento en Churince está mediado por interacciones antagonistas, relacionadas con su capacidad para producir metabolitos secundarios tóxicos. En la comunidad sintética BARS (*Bacillus* Antagonista, Resistente, Sensible) la interacción de antagonismo entre la cepa *Bacillus pumilus* Bp145 (antagonista) y la cepa *Sutcliffiella horikoshii* Sh20a (sensible), se ve atenuada por la presencia de la cepa *Bacillus cereus* Bc111 (resistente). En este trabajo se exploran las bases genéticas y moleculares que median el antagonismo en esta comunidad. En la primera etapa, se realizó un análisis de genómica comparativa entre cepas filogenéticamente cercanas a Bp145, identificando *clusters* genéticos para la biosíntesis (BGC: *Biosynthetic Gene Cluster*) de antibióticos. En una segunda etapa se sustituyó a Bp145 por las cepas cercanas en confrontaciones dobles con Sh20a para determinar equivalencia ecológica, buscando correlacionar la presencia de *clusters* con la capacidad antagonista de cepas de *B. pumilus*. En una última etapa se caracterizó el BGC y el metabolito candidato mediante línea de comandos y *Machine Learning* para definir su actividad biológica. De acuerdo al perfil de BGC, todas las cepas tienen *clusters* de síntesis de antibióticos identificados como fengicina, liquenisina, bacilisina, bacilibactina y zwittermicina (*Bp-ZmA-Like*). Con base en las cepas que resultaron ecológicamente equivalentes a Bp145 (Bp144 y Bp150), se identificó a *Bp-ZmA-Like* como el *cluster* candidato para mediar la interacción, pues solo está presente en las cepas equivalentes y no en las demás. Este *cluster* biosintetiza un metabolito secundario aún no descrito, que es una combinación entre un policétido-péptido no ribosomal que tiene una probabilidad del 64% de tener actividad anti Gram positiva. La generación de conocimiento sobre los mecanismos que rigen las interacciones en las comunidades microbianas es indispensable para el entendimiento del papel de la biodiversidad en el adecuado funcionamiento de los ecosistemas.

**Palabras clave:** antagonismo, *Bacillus*, metabolitos secundarios, BGC.

## ABSTRACT

The Churince lagoon located in Cuatrociénegas, Mexico, is an oligotrophic aquatic system where microbial diversity is spatially and temporally stable; therefore, the microbial communities in this habitat are composed of ancient lineages and are of scientific interest. Using synthetic ecology strategies to study *Bacillus* spp., it has been found that the assembly of sediment communities in Churince is mediated by antagonistic interactions, related to their ability to produce toxic secondary metabolites. In the BARS (**B***acillus* **A**ntagonist, **R**esistant, **S**ensitive) synthetic community, the antagonism interaction between *Bacillus pumilus* Bp145 strain (antagonist) and *Sutcliffiella horikoshii* Sh20a strain (sensitive), is attenuated by the presence of *Bacillus cereus* Bc111 strain (resistant). In this work, we explored the genetic and molecular bases that mediate antagonism in this community. In the first stage, a comparative genomic analysis was performed between strains phylogenetically close to Bp145, identifying *Biosynthetic Gene Clusters* (BGC) for antibiotics. In the second stage, Bp145 was replaced by close strains in double confrontations with Sh20a to determine ecological equivalence, seeking to correlate the presence of clusters with the antagonistic capacity of *B. pumilus* strains. In the final stage, the BGC and the candidate metabolite were characterized using command lines and Machine Learning to define their biological activity. According to the BGC profile, all strains have antibiotic synthesis clusters identified as fengycin, lichenysin, bacilysin, bacillibactin and zwittermicin A (*Bp-ZmA-Like*). Based on the strains that were ecologically equivalent to Bp145 (Bp144 and Bp150), *Bp-ZmA-Like* was identified as the candidate cluster to mediate the interaction, since it is only present in the equivalent strains and not in the others. This cluster biosynthesizes a secondary metabolite not yet described, which is a polyketide-non ribosomal peptide combination that has a 64% probability of having anti-Gram positive activity. The generation of knowledge on the mechanisms that govern interactions in microbial communities is essential for understanding the role of microdiversity in the proper functioning of ecosystems.

**Keywords:** antagonism, *Bacillus*, secondary metabolites, BGC.

## 1. INTRODUCCIÓN

El planeta Tierra alberga una gran diversidad de bacterias de diferentes grupos que desempeñan funciones críticas en los procesos biogeoquímicos naturales, sustentando el ecosistema en el que habitan y se desarrollan. Estas actividades microbianas no ocurren de manera aislada e individual, sino que coexisten bajo complejas interacciones ecológicas que son necesarias para que las propiedades y procesos de un ecosistema se manifiesten y se lleven a cabo de manera jerárquica, hasta ser percibidas en una escala macroscópica (Cordero y Datta, 2016). Estas interacciones dan lugar a fenotipos y genotipos de los miembros de una comunidad microbiana, y pueden tener un impacto positivo o negativo sobre la estructura y función de las especies que la componen. Estas interacciones incluyen, por ejemplo, fenómenos ecológicos como el mutualismo y la competencia entre dichos miembros de la comunidad (Faust y Raes, 2012). Las interacciones de competencia son indispensables en un ecosistema microbiano, sobre todo aquellas interacciones por competencia antagonista, las cuales son, en parte, responsables del ensamblaje de las comunidades microbianas; en este caso, una de las especies de la comunidad es capaz de inhibir el desarrollo de otra, a través de la producción de metabolitos secundarios como toxinas y antibióticos (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2013).

Estudios recientes plantean que las interacciones antagonistas son fundamentales para el desarrollo de una comunidad microbiana, pues influyen en la estructura y ensamblaje de todas las especies que la conforman (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2013). Esto puede ser suficiente para explicar las características de biodiversidad que poseen los ecosistemas y que son indispensables para que la vida allí se lleve a cabo de manera correcta. Sin embargo, el estudio de este tipo de interacciones y su efecto en la dinámica microbiana es muy complejo, pues numerosas subpoblaciones y variables están involucradas en ambientes naturales. Dichas variables son difíciles de controlar en un experimento bajo técnicas microbiológicas, y cuando no se consideran, el conocimiento generado sobre este fenómeno se ve limitado. Por esto, el área de la ecología sintética busca reducir tales variables utilizando una mezcla de especies microbianas para construir comunidades sintéticas a través de las cuales se pueda generar conocimiento sistemático en diseños experimentales robustos (Dunham, 2007). Esta estrategia nos da la posibilidad de estudiar y utilizar las propiedades de interés de una especie para la obtención de productos biotecnológicos, clínicos,

e investigación.

En este sentido, la laguna Churince de Cuatrociénegas se ha estudiado recientemente con base en la gran diversidad de interacciones microbianas que suceden en el sedimento de este sistema (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2013). Las lagunas de Cuatrociénegas son de interés científico, pues las especies microbianas han desarrollado estrategias para mantenerse y adaptarse en un ambiente oligotrófico, siendo muy estables en el tiempo y viables para el desarrollo de comunidades sintéticas a través de las cuales se les pueda estudiar. En estudios previos se aislaron y secuenciaron diversas especies de *Bacillus* spp. de esta laguna. Éstas cepas han sido estudiadas y mediante redes de interacción, se encontró que el ensamblaje de las comunidades microbianas en este microambiente es gracias a las interacciones antagonistas producto del metabolismo de *Bacillus* spp. (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2013; Rodríguez-Torres *et al.*, 2017). Los BGCs (*Biosynthetic Gene Clusters*) o grupos de genes de síntesis de metabolitos secundarios de estos genomas, podrían ser responsables de efectuar el antagonismo al codificar para la síntesis de antibióticos (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2013).

Para entender cómo surgen estas interacciones, Aguilar-Salinas (2018) desarrolló una comunidad sintética con propiedades emergentes a partir de *Bacillus* de la laguna Churince, a la cual denominaron BARS (*Bacillus*, **A**ntagonist, **R**esistant & **S**ensitive). Esta investigación encontró que la interacción de antagonismo dentro de la comunidad se ve atenuada por la presencia de la cepa resistente *Bacillus cereus* (Bc111) la cual es primordial para la supervivencia de la cepa sensible *Sutcliffiella horikoshii* (Sh20a) en presencia de la cepa antagonista *Bacillus pumilus* (Bp145). Sin embargo, aunque se han elucidado aspectos ecológicos de las interacciones en la comunidad BARS, todavía no se conocen los factores genéticos y moleculares que median el antagonismo, muerte celular y la resistencia; esta información es determinante para entender los procesos por los cuales emergen estas funciones.

Conocer las bases moleculares que rigen las interacciones antagonistas a través de la manipulación de la comunidad sintética BARS, es importante para entender el papel de la biodiversidad en el adecuado funcionamiento de un ecosistema en condiciones como las de la laguna Churince. Por lo tanto, este trabajo continúa la investigación sobre las interacciones antagonistas de la comunidad BARS mediante técnicas de genómica comparativa y funcional, donde se exploran e identifican los *clusters* de genes que pudieran median la síntesis de metabolitos secundarios responsables del antagonismo.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Papel de las Comunidades Microbianas en los Ecosistemas.

Así como los organismos multicelulares están compuestos por una organización jerárquica de tejidos, órganos y fibras, los diversos ecosistemas en el planeta Tierra están organizados por seres vivos, componentes químicos y físicos (Cordero y Datta, 2016). Esta organización es fundamental para que las propiedades macroscópicas del medio sean percibidas y el funcionamiento de los diferentes hábitats sea el adecuado. Dentro de este conjunto organizado de componentes biogeoquímicos, existen actividades esenciales que se llevan a cabo de manera microscópica, y aunque estos efectos ocurren a nivel de microbiodiversidad, las propiedades macroscópicas de un ecosistema dependen fuertemente de cómo se ensamblan todos los componentes microscópicos (Figura 1).

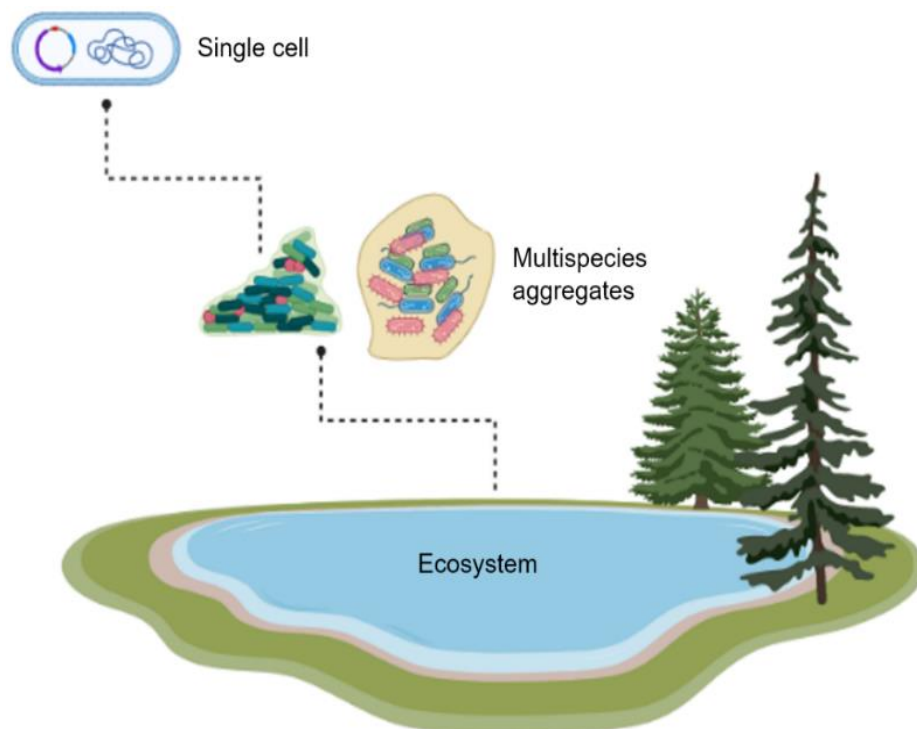


Figura 1. Naturaleza multiescala de los ecosistemas microbianos (Cordero y Datta, 2016).

Los diferentes componentes de los ecosistemas, sobre todo del tipo microbiológico, desempeñan funciones críticas en los procesos biogeoquímicos naturales, sustentando el funcionamiento del ecosistema en el que habitan y se desarrollan. Por ejemplo, existe evidencia de que la microbiota juega un rol importante para que los ciclos biogeoquímicos se lleven a cabo, es decir, que los elementos en las diferentes formas químicas se reciclen desde el medio ambiente hacia los organismos presentes en el ecosistema (Cordero y Datta, 2016; Smercina *et al.*, 2021; Falkowski *et al.*, 2008), lo que hace capaz al entorno en conjunto de generar respuestas globales al cambio climático. Además, con base en la biodiversidad, se puede predecir la dinámica de los nutrientes en el suelo, pues juegan un papel clave en la degradación de sustratos como carbono orgánico, nitrógeno, fósforo y azufre. Dicho lo anterior, la biodiversidad presente en los ecosistemas es indispensable para catalizar reacciones que son necesarias para su funcionamiento en general y para llevar a cabo colectivamente los procesos biogeoquímicos que regulan el planeta Tierra. Por ejemplo, las bacterias ya sean autótrofas o heterótrofas tienen capacidades determinadas como la transformación de elementos, descomposición de materia e intervienen en la regulación de procesos tales como la fotosíntesis (Le Bodelier, 2011). Estos procesos se resumen en la figura 2. A pesar de este hecho, en esta jerarquización de componentes macro y microscópicos, el papel de las interacciones entre microbiota con funciones potenciales sobre el sistema se ha investigado muy poco, en contraste con investigaciones sobre la función que tienen otros organismos como plantas y animales.

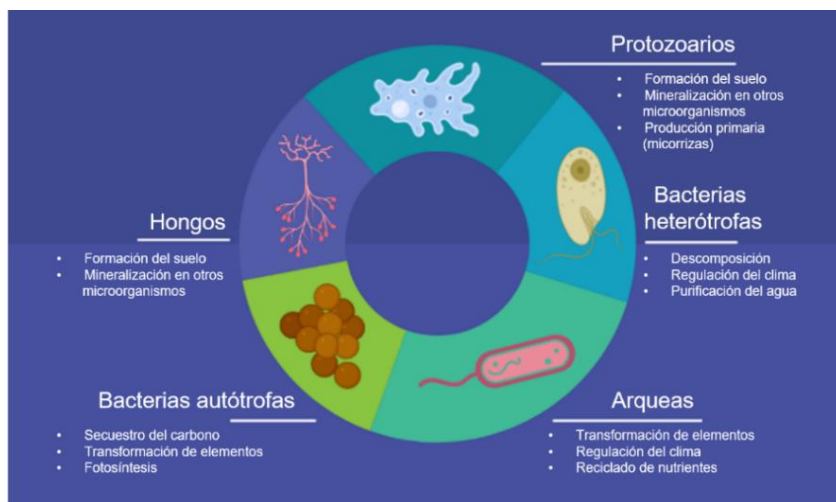


Figura 2. Servicios de soporte y regulación de la microbiota a los ecosistemas. Modificado de Le Bodelier, 2011.

## 2.2. Interacciones Microbianas.

Las interacciones microbianas son clave para el entendimiento de la biología de los microbiomas. Uno de los requisitos para que las comunidades microbianas puedan colonizar y establecerse en un ecosistema determinado es su capacidad de interactuar, donde todos los aspectos ecológicos como el intercambio genético, la conversión de metabolitos, y señalización, dan lugar a la selección de fenotipos y genotipos específicos (Mesquita *et al.*, 2016). En particular, estas especies desarrollan tales interacciones y se agregan en conjunto, lo que en consecuencia, aumenta el desempeño ecológico en el ecosistema.

Se sabe que los microorganismos, ya sean virus, bacterias, arqueas o protistas, coexisten a través de complejas redes de interacción ecológica, que incluyen acciones recíprocas intra o interespecies y que producen efectos tanto en la comunidad microbiana como en el medio ambiente (McGuire y Treseder, 2010; Qidong *et al.*, 2021). Estas comunidades están conformadas por especies que se relacionan entre sí y junto a sus capacidades metabólicas, se especializan para cumplir con ciertas funciones. La dinámica que siguen estas poblaciones microbianas tiende a cambiar en el tiempo debido a factores como las propias interacciones que se dan entre miembros de la misma comunidad o comunidades aledañas (Hibbing *et al.*, 2010). En el estudio de las interacciones, estos factores son la razón por la cual, actualmente se entiende poco sobre cómo surge la dinámica de las interacciones microbianas.

Esta dinámica, producto de la adaptación y especialización de las especies dentro de una comunidad ha dado lugar a la coevolución de las especies, que a su vez les ha permitido ocupar diferentes nichos ecológicos. Estas adaptaciones también han permitido que las interacciones ocurran por transferencia de información genética, en donde se pueden ver involucrados sistemas de *quorum sensing* y formación de biopelículas, entre otros procesos, sin embargo, existe evidencia de que algunos metabolitos secundarios son capaces de dar lugar a estas interacciones. Los metabolitos secundarios pueden ser moléculas bioactivas que desencadenan funciones importantes debido a su intercambio y conversión (Mesquita *et al.*, 2016; Pierce y Dutton, 2022). Dicho esto, queda claro que la síntesis de estos metabolitos en una red de interacción microbiana es, en parte, indispensable para el establecimiento, mantenimiento y dinámica en general de la microbiodiversidad en los ecosistemas.



### 2.2.1. Efecto de las Interacciones en las Comunidades Microbianas.

Las comunidades microbianas forman microsistemas complejos que pueden comprender miles de especies diferentes. Con frecuencia, éstas se ensamblan y desensamblan por migración, unión y desprendimiento de células; por lo tanto, estas redes de interacción ecológica son altamente dinámicas y dependen de las interacciones célula-célula (Tecon y Or, 2017). Estas interacciones pueden tener un impacto positivo, negativo, o neutro en las especies involucradas, siendo responsables de los cambios en la resistencia a perturbaciones y la eficiencia en la utilización de recursos, determinando así, el rendimiento, la estabilidad y resiliencia de las comunidades microbianas (Stachowicz, 2001; Faust y Raes, 2012; Qidong *et al.*, 2021). La forma en que surge este ensamblaje puede dictar la estructura y función de los ecosistemas microbianos. Esto es gracias a que las interacciones determinan qué tipo de conversiones metabólicas se deben llevar a cabo; también se debe a que los efectos combinados de tales interacciones y la estructura espacial, son factores que influyen en la diversidad y estabilidad de la comunidad. Además de las consecuencias funcionales directas como la complementación metabólica, las interacciones ecológicas y el ensamblaje espacial también pueden afectar la capacidad de las comunidades microbianas de amortiguar el cambio ambiental (Bascompte, 2010; Rohr *et al.*, 2014).

Algunas interacciones microbianas tienden a cambiar con base en la configuración espacial. Un ejemplo de ello son aquellas comunidades en donde una especie puede adoptar una respuesta “doble” en función de la toxicidad y beneficio que le otorgan las demás especies. Es decir, es capaz de posicionarse espacialmente a una distancia óptima, beneficiándose y protegiéndose a la vez, de lo que una cepa y otra producen (Stacy *et al.*, 2014). La interpretación ecológica para este tipo de interacciones es crucial para el entendimiento del efecto que producen interacciones de cooperación y de competencia dentro de un ecosistema microbiano. Además de esto, se ha demostrado que al igual que la organización espacial de las interacciones microbianas, el intercambio de nutrientes y el secuestro de toxinas afectan la naturaleza de las interacciones microbianas en el ecosistema. (Kelsic *et al.*, 2015; Zeng y Burne, 2011).

Las interacciones microbianas pueden conducir a un efecto específico dentro de la comunidad, que pueden ser desde interacciones por comensalismo en donde una de las especies se beneficia de lo que otra produce, la cual no se ve afectada ni beneficiada, hasta interacciones por amensalismo que trae consigo una relación en donde solo una de las especies tiene un efecto negativo (Figura 3).

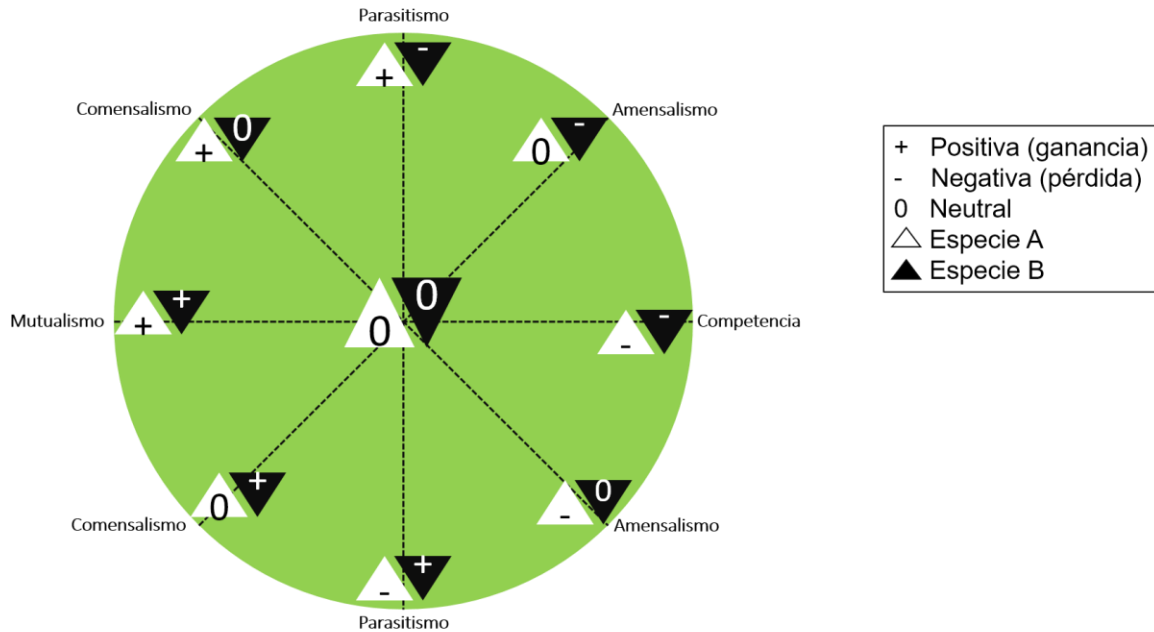


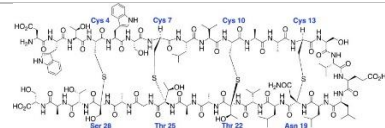
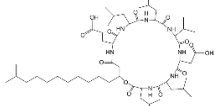
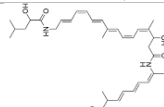
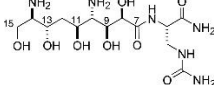
Figura 3. Interacciones ecológicas entre dos especies diferentes. Se presentan las posibles interacciones por pares. Para cada par, hay tres resultados posibles: positivo (+), negativo (-) y neutral (0) (Faust y Raes, 2012).

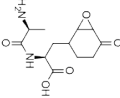
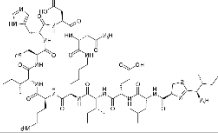
Las funciones que se llevan a cabo en un ecosistema microbiano se deben a las interacciones de sus componentes básicos como los genotipos (sus genes). En una interacción, cuando una de las especies involucradas produce beneficios para las demás, resultando en una mejora del estado general de la comunidad y la fuerza de colonización, se le denomina interacción mutualista o de cooperación. Mientras que, cuando una de las cepas produce toxinas y/u otros productos de su metabolismo para competir y matar a los demás miembros de la comunidad, se le denomina interacción por competencia antagonista. Ésta última se ve facilitada entre células vecinas debido a que se encuentran en entornos densamente poblados. Por lo tanto, se ha propuesto que el ensamblaje de bacterias en comunidades representa un sistema dinámico que proporciona un entorno en el que los mecanismos competitivos se desarrollan en nuevas estrategias de supervivencia (Stubbendieck *et al.*, 2016). En este sentido, una comunidad microbiana altamente competitiva es el resultado de un ambiente diverso en especies y por ende una alta redundancia funcional, lo que disminuye la posibilidad de que especies invasoras se establezcan en su hábitat (Van Elsas *et al.*, 2012). Además, diversos investigadores han propuesto que estas interacciones pueden determinar la actividad de una comunidad en un ecosistema gracias a la alta competencia (Becker *et al.*, 2012; Pacheco y Segre, 2019).

Algunas especies de bacterias llamadas “antagonistas”, generan este tipo de interacciones a través de la producción de antibióticos, limitando el crecimiento de bacterias competidoras y, por lo tanto, mejorar la disponibilidad de recursos (Pacheco y Segre, 2019). Estos antibióticos son generalmente moléculas compuestas por aminoácidos, ácidos grasos, y otros grupos funcionales importantes para generar el efecto antagonista. Estas moléculas pueden ser lipopéptidos, policétidos, péptidos no ribosomales, etc. y su actividad biológica va desde antibacterial hasta citotóxica, con mecanismos de acción como la inhibición de la síntesis de la pared celular y síntesis proteica, alteración de la membrana, metabolismo e incluso en la estructura de los ácidos nucleicos (Calvo y Martínez-Martínez, 2009). Como ejemplo se enlistan algunos metabolitos secundarios que biosintetiza el género *Bacillus* (Cuadro 1). Esto genera impactos negativos sobre algunas especies, en donde las antagonistas son capaces de beneficiarse y limitar el desarrollo de las más sensibles, un efecto que conduce a la colonización preferente de las antagonistas sobre un hábitat (Xia *et al.*, 2022).

La competencia por antagonismo puede ser, entonces, una clave adicional para predecir la dinámica de los ensamblajes naturales entre comunidades y debe implementarse en modelos de biodiversidad en el estudio de las interacciones microbianas, pues aún se desconoce cómo interactúan estos componentes básicos. Por lo tanto, es necesario estudiar las comunidades microbianas para comprender el impacto funcional de las interacciones sobre el ecosistema microbiano.

Cuadro 1. Metabolitos secundarios producidos por *Bacillus* spp. y su potencial biológico. Modificado de Pathma *et al.*, (2011).

Tipo de metabolito	Nombre	Estructura	Actividad biológica	Especie
Bacteriocina	Thurincina S		Bactericida	<i>B. thuringiensis</i>
Lipopéptido	Surfactina		Citotóxica	<i>B. subtilis</i>
Policétido	Bacillaene		Antibacterial	<i>B. amylolichefaciens</i>
Aminopoliol	Zwitermicina		Antifúngica	<i>B. cereus</i>

Dipéptido	Bacilisina		Antifúngica Antibacterial	<i>B. pumilus</i>
Péptidos no ribosomales	Bacitracina		Antibacterial	<i>B. licheniformis</i>

### 2.2.2. Interacciones Microbianas de Suelo y Sedimento.

Considerando que una célula bacteriana en el suelo podría tener un promedio de 120 especies circundantes, los suelos son sistemas con una gran biodiversidad, que puede dar lugar a diferentes tipos de interacciones microbianas (Raynaud y Nunan 2014; Gans *et al.*, 2005). Estas comunidades microbianas y sus interacciones son capaces de reciclar nutrientes y proporcionar vías importantes para la producción y degradación de los mismos. Un ejemplo de ello, es el impulso que dan a las plantas para crecer, gracias a la descomposición de elementos en formas inorgánicas de carbono, nitrógeno, fósforo y otros nutrientes. Por tal, se puede considerar que la productividad del suelo se puede utilizar como indicador de la salud del microbioma presente (Ciric *et al.*, 2012). Aunque esta estrategia es prometedora, todavía se requiere de una comprensión más profunda de la relación entre estructura y función de las interacciones microbianas del suelo.

Por otro lado, los microagregados de especies bacterianas (<250  $\mu\text{m}$ ) son los componentes principales de la jerarquización del suelo en la escala microscópica, siendo particularmente relevantes para que las interacciones microbianas se lleven a cabo ahí. Esto se debe a que las especies involucradas colonizan nichos especializados dentro de la estructura de tales microagregados, donde las bacterias viven tanto dentro como entre las partículas (Ebrahimi y Or, 2016). Otros autores sugieren que tales interacciones son cruciales para la transmisión de virus entre poblaciones microbianas, lo que probablemente influya en la estructura, función, estabilidad y evolución de las comunidades microbianas, debido a la lisis inducida y transferencia horizontal de genes (Weitz y Wilhelm, 2012). Esta dinámica podría ser relevante para diversos procesos en estos ambientes, aunado a que, la existencia de comunidades bacterianas en distintos microambientes dentro de la arquitectura del suelo, afecta directamente su desarrollo y actividad (Young, 1998). Además, los patrones espaciales, tienen un efecto regulador sobre la actividad de

las comunidades bacterianas, resultado de la difusión y dispersión de sustratos (Grundmann *et al.*, 2001). Esto podría tener efectos estimulantes o limitantes en la velocidad de los procesos mediados por las interacciones microbianas.

*Bacillus* es un género muy estudiado dentro de la microbiota del suelo, pues es conocido por su capacidad para sintetizar tanto sustancias beneficiosas para el ecosistema, como de control biológico, ya que solubilizan fosfatos, fijan nitrógeno, producen sideróforos, enzimas hidrolíticas, antibióticos, etc. (Senthilkumar *et al.*, 2009). A *Bacillus* spp. se les atribuyen, por ejemplo, funciones promotoras de crecimiento y de protección ante fitopatógenos en plantas. Estos atributos están estrechamente relacionados con la presencia de BGCs (*Biosynthetic Gene Clusters*) de síntesis de lipopéptidos antimicrobianos y buenas aptitudes de colonización (Pankaj *et al.*, 2012; Cazorla *et al.*, 2007). Esta última característica es producto de la capacidad de *Bacillus* spp. de competir contra otros microorganismos, debido a sus BGCs de síntesis de metabolitos secundarios capaces de producir antagonismo en una interacción.

Por otro lado, uno de los microbiomas más grandes y menos estudiados de la Tierra son los sedimentos, donde se ha visto que las comunidades microbianas poseen la mayor diversidad alfa y beta (Lozupone y Knight, 2007). La estructura de estos sistemas brinda el oportuno desarrollo de microambientes en donde las bacterias son capaces de crecer rápido, quelar minerales, e incluso de producir metabolitos secundarios, a través de los cuales interactúan y compiten (Long y Azam, 2001; Patin *et al.*, 2016; Hibbin *et al.*, 2010; Kinkel *et al.*, 2014). Por lo tanto, estos hábitats se caracterizan por albergar comunidades microbianas complejas que compiten mediante interacciones antagonistas por el espacio y los nutrientes.

En los sedimentos marinos, las interacciones antagonistas y la producción de antibióticos por bacterias son actualmente reconocidas; se ha propuesto que esta competencia es más frecuente en estos microambientes (Long y Azam, 2001; Burgess *et al.*, 1999). A pesar de esto, el papel de los antibióticos en la competencia en sedimentos marinos sigue siendo poco conocido, y se sabe aún menos sobre cómo estos compuestos estructuran las comunidades microbianas en estos microambientes. Aunado a ello, existe la posibilidad de que bacterias del género *Bacillus* se encuentren en este tipo de sistemas, interactuando y compitiendo con otras bacterias vecinas a través de la biosíntesis de metabolitos secundarios.

## 2.3. Estudio de las Interacciones Microbianas

Se sabe que incluso la comunidad microbiana más simple está compuesta por decenas de especies que, gracias a las tecnologías de secuenciación se han podido analizar y caracterizar (Curtis *et al.*, 2002). A pesar de eso, todavía existen limitaciones en el estudio de la función y dinámica que cumplen estas especies y sus interacciones, aún es necesario comprender la base molecular y ecológica de tales funciones que promueven compensaciones potenciales como la diversidad, estructura y tamaño de las comunidades microbianas.

### 2.3.1. Modelos de Estudio.

Con la finalidad de explicar la dinámica de las interacciones microbianas, se han propuesto modelos a través de los cuales se ha logrado un entendimiento más amplio sobre su ecología. El modelo más utilizado es el de las interacciones por pares, el cual establece el potencial de cooperación entre dos especies microbianas (Vetsigian *et al.*, 2011). Sin embargo, en un ecosistema intervienen diversas especies capaces de efectuar varios tipos de interacciones de orden superior y que son fundamentales para las propiedades de las redes ecológicas, además estas interacciones son más importantes que las interacciones por pares para la cooperación mutiespecífica (Freilich *et al.*, 2011; Solé y Bascompte, 2006). Asimismo, existe un modelo de redes de interacción en donde éstas son explicadas bajo un concepto de jerarquización en el cual, las especies más competitivas se posicionan como las de mayor jerarquía (Foster y Bell, 2012; Wright y Vetsigian, 2016).

Uno de los modelos más descritos es aquel en el que las redes de interacción que se originan son intransitivas, es decir que son cíclicas y no hay una jerarquía. El modelo más estudiado de interacción intransitiva es el de piedra-papel-tijeras, en el que participan tres especies en interacción por competencia, donde la especie A es mejor competidora que B, B es mejor que C y C es mejor que A (Sinervo y Lively, 1996). En el área de ecología ha sido propuesto por Kerr *et al.* (2002) para explicar el comportamiento de tres cepas isogénicas de *E. coli*; una de las cepas es capaz de

producir un metabolito secundario que inhibe el crecimiento de una segunda cepa, mientras que la tercera es capaz de resistir a tal efecto. Además, existen otros mecanismos llevados a cabo por bacterias en una comunidad que pueden ser fácilmente representados por un modelo intransitivo, por ejemplo, la competencia con base en los recursos disponibles, la síntesis, resistencia y sensibilidad a metabolitos secundarios tóxicos, e incluso el estadio de vida (Gallien, 2017).

Dichos modelos son capaces de predecir el resultado de las interacciones de la comunidad y los efectos de las perturbaciones. A pesar de esto, se sabe que la dinámica microbiana puede cambiar dependiendo el contexto ecológico en el que se encuentren, por lo que los modelos hasta ahora utilizados, no son suficientes para comprender cada uno de los casos. La limitante principal es que solo pueden aplicarse a ciertos ambientes, y todavía no se tiene un modelo para cada ecosistema o interacción existente. Por lo que, nuevos enfoques hacia la reconstrucción de redes de interacción, son necesarios para lograr modelos globales de dinámica microbiana en los ecosistemas (Faust y Raes, 2012).

### **2.3.2. Comunidades Microbianas Sintéticas.**

Con base en la influencia que tienen las interacciones microbianas en el desarrollo óptimo de los ecosistemas y sus componentes, es importante comprender, desde un punto de vista ecológico, de qué manera esta actividad microbiana tan esencial surge. De manera tradicional, el estudio de las comunidades microbianas se realiza a través de cultivos puros (De Roy *et al.*, 2014). Sin embargo, en la naturaleza intervienen diversas variables como factores bióticos o abióticos que influyen en la dinámica de una comunidad microbiana, y que son difíciles de reproducir a nivel laboratorio. Tomando en cuenta la complejidad y la cantidad de variables que intervienen en un ecosistema, se han desarrollado estudios que buscan acotar tales variables al mismo tiempo que se genera conocimiento suficiente para entender las interacciones microbianas en un sistema complejo y representativo del hábitat natural. Tal es el caso de la Ecología Sintética, la cual nace de la necesidad de estudiar a los microorganismos, interacciones y funciones dentro de una comunidad de un ecosistema específico. Esta vertiente de la Biología Sintética integra estudios de genómica, transcriptómica y fisiológicos que permiten observar el potencial metabólico de una comunidad

microbiana a través de la mezcla de especies, con el objetivo de recrear un sistema complejo a partir de comunidades sintéticas (De Roy *et al.*, 2014; Kelsic *et al.*, 2015). Además, las comunidades sintéticas son menos complejas, permiten un mayor control sobre el sistema y por ende lograr un estudio de las interacciones con diseños experimentales más robustos.

Con el apoyo de la Ecología Sintética se han podido diseñar y manipular microorganismos para mejorar su productividad y funcionalidad, atribuirles resistencia a estrés, o para que éstos posean características particulares de interés (Benner y Sismour, 2005). Las ventajas son numerosas, un ejemplo es el de Macchi y colaboradores (2018), donde lograron desarrollar un consorcio bacteriano sintético cuyas interacciones entre los miembros están especializadas en ciertos pasos biodegradativos de un compuesto contaminante. Este y otros objetivos en pro del medio ambiente son algunas ventajas que ofrece el diseño de comunidades sintéticas con base en que brinda la posibilidad de manipularlas racionalmente. Esto con la finalidad de entender la dinámica de las interacciones microbianas y su papel en los ecosistemas, lo que además es útil para contribuir al desarrollo de estrategias biotecnológicas que permitan optimizar una variedad de procesos microbiológicos que son de interés. En resumen, el ensamblaje de comunidades sintéticas ayuda a la ecología microbiana a pasar de un campo mayoritariamente observacional y correlativo a uno con conocimientos más mecanicistas y moleculares.

#### 2.4. Cuatrociénegas como Hábitat Modelo de Estudio de las Interacciones Microbianas.

Cuatrociénegas es un importante reservorio de diversidad ubicado en el estado de Coahuila, al norte de México. Es un ecosistema conformado por diferentes cuerpos de agua, a pesar de ser una zona desértica. Estos sistemas de acuíferos son interesantes porque, además de no haber tenido nunca intervención antropogénica, contienen bajos niveles de fósforo y nutrientes, pero con una alta cantidad de azufre y magnesio que asemejan a las condiciones marinas. Aunque estas características hacen de este ecosistema un ambiente oligotrófico, estas cuencas de agua poseen una diversidad inmensa de géneros bacterianos que contienen en su mayoría linajes contemporáneos y, específicamente, se han encontrado más de 3,000 cepas bacterianas (Souza *et al.*, 2004). Aunado a esto, se ha descubierto que este ecosistema ha sido capaz de mantener las



condiciones marinas ancestrales gracias a la disolución de minerales y nutrientes que provienen del sedimento (Wolaver *et al.*, 2013), una razón que ha permitido la megadiversidad de microorganismos que aún persiste en este nicho ecológico.

Investigadores refieren que las comunidades microbianas endémicas de Cuatrociénegas han desarrollado la capacidad de sobrevivir a metales pesados, y mediante quimiosíntesis utilizar el CO<sub>2</sub>. Además, éstas han evolucionado para competir contra microorganismos del mundo exterior, lo que no ha permitido la proliferación de bacterias ajenas al ecosistema y por ende que éstas tengan ancestros filogenéticos muy antiguos (Souza *et al.*, 2018). Al ser sistemas muy complejos, poco variables, en donde las comunidades microbianas son estables espacial y temporalmente, se puede decir que las pozas de Cuatrociénegas son el perfecto modelo de estudio de las interacciones microbianas a través del desarrollo de comunidades sintéticas. Tomando en cuenta esto, Aguirre-von-Wobeser y colaboradores (2014) analizaron las interacciones de bacterias aisladas de uno de los cuerpos de agua en Cuatrociénegas, donde descubren que cepas del género *Pseudomonas* que poseían alto potencial de competir con cepas que tenían menor distancia genética.

Por un lado, esto podría contribuir al entendimiento de los procesos microbianos en este contexto, de sobrevivir a metales pesados y CO<sub>2</sub>, lo que podría derivar en nuevos métodos biotecnológicos de biorremediación. Por otro lado, en este trabajo, el estudio de las interacciones microbianas en una comunidad sintética de Cuatrociénegas nos brindará la oportunidad de comprender la coexistencia entre comunidades que promueven la biodiversidad en este hábitat y cómo surge la dinámica, que a su vez producen un adecuado funcionamiento del ecosistema.

#### **2.4.1. Comunidades Microbianas del Sedimento de la Laguna Churince.**

Uno de los cuerpos de agua de Cuatrociénegas recientemente estudiados es la laguna Churince, un sistema que alberga diversos consorcios microbianos de diferente composición de estructura comunitaria y con alto nivel de endemismo (De Anda *et al.*, 2018). Considerando la importancia que tienen las interacciones por competencia o antagonismo que son capaces de llevar a cabo algunas especies del género *Bacillus*, en esta laguna se han estudiado los genomas de 2,500 especies del género, aumentando casi en un 21% el número de especies previamente conocidas en

el grupo. Además, estudios han atribuido relevancia ecológica y evolutiva a la laguna Churince, y demostrado que especies bacterianas en este nicho han evolucionado para formar una comunidad bien estructurada que compite por espacio y alimento (Souza *et al.*, 2018; García-Ulloa *et al.*, 2019). La mayoría de estas nuevas especies encontradas solo se encuentran específicamente en la laguna Churince. Aunado a las características fisicoquímicas de la laguna, esta biodiversidad es una razón por la cual es un ecosistema de interés científico en el estudio de las interacciones microbianas.

Muchas especies encontradas en el sedimento de la laguna Churince han sido recientemente aisladas, secuenciadas y estudiadas mediante redes de interacción, en donde investigadores atribuyen mayor producción de interacciones antagonistas en confrontaciones entre cepas aisladas del mismo sitio, lo cual podría deberse al sobrelape ecológico (Kinkel *et al.*, 2014). Estas redes de interacción han demostrado que el ensamblaje de las comunidades bacterianas del género *Bacillus* de este sistema está fuertemente influenciado por interacciones antagonistas, que a su vez influyen en parte la estructura de estas comunidades (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2013; Zapién-Campos *et al.*, 2015).

De acuerdo a esto, es posible sugerir que las interacciones antagonistas de *Bacillus* que median el ensamblaje de las comunidades bacterianas en el sedimento de la laguna Churince, podrían ser producto de la expresión de BGCs de metabolitos secundarios tóxicos, y que les atribuyen la capacidad de competir.

#### **2.4.2. Comunidad Sintética BARS.**

El género *Bacillus* es uno de los más adaptables a diversas condiciones ambientales, incluso hasta las más extremas. Este género ha sido clave en el desarrollo de aplicaciones médicas, ambientales e industriales, gracias a la biosíntesis de antibióticos, moléculas bioactivas, bioplaguicidas, biocombustibles y biopolímeros (Sing *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2013; Kalia, 2015). Asimismo, la elucidación de que las interacciones por competencia son una de las vías por las cuales las comunidades bacterianas se ensamblan en el ecosistema. Partiendo de este conocimiento, Aguilar-Salinas (2018) desarrolló la comunidad sintética BARS con miembros de *Bacillus* spp. (*Bacillus*,

Antagonist, Resistant, Sensitive). Esto surge de la exploración de la dinámica de las interacciones, a través de ensayos de confrontación entre cepas de *Bacillus* spp. con diferentes roles en una red de interacción: *Bacillus cereus* CH111b\_4T (Bc111) la cual es primordial para la supervivencia de la cepa sensible (antes clasificada dentro del género *Bacillus*) *Sutcliffiella horikoshii* CH20a\_1T (Sh20a) en presencia de la cepa antagonista *Bacillus pumilus* CH145\_4T (Bp145) (Figura 4). Dichas cepas fueron aisladas de comunidades de sedimentos del sistema Churince, en donde bajo contextos bien simulados, descubren el papel de la cepa R (Bc111) como la que interfiere en el antagonismo de A (Bp145) contra S (Sh20a), determinando la supervivencia de ésta.

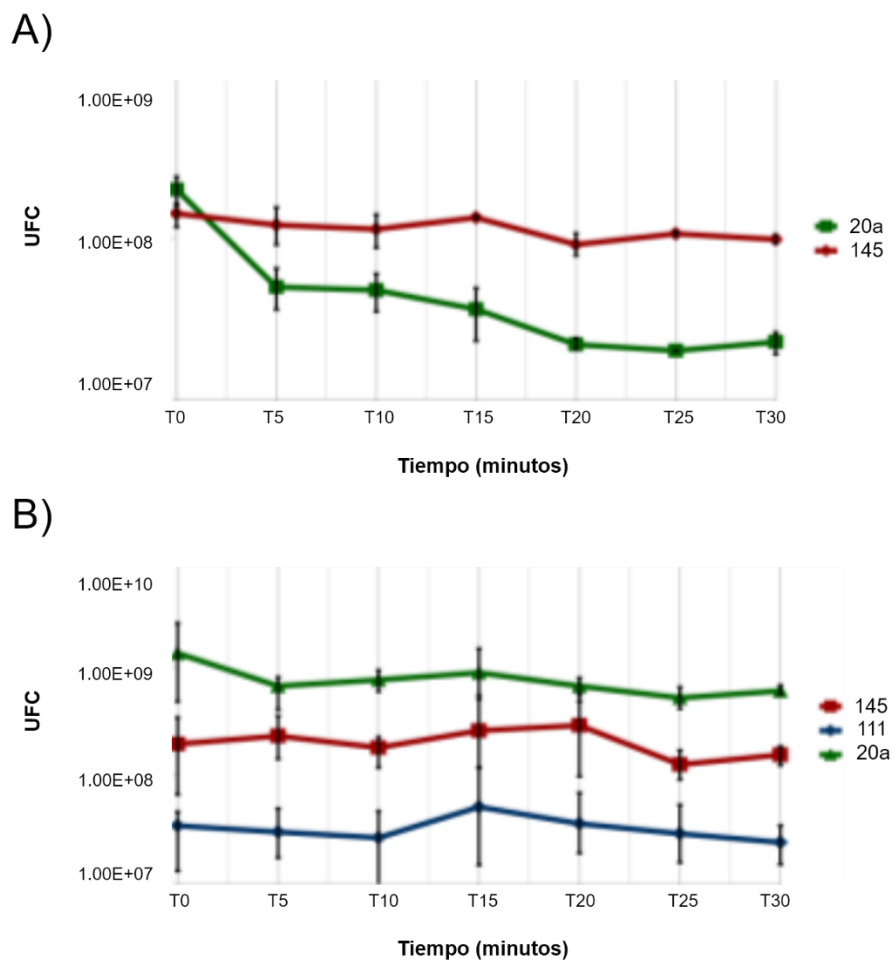


Figura 4. Interacciones entre las cepas de la comunidad BARS. A) Interacción entre las cepas Bp145 y Sh20a. B) Interacción triple. (Aguilar-Salinas, 2018).

El descubrimiento de estas funciones emergentes en la comunidad sintética BARS es clave adicional en el estudio de las interacciones microbianas que influyen en diversos procesos en la laguna Churince de Cuatrociénegas. Todavía existen preguntas sobre cómo se desencadenan las interacciones antagonistas dentro de esta comunidad sintética, una cuestión que ayudaría a entender el proceso por el cual las comunidades microbianas se ensamblan en un ecosistema con características como las de la laguna Churince. Es necesario continuar la investigación y caracterización de estas propiedades mediante el estudio de los factores genéticos y moleculares que median el antagonismo, muerte celular, resistencia, y expresión de BGCs relevantes.

El estudio y manipulación de comunidades sintéticas como BARS es determinante para comprender cómo emergen estas funciones en los ecosistemas. Por lo tanto, este trabajo se centra en continuar la investigación sobre las interacciones antagonistas de la comunidad sintética BARS por medio de estrategias de genómica comparativa y funcional.

### 3. HIPÓTESIS

En la comunidad sintética BARS, la cepa *Bacillus pumilus* 145 contiene *clusters* de genes para la síntesis de metabolitos secundarios que participan en el mecanismo de antagonismo contra la cepa *Sutcliffiella horikoshii* 20a.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General.

Identificar *clusters* de genes para la síntesis de metabolitos secundarios, responsables del mecanismo de antagonismo entre *Bacillus pumilus* y *Sutcliffiella horikoshii* de la comunidad sintética BARS, aisladas de Cuatrociénegas, Coahuila.

### 4.2. Objetivos Específicos.

- Predecir por bioinformática los *clusters* de genes de síntesis de metabolitos secundarios presentes en los genomas de *Bacillus pumilus*, *Sutcliffiella horikoshii* y *Bacillus cereus* aisladas de sedimento de la laguna Churince de Cuatrociénegas, Coahuila.
- Evaluar el antagonismo de cepas de *Bacillus pumilus* de sedimento de la laguna Churince, para determinar cuáles, además de Bp145, presentan la actividad antagonista contra la cepa sensible Sh20a (equivalencia ecológica).
- Caracterizar por medio de bioinformática el *cluster* de genes candidato seleccionado para predecir el metabolito secundario posiblemente asociado al efecto antagonista.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Generalidades.

#### 5.1.1. Cepas.

Las cepas que se utilizaron en este estudio provienen de una colección de *Bacillus* spp. aislada de sedimento de la laguna Churince de Cuatrociénegas, Coahuila. Los genomas de las cepas fueron previamente secuenciados (Rodríguez-Torres, 2017), a partir de los cuales se identificaron cepas que son filogenéticamente cercanas a las cepas de la comunidad BARS (Bp145, Sh20a y Bc111). También se utilizó la cepa de *B. subtilis* PY79 como control, la cual no fue aislada de la laguna Churince (Cuadro 2, 3 y 4).

Cuadro 2. Cepas cercanas a la cepa antagonista.

Cepa	Número de acceso (GenBank)	Especie
Bp145	CP027116.1	<i>B. pumilus</i>
Bp144	VTEO00000000.1	<i>B. pumilus</i>
Bp150	CP027034.1	<i>B. pumilus</i>
Ba156	CP022319	<i>B. altitudinis</i>
Bp112	VTEO00000000.1	<i>B. pumilus</i>
Bp95	VTEP00000000.1	<i>B. pumilus</i>
PY79	GCA_000009045.1	<i>B. subtilis</i>

Cuadro 3. Cepas cercanas a la cepa sensible.

Cepa	Número de acceso (GenBank)	Especie
Sh20a	CP020880.1	<i>S. horikoshii</i>
Sh28	VTEV00000000.1	<i>S. horikoshii</i>
Sh88	VTEU00000000.1	<i>S. horikoshii</i>
Sh98	VTET00000000.1	<i>S. horikoshii</i>

Cuadro 4. Cepas cercanas a la cepa resistente.

<b>Cepa</b>	<b>Número de acceso (GenBank)</b>	<b>Especie</b>
Bc111	WBOZ00000000.1	<i>B. cereus</i>
Bc111b	MK850167.1	<i>B. cereus</i>
Bc124	WBPC00000000.1	<i>B. cereus</i>
Bc372	WBPK00000000.1	<i>B. cereus</i>
Bc438	WBPO00000000.1	<i>B. cereus</i>
Bc102	MK880370	<i>B. cereus</i>
Bc311	WBPH00000000.1	<i>B. cereus</i>
Bc370a	MK850162.1	<i>B. cereus</i>
Bc436	WBPM00000000.1	<i>B. cereus</i>
Bc370b	WBPJ00000000.1	<i>B. cereus</i>
Bc95	WBPA00000000.1	<i>B. cereus</i>
Bc139	WBPE00000000.1	<i>B. cereus</i>
Bc316	WBPI00000000.1	<i>B. cereus</i>
Bc155	WBPB00000000.1	<i>B. cereus</i>
Bc126	WBPD00000000.1	<i>B. sp</i>
Bc140	WBPF00000000.1	<i>B. sp</i>
Bc101	WBPB00000000.1	<i>B. cereus</i>
Bc417	WBPP00000000.1	<i>B. cereus</i>
Bc460	WBPN00000000.1	<i>B. cereus</i>

### 5.1.2. Medios de Cultivo.

El medio de cultivo utilizado en este trabajo fue el Medio Marino (MM) utilizado por Aguilar-Salinas (2018), el cual es una mezcla de varias sales que simula el ambiente acuático del que provienen las cepas seleccionadas. Inicialmente se prepararon soluciones para cada uno de los reactivos, de los cuales para preparar 500 ml se agregaron las siguientes cantidades en gramos: 16 de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 6.4 de CaCl<sub>2</sub>, 3.2 de KCl, 1.6 de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1.66 de citrato férrico y 80 de NaCl. Se preparó también una solución de MgSO<sub>4</sub> agregando 49.25g en 100 ml de agua destilada. Además, se preparó una solución *stock* de sales, en 500 ml de agua destilada se disolvieron 8 g de KBr, 2.2 g de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2.4 g de NaF, 1.6 g de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> y 8 g de Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Las soluciones y el *stock* de sales se almacenaron a 26°C y se utilizaron posteriormente para preparar el MM (Cuadro 5). Al final se agregaron 1 y 5 g/l de extracto de levadura y peptona de caseína respectivamente al MM. Para preparar medios sólidos se agregó 1.5% de agar para MM en placa Petri. Al finalizar la preparación del medio, se esterilizó en autoclave. En los casos requeridos, se agregó rifampicina a una concentración final de 50 µg/ml al MM con agar una vez estéril.



Cuadro 5. Preparación del medio marino a partir de soluciones de sales. El volumen necesario detallado es para preparar 1 litro de medio: se utilizan 800 ml de agua destilada. Al final se agregan el extracto de levadura, peptona y, agar (de ser necesario).

Solución	Volumen (ml)
Sulfato de sodio (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	30
Cloruro de calcio ( CaCl <sub>2</sub> )	30
Cloruro de potasio (KCl)	30
Carbonato de sodio (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	30
Citrato férrico	30
Cloruro de sodio (NaCl)	30
Sulfato de magnesio (MgSO <sub>4</sub> )	20
<i>Stock</i> de sales	5

### 5.1.3. Condiciones de Crecimiento.

Las cepas en estudio se activaron a partir de *stocks* almacenados a -80°C en glicerol y se sembraron en MM con agar en placa Petri y se incubaron durante dos días a una temperatura entre 26°C y 30°C.

Una vez crecidas las cepas, se procedió a realizar las confrontaciones entre ellas en medio marino líquido (MML). Para esto, primero se puso a crecer un cultivo de 5 ml de MML durante 14 h a 30°C y 200 rpm. Posteriormente, se agregó un preinóculo de 100 µl de cultivo en 30 ml de medio fresco y se incuban bajo las mismas condiciones hasta una densidad óptica (D.O.<sub>600</sub>) de 0.4 para las cepas antagonistas y resistente, y 0.9 para la cepa sensible.

### 5.2. Predicción de *Clusters* de Genes para la Síntesis de Metabolitos Secundarios.

Para predecir los grupos de genes de síntesis de metabolitos secundarios presentes en los genomas de todas las cepas, se utilizó la herramienta en línea Bacterial antiSMASH (Medema *et al.*, 2011). Este servidor permite la rápida identificación, anotación y análisis de BGCs de metabolitos secundarios en un genoma, el cual se integra y enlaza con una gran cantidad de herramientas de análisis de metabolitos secundarios *in silico* que se han publicado anteriormente. AntiSMASH

funciona con varias herramientas de código abierto como HMMer 3, NCBI, etc., a través de las cuales se pueden construir librerías de modelos específicos para NRP (péptidos no ribosomales), PKs (policétidos sintetas), terpenos, antibióticos, bacteriocinas, genes característicos de la biosíntesis de fosfoglicolípidos, melanina, aminoglucósidos, y lantipéptidos, por mencionar algunos (Medema *et al.*, 2011). Inicialmente, se proporcionaron al servidor los números de acceso de GenBank de las cepas de interés (Cuadros 2, 3 y 4), se obtuvieron los grupos de genes y los metabolitos que se podrían estar sintetizando, así como un valor de identidad con un grupo de referencia. Utilizando estos datos, se construyó un diagrama de presencia/ausencia de grupos de metabolitos secundarios, incluyendo su valor de identidad, para cada cepa estudiada.

De forma simultánea, para el caso de los genomas de las cepas cercanas a la antagonista se realizó un alineamiento múltiple de BGC en aquellos casos donde el análisis por AntiSMASH no proporcionó un valor de identidad referencia para corroborar si los BGC de tales metabolitos eran homólogos o no, y así poder clasificarlos e identificarlos de manera cualitativa. Esto se realizó analizando los genomas a través de la herramienta basada en Python de nombre Clinker, la cual extrae de forma automática las traducciones de proteínas y realiza alineaciones globales entre las secuencias de cada BGC (Gilchrist y Chooi 2021).

De esta manera, se conoció el potencial de síntesis de metabolitos secundarios que podrían mediar el antagonismo en la comunidad BARS.

### 5.3. Equivalencia Ecológica.

En la comunidad sintética BARS, la cepa Sh20a es antagonizada por la Bp145 (Aguilar-Salinas 2018), sin embargo, esta interacción antagonista no surge cuando Bc111 está presente, evitando la muerte celular de la cepa Sh20a. Se esperaba que dentro de la colección de *Bacillus* de sedimento de la laguna Churince, existieran otras cepas de la especie *B. pumilus* con equivalencia ecológica, esto es, que lleven a cabo el antagonismo contra Sh20a. Por lo tanto, se buscó la equivalencia ecológica entre las cepas filogenéticamente cercanas a Bp145: Bp144, Bp150, Ba156, Bp95 y Bp112. Con base en los BGC de antimicrobianos que comparte la cepa Bp145 con las cepas seleccionadas, la hipótesis fue que alguna de ellas pudiera llevar a cabo el mismo rol que la

antagonista dentro de la comunidad BARS, y con ello determinar los BGC que influyen en el antagonismo.

### **5.3.1. Obtención y Selección de Mutantes Espontáneas Resistentes a Rifampicina.**

Luego de realizar confrontaciones dobles en co-cultivo (antagonista *vs* sensible), las UFC resultantes se miden por diluciones y vaciado en placa Petri. Sin embargo, al sembrar los co-cultivos en MM (medio marino) agar, es posible que el conteo de UFC de la cepa sensible sea subvalorado ya que probablemente la cepa sensible siga siendo inhibida ya sea por el antagonismo o por el espacio en el agar. Para solucionar esta limitación en el modelo de estudio, se obtuvieron variantes de la cepa Sh20a con mutaciones espontáneas de resistencia a rifampicina (Nicholson y Maughan, 2002). Se preparó un preinóculo de 5 ml crecida *overnight* de la cepa sensible, posteriormente se inocularon 300  $\mu$ l de cultivo en 50 ml de MML fresco. Luego de alcanzar una D.O.<sub>600</sub> de 0.9, se centrifugó la biomasa a 10,000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente, para llevar a las células hasta una concentración de 100x y luego se plaqueó el volumen total de células concentradas en MM agar con 50  $\mu$ g/ml de rifampicina, dejando incubar a 30°C por 3 días. De las colonias mutantes espontáneas, se seleccionaron tres de ellas y se contrastaron con la cepa silvestre mediante pruebas de morfología celular y colonial por microscopía para demostrar que fueran derivadas de Sh20a.

Para corroborar que las mutantes espontáneas resistentes a rifampicina de la cepa Sh20a no perdieran sus características y propiedades de sensibilidad, se hicieron pruebas de crecimiento y ensayos de inhibición sobre las mutantes obtenidas. Para las pruebas de crecimiento en presencia de rifampicina, se realizaron monocultivos de la cepa original y 3 mutantes en MML. Las cepas a analizar se cultivaron en MML y se llevaron hasta la fase estacionaria, posteriormente se hicieron diluciones 1:10 de cada cultivo y se sembraron 10  $\mu$ l de todas las diluciones en MM agar con y sin rifampicina. Se comparó el crecimiento de cada cepa en ambos medios. Para confirmar que las cepas Sh20a mutantes espontáneas presentan sensibilidad ante la cepa antagonista Bp145, se realizaron ensayos de antagonismo en agar. Para esto se inocularon 20  $\mu$ l de cultivo de cada mutante en 25 ml de MM con agar antes gelificar, se vació la mezcla en caja Petri y se dejó secar durante 1 h. En la superficie del agar se sembraron triplicados de 5  $\mu$ l sobre el medio gelificado de

un cultivo de la cepa antagonista Bp145 mediante la técnica de gota y se dejó en incubación 24 h a 30°C. Posterior a las 24 h de crecimiento se procedió a medir el área de la colonia y el halo de inhibición producido. Se consideraron cepas de Sh20aRif<sup>r</sup> aquellas que conservan todos los fenotipos de interés esperados.

### **5.3.2. Ensayos de Confrontación Doble.**

A fin de descubrir cuáles de las cepas filogenéticamente cercanas a la antagonista Bp145 son capaces de llevar a cabo el mismo rol en el sistema (equivalencia ecológica), se hicieron confrontaciones de acuerdo a la metodología descrita por Aguilar-Salinas (2018) en co-cultivo en MML con la cepa mutante seleccionada (Sh20aRif<sup>r</sup>). Para ello se dejaron crecer las cepas de acuerdo a las condiciones de crecimiento descritas y se llevaron hasta una densidad óptica (D.O.<sub>600</sub>) de 0.5 para Bp145 y las cepas filogenéticamente cercanas, y 0.9 para Sh20aRif para tener una densidad poblacional de aproximadamente  $8 \times 10^8$  y  $1.5 \times 10^9$  UFC/ml, respectivamente. Una vez alcanzada esta D.O.<sub>600</sub> se tomó una muestra de la cepa Sh20aRif para tomarla como tiempo cero de la interacción, preparando diluciones 1:10 y se sembraron en MM agar. Para el caso de las confrontaciones en interacciones por pares, el volumen de la cepa Sh20aRif y Bp145/cepas seleccionadas fue de 5 y 1 ml respectivamente, aforando hasta 10 ml con MML fresco en tubos plásticos cónicos de 50 ml. Luego de 30 minutos en interacción a una temperatura de 26°C sin agitación, se tomó muestra en cada caso para hacer diluciones 1:10 y sembrarlas en MM agar con rifampicina. Este procedimiento se realizó por triplicado. Se compararon las UFC/ml de la cepa sensible en tiempo 0 (antes de realizar la mezcla) con el tiempo 30 en la interacción, para conocer el porcentaje de sobrevivencia, y con ello se logró comparar la actividad antagonista de Bp145 y todas las cepas filogenéticamente cercanas.

Adicionalmente, se realizó un experimento para probar si el metabolito responsable de efectuar el antagonismo se acumula después de la fase exponencial. Para esto, se incubó la cepa sensible Sh20a hasta la D.O.<sub>600</sub> indicada anteriormente. En el caso de la cepa antagonista Bp145 y las cepas filogenéticamente cercanas, se incubaron durante 24 h hasta la fase estacionaria. Las confrontaciones se llevaron a cabo bajo la técnica descrita en este apartado.

### 5.3.3. Ensayos de Confrontación Triple.

Para sustentar las observaciones en experimentos de confrontación doble, en los cuales se determinó cuáles cepas presentan equivalencia ecológica, se realizaron confrontaciones triples (Antagonista, Sensible y Resistente) buscando que el efecto de antagonismo de las cepas equivalentes se atenuara con la presencia de la cepa resistente. La metodología para llevar a cabo las interacciones en un co-cultivo de tres cepas es descrita por Aguilar-Salinas (2018), siguiendo las mismas condiciones de crecimiento. En el caso de la cepa resistente, se llevó hasta una O.D.<sub>600</sub> de 0.7 para tener una densidad poblacional de  $2 \times 10^8$  UFC/ml. Se mezclaron 1 ml de Bc111, 1 ml de Bp145 (o de la cepa equivalente) y 5 ml de Sh20a<sup>r</sup>Rif, aforando hasta 10 ml con MML fresco. Las mediciones de UFC/ml en MML con rifampicina de la cepa sensible se realizaron antes de la interacción, y 30 min después de la interacción a 26°C.

Una vez identificadas la cepa ecológicamente equivalente a Bp145 se correlacionó con la información generada en el primer objetivo para seleccionar un BGC candidato como posible mediador del antagonismo. El criterio para esta selección fue que el BGC estuviera presente solamente en la cepa antagonista y las equivalentes.

### 5.4. Ensayos de Inhibición en Agar.

Las condiciones establecidas para las interacciones de la comunidad BARS, ya sean dobles o triples, son a 26°C en MML, las cuales simulan el microambiente del que provienen, es decir, la laguna Churince de Cuatrociénegas, en México. Sin embargo, para poder caracterizar a fondo el mecanismo de antagonismo de Bp145 sobre Sh20a era indispensable definir el efecto en otras condiciones diferentes al MML; específicamente, se buscaba un modelo experimental que permitiera una cuantificación del antagonismo más rápido y eficiente, para poder probar más condiciones en ensayos tipo *screening*. Para esto, se decidió probar las interacciones en medio semisólido, con la técnica de *spot on lawn* (Cadirci y Citak, 2005), donde la cepa sensible se mezcla en el agar y la cepa antagonista se siembra como gota sobre el agar, buscando la aparición de un halo de inhibición. Para calcular la inhibición en las pruebas realizadas, se midió el diámetro de la

colonia crecida y del halo formado, después se calculó el área tanto de la colonia como del halo, mismos que se restaron para obtener el área de la zona de inhibición. Finalmente se obtuvo un cociente en cada caso dividiendo el área de la zona de inhibición entre el área de la colonia. Este cociente se tomó como la inhibición resultante.

#### **5.4.1. Búsqueda de Equivalencia Ecológica.**

Para evaluar la existencia de equivalencia ecológica entre Bp145 y las cepas cercanas en agar, se montó un ensayo de confrontación doble en MM con agar. Inicialmente se incubaron preinóculos de Sh20a, Bp145, Bp144, Bp150, Ba156, Bp112, Bp95, y la cepa control BsPY79 (Schroeder y Simmons, 2013). Posteriormente, bajo la técnica de *spot on lawn* se vertieron 5 ml de cultivo de la cepa sensible Sh20a sobre 100 ml de MM con agar antes de gelificar, se vaciaron en placa Petri y se dejaron secar durante una hora. Se tomaron 10  $\mu$ l de cada uno de los cultivos de las cepas seleccionadas y se inocularon a través de la técnica de gota en lugares específicos del agar, finalmente se incubaron a 30°C. Luego de la incubación durante al menos 24 h, se midió el diámetro de la colonia y el diámetro del halo en milímetros para calcular la inhibición (Cadirci y Citak, 2005).

#### **5.4.2. Prueba de Sinergismo y Cooperación.**

Los metabolitos secundarios capaces de producir el antagonismo sobre la cepa sensible podrían producir sinergismo si se les combina, efectuando una cooperación que puede deberse a la acción de dos metabolitos diferentes (Rigatto y Falci, 2016; Kali *et al.*, 2016). Para probar si la combinación de dos cepas diferentes es capaz de producir mayor inhibición en MM agar y determinar la existencia de metabolitos antimicrobianos diferentes se realizó un ensayo de inhibición. Las cepas seleccionadas y Bp145 se crecieron *overnight* a 30°C en MML durante 14 h y se les combinó en una proporción de 50% (v/v) en microtubos de 1.5 ml. La mezcla se inoculó mediante la técnica de gota sobre el medio con la cepa sensible vertida previamente y se dejaron incubar a 30°C durante 24 h. Se calculó la inhibición del halo producido por cada par de cepas y

se comparó con el resultado de la suma de la inhibición producida por ambas cepas de manera individual, generando un cociente (halo experimental/halo esperado) para corroborar si existe sinergia entre las cepas para efectuar la inhibición de Sh20a.

### **5.4.3. Determinación de la Utilización de Fuentes de Hierro.**

Los antibióticos tienen diversos mecanismos para ocasionar la muerte celular de una especie bacteriana. Una de ellas es la producción de sideróforos, los cuales tienen la capacidad de quelar cationes de hierro presentes en el medio. Para probar la participación de metabolitos secundarios de este tipo, se montó un ensayo de inhibición de las cepas filogenéticamente cercanas a Bp145 sobre la cepa sensible, en MM agar a diferentes concentraciones de citrato férrico (Van Bergeijk *et al.*, 2022). Éste compuesto es la única fuente de hierro con una concentración de 400  $\mu\text{M}$  en condiciones normales. Para éste trabajo se vertió un cultivo de la cepa sensible sobre diferentes medios para los cuales se utilizó una concentración de cero, 100 veces menor (4  $\mu\text{M}$ ) y el doble (800  $\mu\text{M}$ ) de la concentración normal de citrato férrico. Se usaron 10  $\mu\text{l}$  de cada una de las cepas seleccionadas con la técnica de gota sobre el agar y se incubaron a 30°C. Después de 48 h se midió el diámetro de la colonia y del halo para calcular la zona de inhibición.

### **5.5. Predicción Computacional del Metabolito Involucrado en la Interacción Antagonista.**

Las interacciones antagonistas son comúnmente mediadas por metabolitos secundarios tóxicos, producto de la expresión de BGCs. Por lo tanto, para entender la dinámica de ensamblaje de la comunidad sintética BARS, es fundamental descubrir el BGC responsable del mecanismo de antagonismo de Bp145 *vs.* Sh20a. Basado en los resultados de los objetivos 1 y 2, se seleccionó el *cluster* identificado por ANTISMASH como zwitermicina (*Bp-ZmA-Like*) con un 18% de identidad, dado que éste solo se encuentra presente en las cepas equivalentes. En esta parte del trabajo se hicieron predicciones sobre la actividad biológica, biosíntesis y estructura molecular del metabolito seleccionado para correlacionarlo a metabolitos con actividad antibiótica.

### 5.5.1. Estimación de la Actividad Biológica.

Los análisis por bioinformática a partir del genoma microbiano son capaces de revelar con mucha precisión instrucciones genéticas y *clusters* de genes biosintéticos, y por ende determinar qué metabolitos secundarios codifican estos BGC. Con base en esto, se utilizó un método bioinformático que emplea clasificadores de aprendizaje automático que predicen la actividad antibacteriana o antifúngica en función de la secuencia del BGC con una precisión de hasta el 80% (Walker y Clardy, 2021).

Se analizaron las características de los *clusters* de genes similares a antibióticos según la predicción de AntiSMASH: liquenisina, fengicina, bacilisina, bacilibactina y zwitermicina. Esto se realizó a través de la versión de *script* de línea de comandos para la cual se necesita el archivo *output* de AntiSMASH para cada BGC y el identificador de genes de resistencia (RGI) del genoma completo, en este caso de la cepa Bp145. El programa arroja para cada *cluster*, un valor de probabilidad para tener actividad antimicrobiana (anti Gram positiva o negativa), antifúngica, antitumoral o citotóxica. Finalmente, los resultados se analizan de manera gráfica mediante PRISM 9.0.

### 5.5.2. Predicción de la Estructura Molecular.

En este punto, se utilizó la plataforma integral PRISM 4 que predice las estructuras químicas de los antibióticos codificados genómicamente e incluye todas las clases de antibióticos bacterianos conocidos. Esta plataforma traza la biosíntesis de metabolitos secundarios en una colección de más de 10,000 genomas bacterianos de cultivos aislados (Skinnider *et al.*, 2020).

Para predecir la estructura molecular del metabolito sintetizado por el BGC candidato, se utilizó como *input* la secuencia genómica del *cluster* de 44,901 pares de bases. Al finalizar el análisis, el *output* es una serie de gráficos en donde se plasman cada uno de los genes de biosíntesis de antibióticos, la clasificación molecular del *cluster*, y las estructuras moleculares predichas en formato SMILE. Las cadenas SMILE fueron analizadas con STOUT, una herramienta de quimioinformática que adopta un enfoque de traducción automática neuronal de aprendizaje



profundo para asignar el nombre molecular de acuerdo a las reglas de nomenclatura establecidas por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) (Rajan *et al.*, 2021).

Finalmente, se identificaron los grupos funcionales del metabolito en su estructura molecular con ayuda de Checkmol, un programa que sigue una línea de comandos capaz de leer archivos de estructura molecular en diferentes formatos (Haider, 2010); en este caso, el *input* fueron las cadenas SMILE, detectando varios grupos funcionales y elementos estructurales.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Perfil de BGCs Codificados en los Genomas de las Cepas de Estudio.

En este trabajo, inicialmente se estudiaron las 3 cepas de la comunidad sintética BARS (Aguilar-Salinas, 2018): *B. pumilus* 145 (antagonista), que es capaz de antagonizar a la cepa *S. horikoshii* 20a (sensible), mientras que la cepa *B. cereus* III (resistente) tiene la capacidad de atenuar el efecto antagonista. Sin embargo, el interés principal es conocer los metabolitos producidos por la cepa antagonista Bp145, que pudieran estar asociados con la inhibición de la cepa sensible Sh20a. Con el fin de predecir un perfil de *clusters* de síntesis de metabolitos secundarios presentes tanto en la cepa antagonista Bp145 como en las filogenéticamente cercanas a ella (Cuadro 2), se utilizó la herramienta en línea AntiSMASH, la cual generó dos tipos de datos con los genomas de cada cepa. Primero, genera datos cuantitativos que identifican un *cluster* e indican un porcentaje de similitud con otro BGC de referencia derivados de plataformas como NCBI; segundo, arroja datos cualitativos basándose en el tipo de molécula que se está expresando, pero sin un *cluster* de referencia que pueda indicar exactamente qué metabolito se está sintetizando.

En el caso de los *clusters* con una referencia y valor de identidad, se observan BGCs muy conservados entre las cepas, entre ellos algunos que sintetizan antibióticos bien descritos y conocidos como fengicina (53%), liquenisina (entre 14 - 85%), bacilisina (85%) y bacilibactina (53%). Estos metabolitos han sido asociados a actividad de fungicidas, biosurfactantes, sideróforos, y antimicrobianos (Ongena *et al.*, 2005; Grangemard *et al.*, 2001; Dertz *et al.*, 2006; Parker y Walsh, 2013)., Además, se identificó un *cluster* con 18% de identidad al *cluster* que sintetiza zwitermicina (ZmA), el cual solo está presente en los genomas de Bp145, Bp144 y Bp150, pero no en las cepas Bp95, Bp112 y Ba156 (Figura 5 A). Este metabolito es un híbrido policétido-péptido no ribosomal producto del metabolismo de *Bacillus cereus*, que tiene diversas acciones biológicas como actividad antiprotista y antibacteriana (Emmert *et al.*, 2004; Luo *et al.*, 2011).

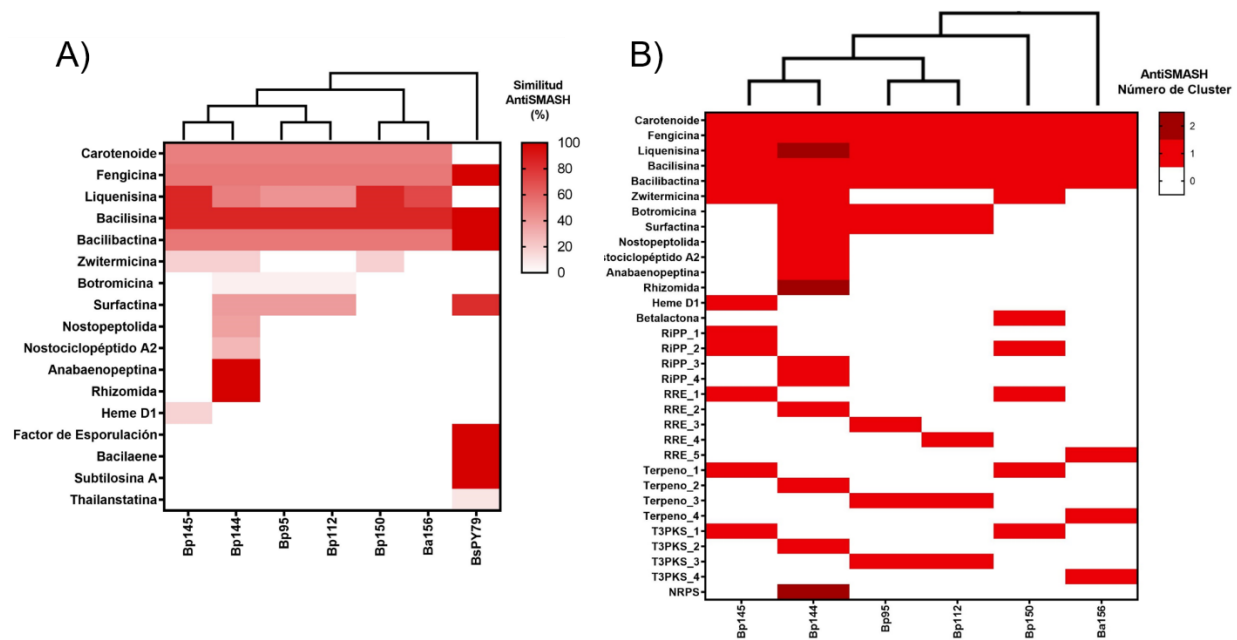


Figura 5. Análisis de BGCs presentes en las cepas cercanas a Bp145. A) *clusters* presentes en las cepas con una escala que indica el porcentaje de identidad. B. *subtilis* PY79 representa un control que no antagoniza a Sh20a y no proviene de la laguna Churince. B) Se muestran los *clusters* de manera cualitativa, aquellos que no tienen una referencia se plasman junto a los que sí, indicando únicamente el número de *clusters* encontrados.

En el caso de los *clusters* sin referencia, se realizó un segundo análisis bioinformático a través del programa Clinker, para determinar homología entre los BGCs y determinar cuántos tipos de un mismo metabolito se encuentran presentes entre las cepas. Se encontró que para el caso de los *clusters* que sintetizan moléculas tipo RiPPs (Péptidos Ribosomales Sintetizados Postraduccionalmente), T3PKS (Policétido Sintetas Tipo III) y terpenos, se obtuvieron cuatro tipos de metabolitos diferentes entre las cepas, presentando homología solo los que sintetizan las cepas Bp145 y Bp150, y las cepas Bp95 y Bp112 (Figura 6 A,B,C). Por otro lado, se encontraron cinco diferentes RRE (Elementos de Reconocimiento de RiPP) entre las cepas, con una notable homología únicamente en las cepas Bp145 y Bp150 (Figura 6 D). Para el caso de los NRPs (Péptidos No Ribosomales), solamente se encontraron 2 *clusters* que son sintetizados por la cepa Bp144 y son homólogos, lo cual podría deberse a una duplicación en el genoma de dicho *cluster* (Figura 6 E). Utilizando este análisis, se logró plasmar un mapa más completo mostrando los perfiles (a nivel cualitativo) de BGCs. Notablemente, la cepa antagonista comparte todos los BGCs de RiPPs, T3PKS y terpenos con la cepa Bp150 (Figura 5 B). Algunos RiPP y terpenos han

mostrado tener actividad antibiótica de forma nativa, mientras que otros productos naturales asociados a la actividad antimicrobiana provienen de rutas biosintéticas donde participan T3PKS que desempeñan funciones críticas en la biosíntesis de estos metabolitos secundarios (Graham y Mitchell, 2018; Gallucci *et al.*, 2009; Wawrik *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2012).

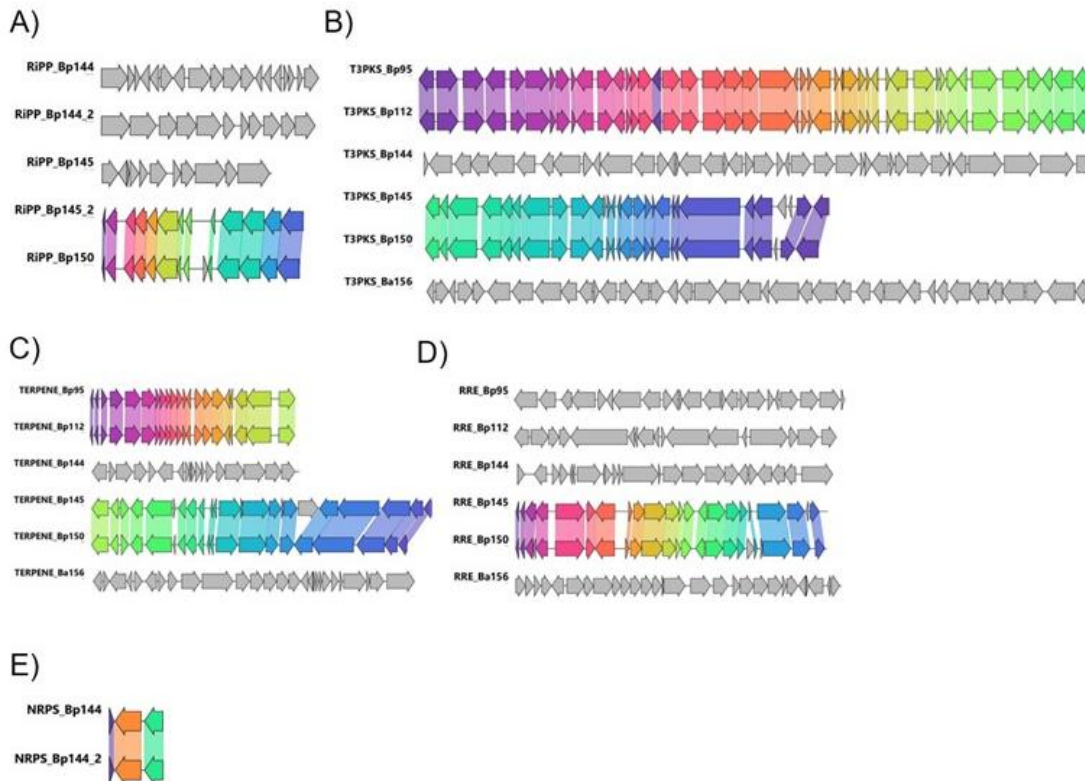


Figura 6. Alineamiento múltiple de *clusters* sin referencia. *Clusters* homólogos comparten un color específico para cada gen. A) Producto peptídico sintetizado ribosomalmente y modificado postraduccionalmente. B) Policétido sintasa tipo III. C) Aceites esenciales de tipo terpeno. D) Elementos de reconocimiento de RiPP. E) Péptidos no ribosomales. Los colores indican homología y el color gris indica no homología.

En la interacción triple, la cepa Bc111 es capaz de evitar el antagonismo, promoviendo el crecimiento de la cepa sensible Sh20a. Por esta razón, un tercer perfil de BGC se realizó tomando en cuenta los genomas de cepas filogenéticamente cercanas tanto a Bp145, Sh20a y Bc111 (Cuadro 2, 3 y 4). Esto con la finalidad de descartar aquellos *clusters* que las cepas estuvieran compartiendo entre sí. Se encontró que los BGC de síntesis de los antibióticos fengicina y bacilibactina son los únicos presentes tanto en Bp145 y Bc111 como en las cepas cercanas a estas (Figura 7). Es

interesante notar que los genomas de Sh20a, Sh88, Sh98 y Sh28 (cepa sensible y las filogenéticamente cercanas) no comparten ningún *cluster* de síntesis de antibióticos con la antagonista, además de que sus genomas sintetizan un número menor metabolitos comparadas con las cepas “resistentes” y “antagonistas”.

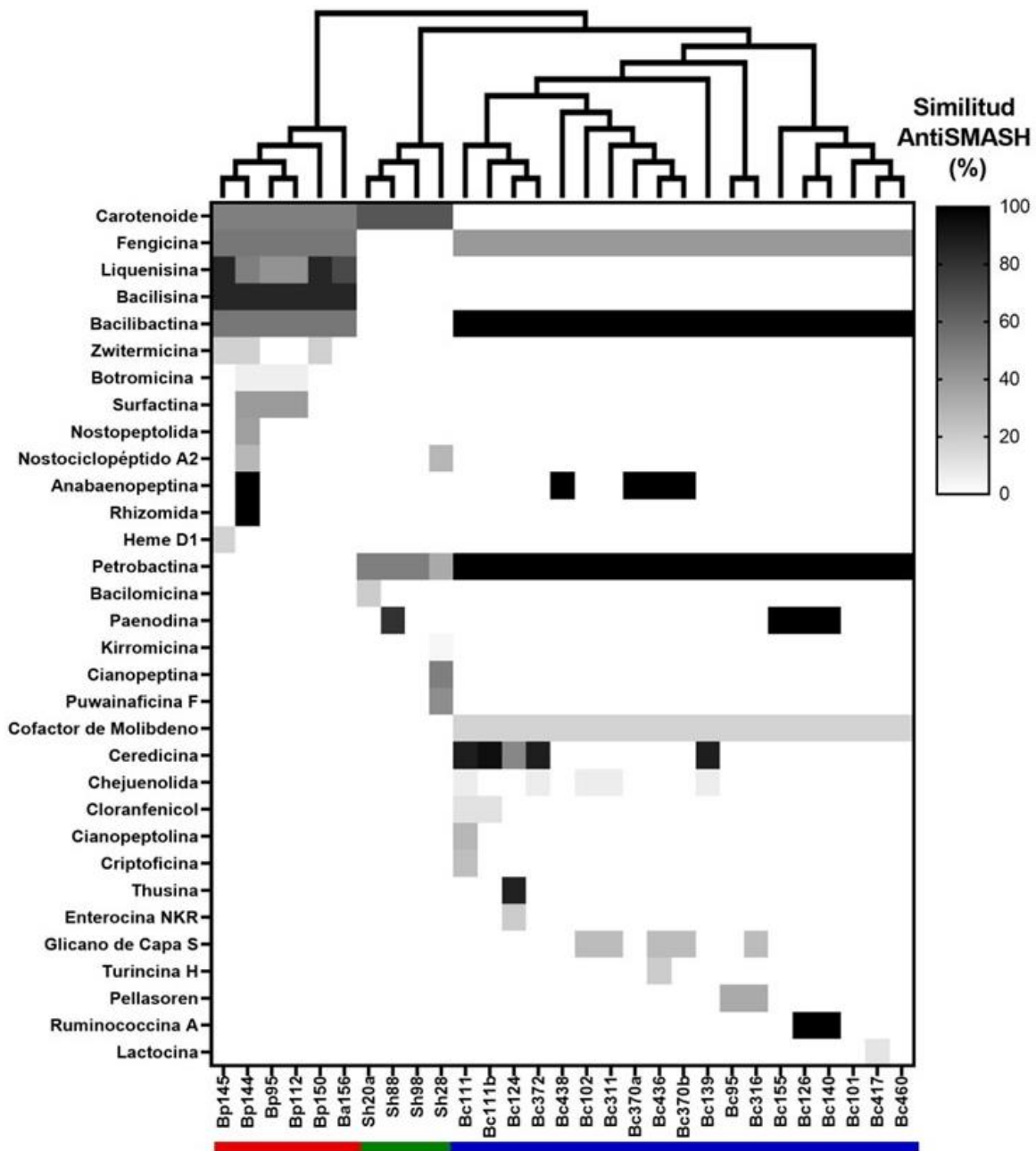


Figura 7. Análisis AntiSMASH de los *clústers* presentes en cepas cercanas a Bp145, Sh20a y Bc111. Los colores representan las cepas filogenéticamente cercanas a la antagonista (rojo), sensible (verde) y resistente (azul).

## 6.2. Interacciones en Medio Líquido.

### 6.2.1. Mutantes Resistentes a Rifampicina.

En la comunidad BARS, la interacción de antagonismo se realiza en un co-cultivo en medio líquido durante media hora. En este lapso se toman muestras para preparar diluciones y sembrar en placa para conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) de cada cepa. En este trabajo notamos que el antagonismo probablemente continúa en MM agar, y por lo tanto los conteos de la cepa sensible podrían estar subvalorados. Se optó por obtener una variante de la cepa Sh20a con mutaciones espontáneas de resistencia a rifampicina (Rif) con la finalidad de cuantificar las UFC/ml de la cepa sensible en agar MM+Rif, en donde la cepa antagonista no tendría crecimiento. A partir de 50 ml de cultivo con una concentración de  $2 \times 10^8$  UFC totales por ml, se obtuvieron 91 colonias resistentes a rifampicina. Esto corresponde a una frecuencia de mutación espontánea de  $2.28 \times 10^{-8}$  células Rif<sup>r</sup>/totales, lo cual coincide con el valor obtenido para otros *Bacillus* (Nicholson y Maughan, 2002). Se seleccionaron 3 colonias y se caracterizaron para confirmar que la cepa original no perdiera sus características relevantes para su función en la comunidad BARS: morfología colonial y celular, crecimiento, y sensibilidad a la cepa Bp145. Visualmente, las 3 variantes conservan la morfología colonial de la cepa silvestre, incluyendo la coloración amarilla, los bordes lisos y la textura brillante (Figura 8 A). A nivel microscópico, las células mantienen también la misma morfología (Figura 9).

De igual manera, se buscó que la mutante seleccionada creciera exactamente igual en MM con y sin Rif, por lo que se procedió a contar las UFC totales y UFC resistentes a Rif a partir de cultivos líquidos en MM (sin Rif) en fase estacionaria; se obtuvo que la colonia 1 presentó un número de UFC/ml similar en MM con y sin rifampicina (Figura 8 A). Finalmente, todas las mutantes analizadas mantuvieron la característica de sensibilidad de la cepa Sh20a frente a la Bp145 (Figura 8 B, C). Con esta información, se seleccionó la colonia 1 (Sh20aRif<sup>r</sup>) para los siguientes experimentos.

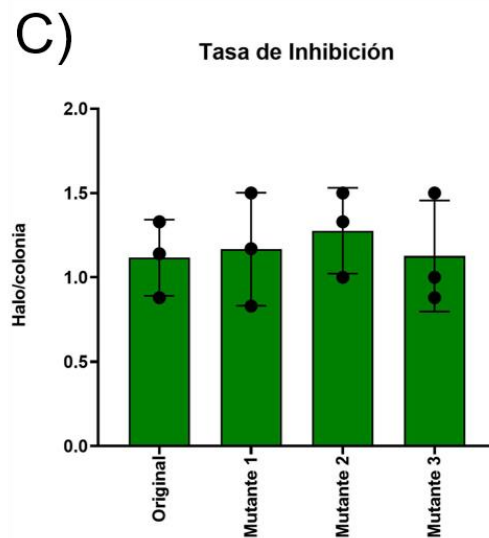
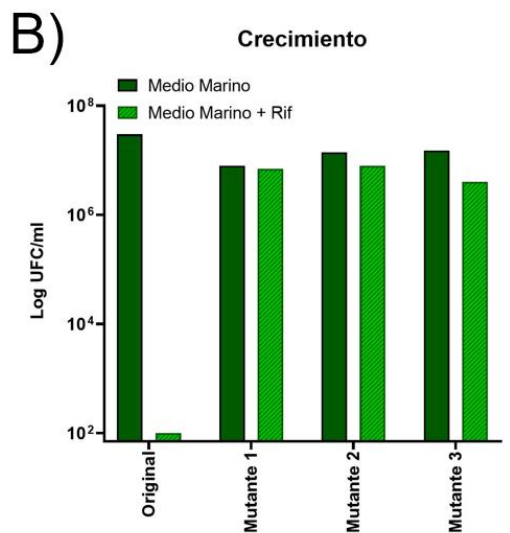
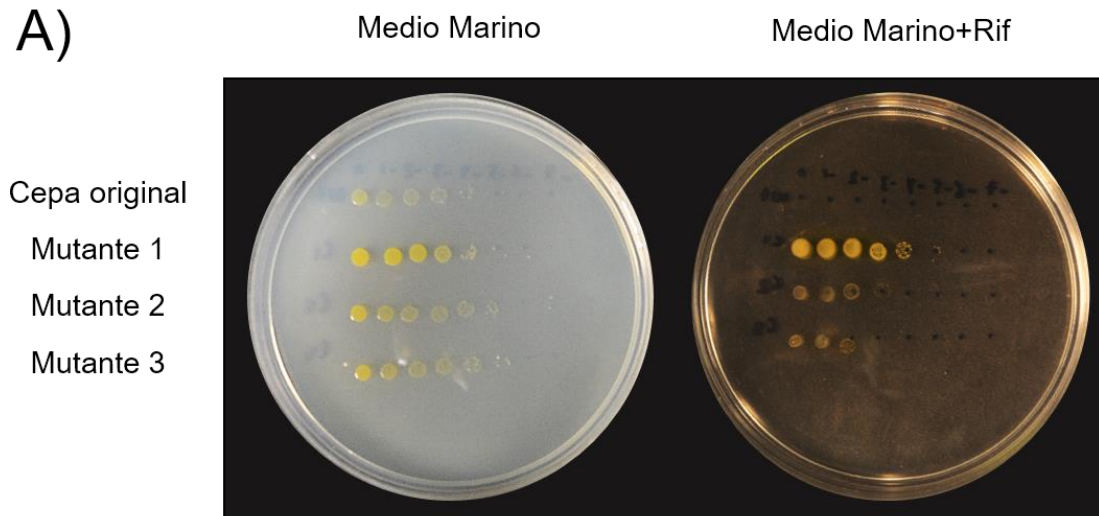
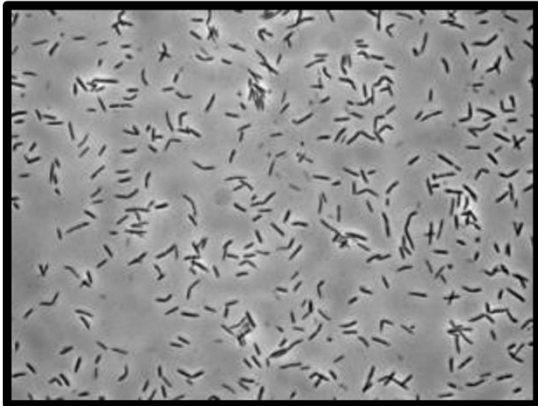


Figura 8. Caracterización de las mutantes espontáneas resistentes a rifampicina. A) Comparación visual del crecimiento de la cepa original y las mutantes obtenidas. B) Comparación de las UFC/ml en medio marino con y sin rifampicina. C) Tasas de inhibición de Sh20a original y mutantes en confrontación con Bp145, el valor del eje y resulta de la división del área la zona de inhibición entre el área de la colonia.

A)



B)



Figura 9. Comparación microscópica de *Sutcliffiella horikoshii* 20a. A) Cepa original. B) Colonia mutante resistente a rifampicina.

### 6.2.2. Equivalencia Ecológica entre las Cepas.

Para obtener uno o más *clusters* candidatos posiblemente asociados al antagonismo de Bp145 sobre la cepa Sh20a, propusimos determinar equivalencia ecológica de cepas de *B. pumilus* filogenéticamente cercanas a Bp145 (Cuadro 2), es decir, definir cuáles tienen la capacidad de antagonizar a Sh20a para correlacionar con el perfil de BGCs.

La interacción entre la cepa antagonista y sensible ocurre en co-cultivo en un lapso de 30 min. En estos experimentos, se hicieron mediciones de las UFC/ml de la cepa sensible Sh20a al tiempo 0 (antes de la interacción) y al tiempo 30 de la interacción con cada una de las cepas cercanas a Bp145 (posibles antagonistas). Con la comparación de ambos números se puede definir cuáles tienen un efecto antagonista. Se encontraron disminuciones en UFC/ml de Sh20aRif<sup>r</sup> solamente cuando se le confronta contra Bp145, Bp144 y Bp150 después de 30 minutos (Figura 10 A); es decir, el número de UFC/ml al tiempo 30 fue significativamente diferente del tiempo cero ( $p < 0.05$ ). En el caso de la interacción con Bp145, la Sh20aRif<sup>r</sup> disminuyó desde  $8 \times 10^8$  hasta  $3 \times 10^8$  UFC/ml, y  $1 \times 10^8$  UFC/ml en la interacción con Bp144, proporcional a una sobrevivencia del 40% y 20% respectivamente. Mientras que, cuando a Sh20a se le confronta con Bp150, las UFC/ml de la cepa sensible disminuyen desde  $5 \times 10^8$  hasta  $9 \times 10^7$  UFC/ml, representando una sobrevivencia equivalente al 27% (Figura 10 A). Finalmente, las cepas Ba156, Bp112, Bp95 y el control negativo,



no ocasionaron disminuciones significativas (Figura 10 A). Estos resultados indican que dentro de la comunidad BARS, las cepas Bp150 y Bp144 son capaces de antagonizar a Sh20aRif<sup>r</sup>, por lo cual las definimos como cepas ecológicamente equivalentes a Bp145.

Posteriormente, se evaluó si el metabolito responsable podría acumularse durante el crecimiento de la bacteria antagonista: en ese caso, se hipotetizó que un cultivo en fase estacionaria podría tener un efecto antagonista mayor. Para probar esto, se midió el antagonismo de todas las cepas, utilizando la misma estrategia experimental, pero con cultivos de las cepas antagonistas en fase estacionaria (24 h de crecimiento). Los datos muestran que las cepas equivalentes (Bp145, Bp144 y Bp150) en fase estacionaria presentan un nivel de antagonismo similar al observado en fase exponencial (Figura 10 A y B); el resto de las cepas (Ba156, Bp112, Bp95 y el control) fueron capaces de producir metabolitos antimicrobianos en esta fase, antagonizando a la cepa sensible Sh20aRif<sup>r</sup> (Figura 10 B).

Además de la cepa antagonista (Bp145) y sensible (Sh20a), la comunidad BARS incluye a la cepa resistente *Bacillus cereus* 111 que tiene la función de evitar el antagonismo. Para corroborar los resultados de equivalencia ecológica, se realizaron ensayos de confrontación triple con las cepas identificadas como equivalentes (Bp145, Bp144 y Bp150). El efecto de resistencia se observó claramente en la interacción con Bp145, pues la cepa sensible disminuye en la interacción doble de  $1 \times 10^9$  a  $1 \times 10^8$  UFC/ml, y se recuperó hasta  $5 \times 10^8$  UFC/ml en la interacción triple, con un porcentaje de sobrevivencia dos veces mayor (Figura 10 C). En el caso de la interacción con Bp150, también observó una recuperación de Sh20a al aumentar de un número de UFC/ml de  $1 \times 10^8$  en confrontación doble, a  $5 \times 10^8$  UFC/ml en presencia de Bc111, alcanzando un porcentaje de sobrevivencia cercano al 50%. Sin embargo, el efecto de resistencia sobre el antagonismo no se logró replicar en la interacción con la cepa Bp144, pues el número de UFC/ml de  $1 \times 10^8$  en confrontación doble se mantuvo sin cambios al agregar a la Bc111 (Figura 10 C).

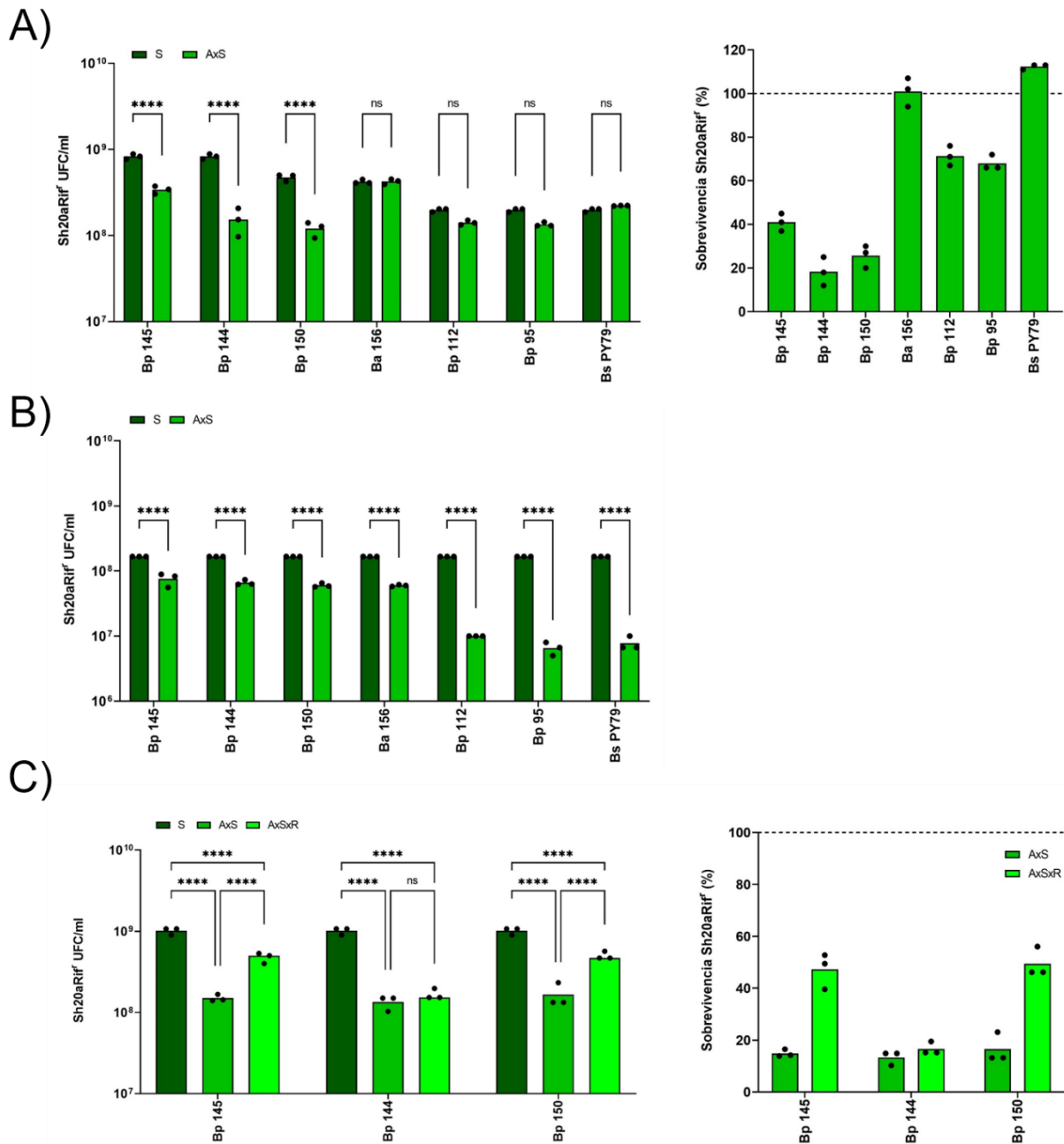


Figura 10. Confrontaciones en medio marino líquido. A) Comparación de UFC/ml de Sh20aRif<sup>r</sup> al tiempo 0 y al tiempo 30 de interacción (prueba de comparación múltiple por ANOVA de 2 vías y un  $\alpha$  de 0.05), se expresan estos resultados en porcentaje de sobrevivencia de Sh20aRif<sup>r</sup> en confrontación doble. B) Confrontación de las cepas seleccionadas en fase estacionaria contra Sh20aRif<sup>r</sup> en condiciones normales (fase exponencial). C) Comparación de UFC/ml de Sh20aRif<sup>r</sup> al tiempo 0 y al tiempo 30 de la confrontación doble (AxS) y triple (AxSxR) (prueba de comparación múltiple por ANOVA de 2 vías y un  $\alpha$  de 0.05). El resultado se expresa en porcentaje de sobrevivencia de Sh20aRif<sup>r</sup> en confrontación doble y triple.

Tomando en cuenta toda la información obtenida en los ensayos de equivalencia ecológica (Figura 10), y correlacionándolos con la información del perfil de *clusters* de síntesis de metabolitos secundarios (Figura 5), se sugirió que el *cluster* 18% similar a zwittermicina (ZmA) (Figura 11) es el único presente en las cepas ecológicamente equivalentes y no en las demás cepas. Este *cluster* mide 44.9 kb, contiene 17 genes (Cuadro 6), y aunque tiene una similitud a zwittermicina, esta similitud se basa en la presencia de un solo gen (03360), es decir, no parece estar asociado a ningún metabolito conocido. Por lo tanto, en este trabajo se decidió por nombrar a este *cluster* como *Bp-ZmA-Like*.

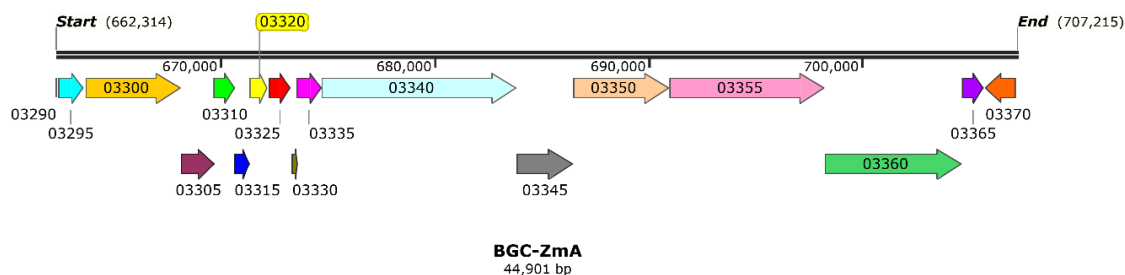


Figura 11. *Cluster* de genes *Bp-ZmA-Like*. Cada color indica un gen diferente.

Cuadro 6. Genes del *Bp-ZmA-Like*.

Clave	Anotación	Tamaño (pb)
03290	Proteína hipotética	13
03295	Transportador MFS	1233
03300	Sintasa de péptido no ribosomal	4467
03305	Serina hidrolasa	1542
03310	Proteína hipotética	1005
03315	Tioesterasa	711
03320	3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa	858
03325	Proteína hipotética	1056
03330	Proteína transportadora de acilo	270
03335	Acil-CoA deshidrogenasa	1143
03340	Sintasa de péptido no ribosomal	9090
03345	Sintasa de péptido no ribosomal	2670
03350	Policétido sintasa	4506
03355	Policétido sintasa	7251
03360	Policétido sintasa	6423
03365	Proteína hipotética	1008
03370	Fosfatasa alcalina	1407

### 6.3. Interacciones en Agar.

#### 6.3.1. Sinergismo y Equivalencia Ecológica.

Con el fin de caracterizar el antagonismo en condiciones diferentes al MML y de buscar si el mecanismo de antagonismo podría verse afectado por estas condiciones, se intentó replicar la equivalencia ecológica de todas las cepas filogenéticamente cercanas a la cepa antagonista (Cuadro 2) de la comunidad BARS (Bp145) en ensayos de halo de inhibición en medio semi-sólido (MM con agar). Para esto, se montaron las interacciones de tal manera que la cepa sensible (Sh20a) se mezcló en el agar y la cepa “antagonista” se inoculó como gota sobre el agar, buscando la aparición de un halo de inhibición. De acuerdo a la figura 12 A, la zona de inhibición de la cepa sensible es mayor en la interacción con las cepas no equivalentes a Bp145 (Ba156, Bp112 y Bp95) incluyendo a la cepa control (PY79), con un cociente de inhibición (área halo/área colonia) entre 0.5 y 2.2. Mientras que las cepas equivalentes a Bp145 (Bp144 y Bp150) producen una zona de inhibición notablemente menor a las demás, el antagonismo resulta en un cociente de inhibición entre 0 y 0.5, sobre todo en el caso de la cepa Bp150 que no antagoniza en agar (Figura 12 A). De hecho, no se encontró ninguna correlación entre el antagonismo en líquido y en agar (Figura 12 B). Aunque esto parece indicar que los mecanismos involucrados en el antagonismo en ambas condiciones son distintos, no se puede descartar que el mismo metabolito este participando en las cepas Bp145 y Bp150. Por lo tanto, se continuaron algunos ensayos adicionales para caracterizar el antagonismo en MM agar.

Bajo el fundamento de que algunos antibióticos incrementan el diámetro de la zona de inhibición al mezclarse con un antibiótico diferente (Kali *et al.*, 2016), a continuación, se planteó la hipótesis de que algunas cepas cercanas a Bp145 son capaces de producir antagonismo debido a la actividad de metabolitos secundarios diferentes. Con el objetivo de determinar esto se realizaron ensayos de inhibición utilizando combinaciones dobles de las cepas (Bp145, Bp144, Bp150, Ba156, Bp112, Bp95 y PY79) sobre Sh20aRif<sup>r</sup>, en donde se asumió que, si dos cepas antagonizan con metabolitos diferentes, el antagonismo debería incrementar al mezclarlas e inocularlas por gota sobre la cepa sensible en agar. El *heat map* de este ensayo muestra los valores de antagonismo normalizados que

van de 0 a 1 (Figura 12 C). En este caso, un valor de 1 se refiere a que el antagonismo de un par de cepas es igual al esperado, de acuerdo a la suma del antagonismo de ambas cepas sembradas individualmente. Un valor mayor a 1 se refiere a una sinergia, mientras que un valor menor a 1, se refiere a una disminución del antagonismo. Se encontró que ninguna combinación produce un efecto mayor a 1, por lo tanto, el antagonismo no incrementa y por ende se puede descartar un sinergismo entre las cepas.

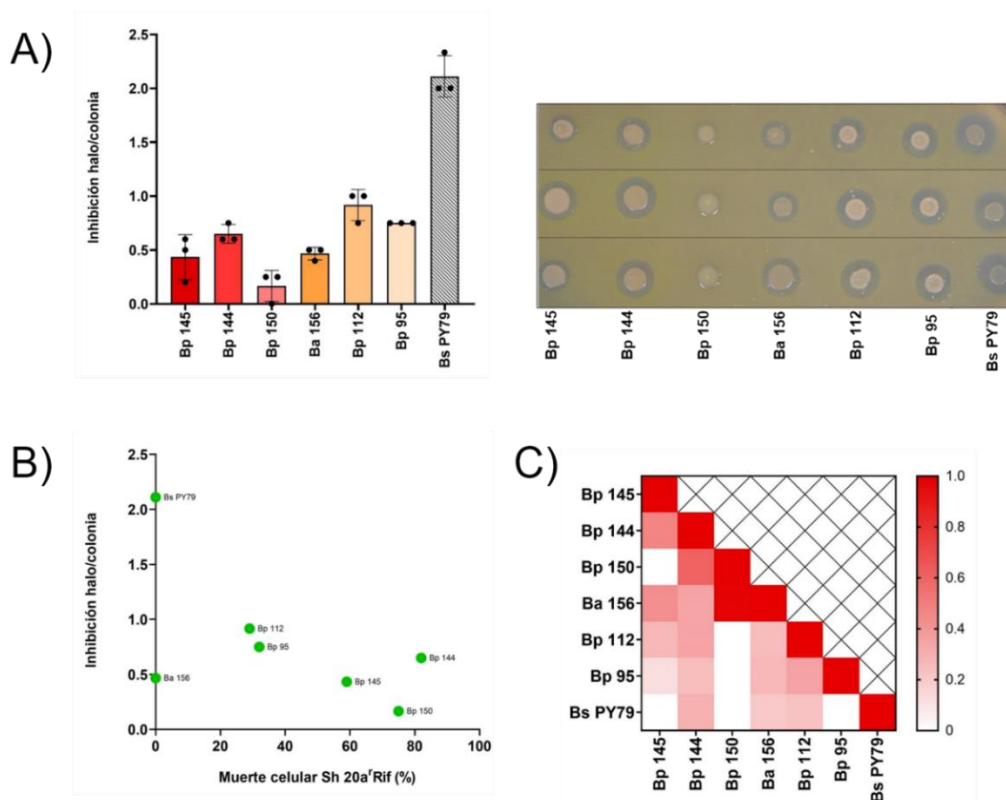


Figura 12. Ensayos de inhibición y sobrevivencia. A) Confrontación doble en agar. B) Relación entre la inhibición en MM agar y la sobrevivencia en MML. C) Inhibición en MM agar de cepas combinadas sobre Sh20a<sup>rif</sup>.

### 6.3.2. Participación de Sideróforos.

De acuerdo al perfil de BGC, algunos *clusters* son de síntesis de antibióticos, entre ellos la molécula bacilibactina, un sideróforo catecólico implicado en la quelación del catión férrico (Dertz *et al.*,

2006). Con la finalidad de soportar o descartar la participación de un sideróforo como bacilibactina en la interacción antagonista de la comunidad sintética BARS, se montaron ensayos de inhibición de Bp145 y las cepas seleccionadas (Bp144, Bp150, Ba156, Bp112, Bp95 y PY79) sobre Sh20aRif<sup>r</sup> a diferentes concentraciones de citrato férrico, la única fuente de hierro del medio marino (Aguilar-Salinas, 2018). La concentración normal de citrato férrico es de 400  $\mu$ M. Se encontró que los cambios en la concentración de Fe en el medio tienen un efecto sobre el antagonismo (Figura 13), dado que en el caso de la interacción con las cepas Bp145, Bp144 y Ba156, la inhibición de la cepa sensible (Sh20aRif<sup>r</sup>) incrementa cuando la concentración de citrato es 100 veces menor (4  $\mu$ M), disminuye al agregar el doble de la concentración normal (800  $\mu$ M), y desaparece cuando al medio no se le adiciona con este compuesto. La inhibición por interacción con las cepas Bp112, Bp95 y PY79 se mantiene al variar la concentración pero incrementa al bajar la concentración 100 veces (4  $\mu$ M). Mientras que para el caso de la interacción con Bp150, lo que se obtiene es una zona de inhibición nula al variar todas las concentraciones y una muy leve aparición de halo de inhibición con 4  $\mu$ M de citrato férrico (Figura 13). En todos los casos la cepa sensible crece en el agar gracias al hierro que contiene el extracto de levadura del MM.

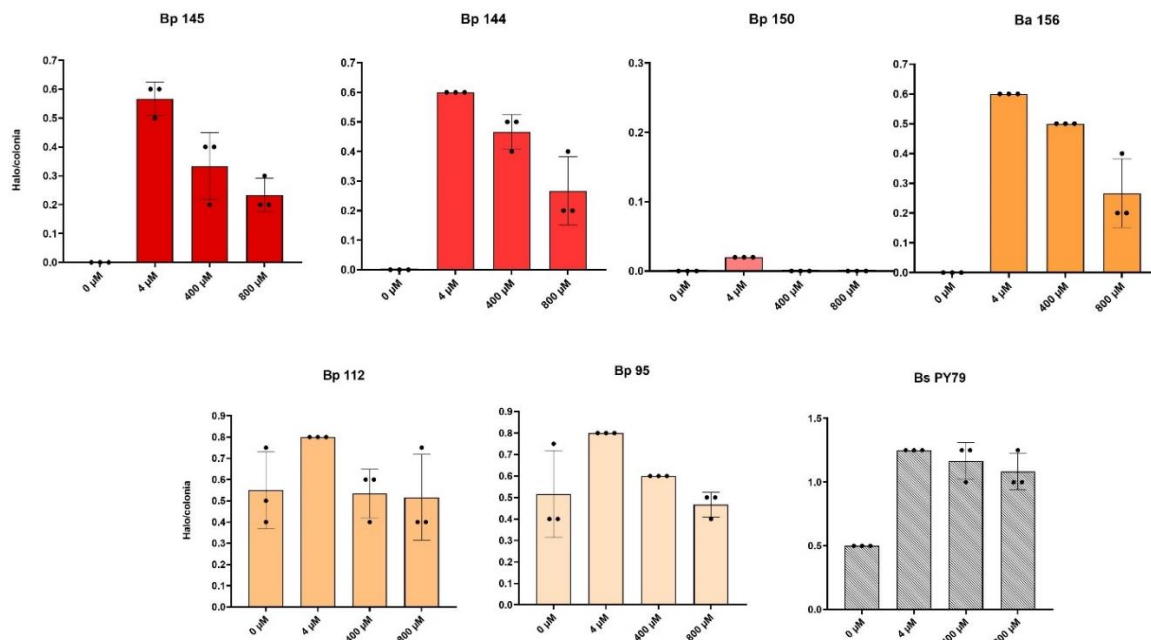


Figura 13. Prueba de utilización de  $Fe^{+3}$  en el antagonismo. La concentración normal de citrato férrico del MML es de 400  $\mu$ M.

## 6.4. Caracterización del Metabolito Antagonista.

### 6.4.1. Actividad Biológica Potencial de los Genomas.

Si bien, el antagonismo en la comunidad BARS es producto del metabolismo de una bacteria Gram positiva (Bp145) cuando se le confronta con otra bacteria Gram positiva (Sh20a), por lo tanto, el *cluster* de genes biosintéticos tendrá que poseer la capacidad de codificar compuestos con potencial actividad antimicrobiana y más específicamente anti Gram positiva. Por ende, se planteó analizar el potencial de la actividad biológica de los BGC similares a *clusters* de biosíntesis de antibióticos (liquenisina, fengicina, bacilisina, bacilibactina y zwitermicina). Para lograr esto, se emplearon clasificadores de aprendizaje automático para asignar un porcentaje de probabilidad de actividad antimicrobiana, antifúngica o antitumoral a los BGC analizados (Walker y Clardy, 2021).

Con este análisis, se pudo corroborar la alta probabilidad de actividad antimicrobiana que se tendría en caso de que se expresaran los grupos de genes identificados como liquenisina, bacilisina y *Bp-ZmA-Like*, con un porcentaje mayor al 60%. Por un lado, tanto liquenisina, como *Bp-ZmA-Like* son los BGC con mayor probabilidad de tener actividad anti Gram positiva, con un porcentaje de 79% y 64% respectivamente. Además, *Bp-ZmA-Like* podría ser capaz de antagonizar cepas Gram negativas con un valor de 56%, y tener capacidad fungicida (31%). Por otro lado, el grupo con el ID de bacilibactina fue el que obtuvo los menores porcentajes en cuanto a actividad antibiótica en general, con un valor de 4% y 3% de probabilidad de tener actividad anti Gram positiva y negativa, 8% para actividad antifúngica, y su porcentaje más alto fue el de actividad antitumoral con un 17% de probabilidad. Mientras que en el caso de fengicina prevalece el potencial de actividad antifúngica debido a una probabilidad mayor al 50% (Figura 14). En efecto, se ha demostrado experimentalmente que esta molécula tiene actividad de antagonista contra hongos (Ongena *et al.*, 2005).

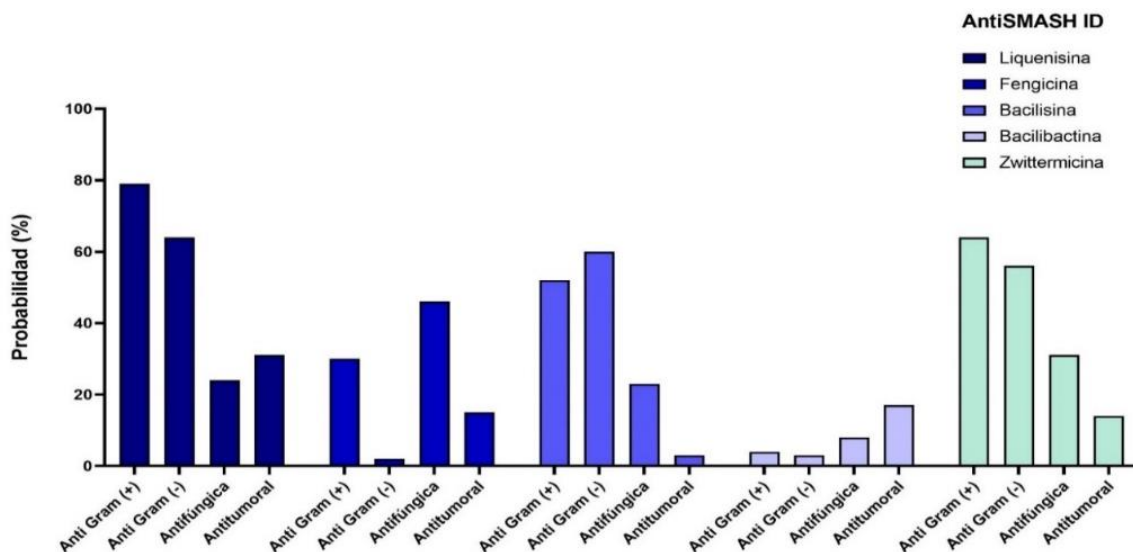


Figura 14. Predicción de la actividad biológica de los BGC con ID de antibióticos. Se indica al *Bp-ZmA-Like* como Zwittermicina.

#### 6.4.2. Identificación de Genes Biosintéticos del *cluster Bp-ZmA-Like*.

La actividad biológica de un metabolito secundario depende de los grupos de genes que directamente median la biosíntesis a través de actividad enzimática. Para predecir los genes involucrados en la biosíntesis del metabolito asociado al *cluster Bp-ZmA-Like*, se utilizó PRISM 4, una plataforma que resume los procesos enzimáticos, predice la estructura molecular con base en la secuencia de aminoácidos y asigna un nombre de acuerdo al tipo de metabolito detectado. Por un lado, PRISM detecta los genes importantes e involucrados en la codificación específica de antibióticos. Utilizando esta herramienta, se encontró que el *cluster* codifica para proteínas y complejos enzimáticos que catalizan la biosíntesis de compuestos como policétidos, terpenos y péptidos no ribosomales (Figura 15 A). De acuerdo a la totalidad de los genes codificados, PRISM predice que este *cluster* podría estar biosintetizando un metabolito secundario que es una combinación entre un policétido (PK) y un péptido no ribosomal (NRP). Los PK son un grupo heterogéneo de compuestos como poliéteres, polienos, polifenoles y macrólidos que se derivan del ácido acético, y muchos productos naturales como eritromicina y tetraciclina tienen esta estructura (Hertweck, 2009; Stauton y Weissman, 2001). Mientras que, un NRP son cadenas de aminoácidos sintetizados enzimáticamente, tales como los glicopéptidos de la familia vancomicina (Fischbach y Walsh, 2006).



Por otro lado, la plataforma PRISM4 generó un visualizador de ensamblaje biosintético en donde se plasman los procesos enzimáticos que participan en la biosíntesis del metabolito secundario final, ubicados por gen. Procesos importantes como la adenilación se llevan a cabo en los genes *03300*, *03340* y *03345* dentro del *Bp-ZmA-Like*, teniendo como sustratos aminoácidos como asparagina y glutamato (Figura 15 B). Asimismo, se tiene actividad enzimática importante mediada por ceto reductasas (*03340*, *03350* y *03355*), ceto sintasas (*03340*, *03350*, *03355* y *03360*) y aciltransferasa (*03340*, *03350*, *03355* y *03360*), una proteína transportadora de acilo a la cual se unen unidades extensoras como malonil-CoA en la síntesis de ZmA (Kevany *et al.*, 2008).



Figura 15. Perfil de genes involucrados en la actividad biológica antimicrobiana. A) Tipos de moléculas que biosintetiza el grupo de genes *Bp-ZmA-Like*. B) Ensamble biosintético de los dominios proteicos por cada gen del *cluster*; cada círculo representa un proceso enzimático.

### 6.4.3. Estructura Molecular.

Los antibióticos y toxinas conocidas que producen las bacterias del género *Bacillus* para antagonizar en los ecosistemas, poseen estructuras compuestas por varias proteínas a las cuales deben su mecanismo de acción. Por ello, se hipotetizó que la estructura del metabolito secundario que produce *Bp-ZmA-Like* podría parecerse a la estructura de algún antibiótico ya conocido, y con ello predecir su mecanismo de acción.

De acuerdo al perfil de genes, se predijo que el *cluster Bp-ZmA-Like* sintetiza un metabolito NRP-PKS (Non Ribosomal Peptide-Polyketide). Por lo tanto, era necesario saber si el metabolito era de estructura similar a otros ya conocidos compuestos por NRP-PKS. PRISM 4 arrojó un archivo de salida con las estructuras posibles, tanto en secuencia como en conformación en formato SMILE (especificación de introducción lineal molecular simplificada). Estas cadenas SMILE (Cuadro 7) se analizan de acuerdo a la estructura 2D obtenida del visualizador UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004). A pesar de que dos de las estructuras adquieren una conformación cíclica, la estructura general es la misma en los tres casos, incorporando dos moléculas del aminoácido asparagina y una de glutamato, además de una parte hidrofóbica de 10 carbonos, que probablemente se asocia a uno de los dominios de PKS (Figura 16 B).

Cuadro 7. Formato SMILE de las estructuras moleculares predichas.

Estructura	SMILE
I	<chem>O=C(O)CC(=O)CC(O)CC(O)C(NC(=O)CC(O)C(NC(=O)C(NC(=O)CC(O)CC(C)C)CC(=O)N)CC(=O)N)CCC(=O)O</chem>
II	<chem>O=C(O)CCC1NC(=O)CC(O)C(NC(=O)C(NC(=O)CC(OC(=O)CC(=O)CC(O)C1(O))CCCCCCCCC(C)C)CC(=O)N)CC(=O)N</chem>
III	<chem>O=C(O)CCC1NC(=O)CC(OC(=O)CC(=O)CC(O)CC1(O))C(NC(=O)C(NC(=O)CC(O)CCCCCCCCC(C)C)CC(=O)N)CC(=O)N</chem>

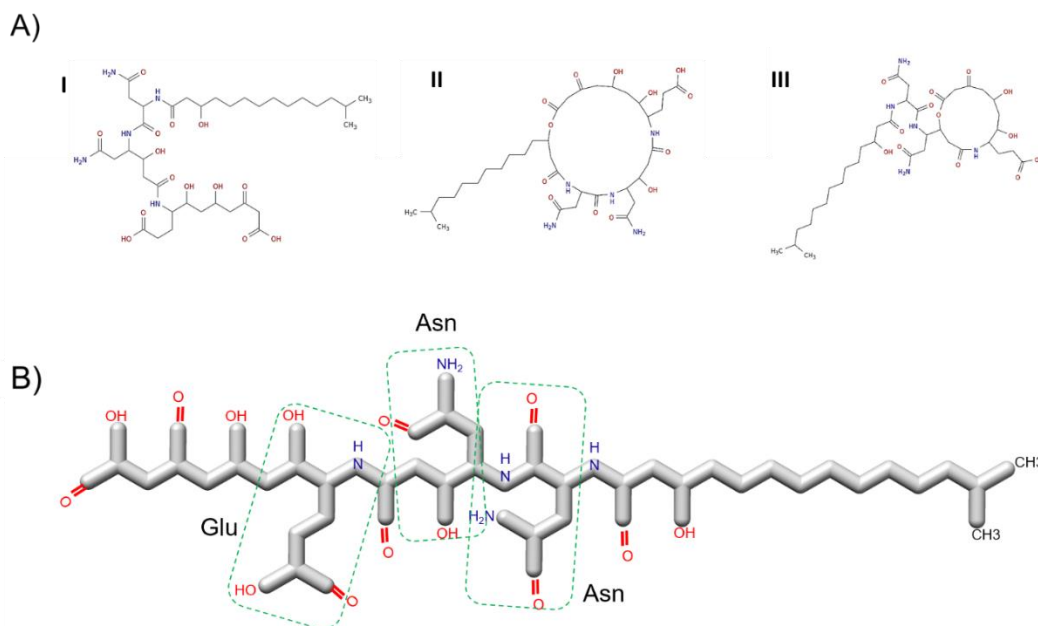
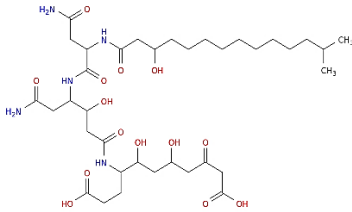
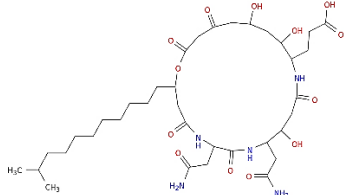
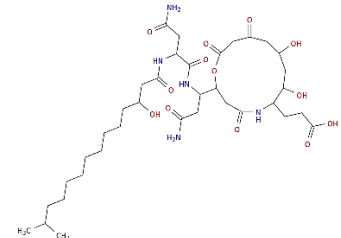


Figura 16. Predicción de estructura molecular. A) Tres tipos de estructura se enumeran en números romanos. B) Estructura lineal general.

Se compararon estas estructuras obtenidas en PubChem, una base de datos de todas las moléculas conocidas. De acuerdo a esta búsqueda, esta molécula no se ha descrito y no se le conoce con algún nombre, por lo tanto se utilizó una línea de comandos establecida por el programa CheckMol (Haider, 2010) con la cual se logró asignar un nombre a las tres estructuras acorde a las reglas de la IUPAC (Cuadro 8). Existen diferencias puntuales entre los nombres debido a la localización que algunos enlaces adquieren sobre todo en las estructuras II y III al formar la estructura cíclica. Aunque estas estructuras se tratan de predicciones y requieren una comprobación experimental, este análisis puede permitir la generación de hipótesis para dichos acercamientos experimentales.

Cuadro 8. Asignación de nombre molecular acorde a la IUPAC.

Estructura	Nombre
	<p>8-[[6-amino-4-[[4-amino-2-[(3-hidroxi-13-metiltetradecanoil)amino]-4-oxobutanoil]amino]-3-hidroxi-6-oxohexanoil]amino]-5,7-dihidroxi-3,10-ácido dioxododecanedioico</p>
	<p>4-[[6-amino-4-[[4-amino-4-(10-metilundecil)-2,6,10,12-tetraoxo-1-oxa-5,9-diazaciclotridec-8-il]amino]-3-hidroxi-6-oxohexanoil]amino]-5,7-dihidroxi-10-ácido oxodecanoico</p>
	<p>4-[3-amino-1-[[4-amino-2-[(3-hydroxy-13-metiltetradecanoil)amino]-4-oxobutanoil]amino]-3-oxopropil]-7,9-dihidroxi-2,5,11,13-tetraoxo-1-oxa-6-azaciclotridecane-1-ácido carboxílico</p>

## 7. DISCUSIÓN

La comunidad sintética BARS es un consorcio de tres cepas bacterianas que provienen del sedimento de la laguna Churince, ubicada en Cuatrociénegas, México. Cuatrociénegas es un sistema oligotrófico en el que la biodiversidad ha evolucionado y desarrollado capacidades específicas para adaptarse y mantenerse ahí durante millones de años (Souza *et al.*, 2018). En la comunidad sintética BARS, *Bacillus pumilus* 145 (Bp145) es capaz de antagonizar a *Sutcliffiella horikoshii* 20a (Sh20a), antagonismo que se inhibe con la presencia de la cepa *Bacillus cereus* 111 (Bc111) (Aguilar-Salinas, 2018). Estas propiedades emergentes han hecho de la comunidad BARS una herramienta que ha servido para el estudio de las interacciones bacterianas que surgen en un contexto tan peculiar como el de la laguna Churince.

Los resultados experimentales y predicciones bioinformáticas llevados a cabo en este trabajo, indican que la cepa Bp145 sintetiza un compuesto antibiótico para antagonizar a la cepa sensible Sh20a. Por las características de los *clusters* que se encontraron en el genoma, hay probabilidad de que este compuesto fuera un policétido-péptido no ribosomal (NRP-PK), producido por el *cluster* identificado como *Bp-ZmA-Like*. Además, se obtuvieron variantes de la cepa sensible Sh20a resistentes a rifampicina; estas nuevas cepas variantes son una herramienta para mejorar la manera en la que se cuantifican las UFC/ml luego de las interacciones entre la cepa antagonista y sensible. También, se exploraron las confrontaciones entre las cepas en agar, lo cual permite evaluar el efecto de las condiciones experimentales, de manera más eficiente, sobre el mecanismo de antagonismo; así se logró estudiar el efecto de la concentración de Fe y de la combinación de cepas antagonistas sobre esta actividad. Las bacterias y sus interacciones representan un impulsor determinante del funcionamiento de los ecosistemas. Muchas de estas interacciones son mediadas por competencia antagonista gracias a la biosíntesis de toxinas a través de las cuales los microorganismos compiten por el espacio y nutrientes (Kelsic *et al.*, 2015; Zeng y Burne, 2011; Pacheco y Segre, 2019). Por lo tanto, la información generada en este proyecto es determinante para entender cómo surgen las interacciones microbianas en el sedimento de la laguna Churince.

Las interacciones antagonistas son, en parte, esenciales para el ensamblaje de las bacterias en una comunidad dado que se asocian a la supervivencia de especies antagonistas y disminuye la posibilidad de que especies invasoras se establezcan en su hábitat (Stubbenieck *et al.*, 2016; Van

Elsas *et al.*, 2012). En el ambiente de los sedimentos marinos, el antagonismo representa una poderosa fuerza selectiva que ha llevado a la evolución de diversas estrategias que utilizan las comunidades microbianas para ensamblarse, colonizar y crecer (Long y Azam, 2001; Van der Heijden *et al.*, 2008). En este sentido, la biodiversidad del sedimento de la laguna Churince representa una fuente de conocimiento sobre las interacciones antagonistas que surgen en ese microsistema, considerando la gran cantidad de filos taxonómicos que se encuentran ahí (Rodríguez-Torres *et al.*, 2017). Notablemente, han sido de interés las bacterias del género *Bacillus* spp. conocidas por su capacidad de biosintetizar metabolitos secundarios que las hacen altamente antagonistas (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2013). En este estudio se utilizó una estrategia de genómica comparativa para generar una visión global del perfil de *clusters* de genes de biosíntesis (BGC) de metabolitos secundarios; esto nos permitió una exploración inicial de los posibles compuestos antimicrobianos que causan el antagonismo de la comunidad BARS. Para complementar este análisis, se demostró experimentalmente que algunas cepas de *Bacillus pumilus* similares a Bp145 mantienen la capacidad de antagonismo en condiciones de medio líquido y agar. Si el antagonismo representa una fuerza selectiva, es probable que las cepas de *Bacillus pumilus* tengan una función importante no solo en la comunidad BARS, sino en la laguna Churince.

Uno de los objetivos principales de este trabajo fue identificar el *cluster* relacionado con la actividad antagonista de Bp145 sobre Sh20a. Los genomas de las cepas provenientes de la laguna Churince, contienen grupos de genes de síntesis de diversos metabolitos útiles para el desarrollo, colonización y establecimiento de estas especies en la comunidad, ya que algunos de los *clusters* encontrados expresan moléculas lipopeptídicas como fengicina y liquenisina. Ambos son antibióticos bien estudiados; fengicina es utilizada industrialmente por su eficacia contra hongos (Tan *et al.*, 2022), y liquenisina actúa como biosurfactante debido a que su estructura es similar a la surfactina, sintetizada por *Bacillus subtilis* (Grangemard *et al.*, 2001). A pesar de esto, se ha visto que fengicina no tiene la capacidad de actuar contra especies bacterianas; por otro lado, la liquenisina es un producto muy específico del metabolismo de *Bacillus licheniformis* (Ongena *et al.*, 2005; Grangemard *et al.*, 2001). Además, el porcentaje de identidad de los *clusters* de Bp145 con ID de liquenisina (14 - 85% similar a referencia) o fengicina (53% similar a referencia) sugiere que estos genes codifican para otro tipo de moléculas o variantes similares, aun no descritas. En el caso de los *clusters* similares a BGC de síntesis de bacilibactina (53%) y bacilisina (85%), también se encuentran muy conservados entre las cepas de *B. pumilus*, mientras que el BGC de síntesis de

zwitermicina (ZmA) solamente se encontró en 3 cepas con un porcentaje de identidad del 18%. Tomando en cuenta que solamente las cepas Bp144 y Bp150 resultaron ser ecológicamente equivalentes a Bp145, como antagonistas en la comunidad BARS, se definió al *cluster Bp-ZmA-Like* como candidato para mediar esta función, ya que es el único *cluster* que está presente en estos genomas, y ausente en las cepas no equivalentes. ZmA es un metabolito solamente conocido en cepas de *Bacillus cereus*, que tiene estructura lineal inusual (Emmert *et al.*, 2004; Luo *et al.*, 2011) y definida como un híbrido policétido-péptido no ribosomal (NRP-PK). Notablemente, los análisis de genes biosintéticos del *cluster Bp-ZmA-Like* de Bp145 indican que la molécula producida podría ser un NRP-PK. El rango de acción antibiótica de la zwitermicina es muy amplio, pues tiene una alta actividad contra hongos fitopatógenos y protistas, y una actividad moderada contra algunas bacterias Gram negativas (Sansinenea y Ortiz, 2012). Por el contrario, el *cluster Bp-ZmA-Like*, tiene un mayor porcentaje de probabilidad de tener actividad contra bacterias Gram positivas, con un valor de 64% de producir tal efecto, 56% de actividad anti Gram negativa, y solo 31% de actividad antifúngica. Este análisis es consistente con la actividad que tiene Bp145 en la comunidad BARS, donde antagoniza a una cepa Gram positiva; sin embargo, en trabajos de continuación se podría probar su efecto contra bacterias Gram negativas o contra hongos.

En la comunidad BARS, la cepa *Bacillus cereus* 111 es la responsable de evitar el antagonismo en una confrontación triple (Aguilar-Salinas, 2018). Para explorar a fondo la equivalencia ecológica y el mecanismo de antagonismo en condiciones de confrontación triple, también se propuso evaluar el efecto de resistencia de Sh20a agregando a la cepa Bc111 a la interacción con las cepas equivalentes. Notablemente, solo la interacción con Bp150 logra evitar la inhibición de la cepa sensible, tal y como ocurre en la comunidad BARS, mientras que Bp144 mantiene la inhibición aun en presencia de la resistente. Aunque los genomas de las cepas ecológicamente equivalentes comparten varios *clusters* de genes, es importante proponer que éstos podrían no expresarse igual al estar en la interacción triple. Es indispensable continuar explorando esta estrategia en otras condiciones experimentales más robustas.

La mayoría de los grupos microbianos tienen varias rutas de biosíntesis que no se expresan o se expresan en menor o mayor proporción ante diferentes condiciones de crecimiento de laboratorio. Cambios muy pequeños en las condiciones de cultivo, como la composición del medio, el pH, la temperatura o la aireación, pueden cambiar el perfil metabólico de una especie, y resultar en el aislamiento de nuevos metabolitos secundarios (Bode *et al.*, 2002; Pettit, 2011). Inicialmente, la

comunidad BARS se desarrolló como un modelo para medir la interacción antagonista entre Bp145 y Sh20a en su fase de crecimiento exponencial en medio marino líquido (MML). En este trabajo, se buscaron estrategias para medir la interacción en otras condiciones experimentales, como crecimiento en medio marino con agar, la modificación de la concentración de sales, y la fase de crecimiento. Aunque varias cepas inhiben el crecimiento de la cepa sensible, el efecto antagonista difiere cuando las condiciones de los ensayos de confrontación varían. En un principio, se encontró que el antagonismo en agar estaba reducido en la interacción de Sh20a vs las cepas ecológicamente equivalentes (Bp145, Bp144 y Bp150); en contraste, las no equivalentes (Ba156, Bp112, Bp95 y PY79, que tienen menor antagonismo en medio líquido) efectuaron un antagonismo mayor en agar. En el caso de Bp150, una de las cepas que más inhiben a Sh20a en líquido, no es capaz de producir inhibición en agar. Esto podría deberse a que las colonias que crecen en agar tienen estructuras comunitarias distintas que contienen bacterias en diferentes estados fisiológicos (Ee-Been *et al.*, 2002). Además, se comparó el efecto antagonista de las cepas en fase exponencial vs la fase estacionaria, en interacciones en medio líquido. Los resultados muestran que Bp145 y las cepas equivalentes (Bp144 y Bp150) mantienen el mismo nivel de antagonismo tanto en fase exponencial como en fase estacionaria; por otro lado, el resto de las cepas, que no presentan antagonismo en fase exponencial, sí muestran esta actividad en fase estacionaria. En otras bacterias, la actividad antimicrobiana difiere en función de la etapa de crecimiento de la cepa antagonista debido a la participación de dos o más metabolitos secundarios. Aunque en muchos casos la concentración de los metabolitos secundarios antagonistas es más alta en la fase temprana de crecimiento, la actividad antagónica es más alta en la fase estacionaria, dado que se pueden acumular una mayor cantidad de metabolitos en concentraciones óptimas para actuar sinérgicamente (Naglot *et al.*, 2015; Manage *et al.*, 2001). Es probable que algunas cepas no expresen el metabolito que produce el antagonismo en la comunidad BARS, y por ende que tampoco sean capaces de inhibir a Sh20a en un contexto y condiciones como el de esta comunidad, aunque los mismos grupos de genes se encuentren en los genomas de todas las cepas filogenéticamente cercanas. Por esta razón, es importante tener sistemas experimentales que permitan probar diferentes condiciones en las interacciones. Asimismo, estudios de transcriptómica, proteómica y metabolómica podrían elucidar qué metabolitos se producen y acumulan en las diferentes fases de crecimiento, ayudando a identificar los *clústers* responsables.

Las condiciones en las cuales surgen las propiedades emergentes de la comunidad BARS son en



interacción en medio marino líquido (MML) a una temperatura de 26°C, en cultivo estático (Aguilar-Salinas, 2018). En un principio, se propuso observar el efecto antagonista a través de ensayos que facilitaran la manipulación de las cepas, como la inhibición en agar a través de la técnica de *spot on lawn* (Cadirci y Citak, 2005). Sin embargo, los ensayos de confrontación llevados a cabo en agar no replican el antagonismo observado en MML (Figura 12 B) donde las cepas ecológicamente equivalentes demuestran su mayor potencial antagonista en contraste con el MM con agar. Usando este enfoque, se puede sugerir que la actividad antagonista de estas cepas depende fuertemente de las condiciones ambientales de la confrontación. Es probable que Bp145 solo tenga una actividad antagonista limitada hacia Sh20a, lo que podría probarse desarrollando medios de cultivo en agar que induzcan la biosíntesis de niveles más altos del metabolito antagonista.

Uno de los análisis que se logró gracias al uso del sistema experimental en agar fue la evaluación del efecto de la concentración de hierro sobre la actividad antagonista. En el perfil de BGC se identificó un *cluster* con ID de bacilibactina, un sideróforo endógeno estudiado en *Bacillus subtilis*, gracias al cual, esta especie es capaz de adquirir hierro del medio para sobrevivir (Dertz *et al.*, 2006). La captación de hierro es un proceso importante ya que este elemento es un componente esencial de las enzimas del metabolismo primario. Las bacterias obtienen este elemento por medio de moléculas quelantes de metales de alta afinidad llamados sideróforos que son absorbidos activamente por las células empobrecidas en hierro a través de receptores de membrana específicos (Lee *et al.*, 2011). Este podría ser un mecanismo de antagonismo, ya que un sideróforo estaría ocasionando que el hierro no esté disponible para la cepa sensible. Por esto, surgió la hipótesis de que Bp145 podría sintetizar este metabolito para producir el antagonismo sobre Sh20a, y se propuso que a mayor concentración de Fe<sup>3+</sup> el antagonismo se vería atenuado. A diferencia de otros sideróforos, la regulación de bacilibactina es muy sensible a la concentración de hierro, ya que en otras especies de *Bacillus*, el agotamiento de este elemento en el medio conduce a una mayor producción de bacilibactina (Lee *et al.*, 2011). En este caso, al disminuir 100 veces la fuente de Fe<sup>3+</sup> se produce una inhibición mayor de la cepa sensible en interacción con las cepas Bp145, Bp144 y Ba156, y al aumentar 2 veces la concentración normal, el antagonismo se reduce. Sin embargo, al no añadir este elemento no se produce inhibición, aunque las cepas crecen con normalidad, lo que puede deberse a que el extracto de levadura tiene 0.4 mg de hierro por cada gramo de extracto de levadura. Podría ser que la interacción antagonista de la comunidad BARS necesita de una

concentración que oscila entre los 4  $\mu\text{M}$  y los 400  $\mu\text{M}$  para efectuar la muerte celular de la cepa sensible. Además, el medio sin  $\text{Fe}^{3+}$  añadido pudo haber desencadenado una pérdida en las funciones normales de las cepas antagonistas, siendo un elemento que interfiere en varios procesos metabólicos, incluso en la biosíntesis de otros antibióticos diferentes a los sideróforos (Braun, 2001). Aunque los resultados son parcialmente consistentes con la participación de un sideróforo, es necesario realizar estos estudios en MML, dado que los mecanismos de antagonismo parecen ser diferentes en ambas condiciones (líquido y agar).

Por otro lado, gran parte de los antibióticos conocidos utilizan mecanismos de acción basados en la lisis celular y, bacilisina es uno de ellos. Este metabolito secundario es capaz de producir antagonismo tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas, además de algunas microalgas, hongos y cianobacterias (Wu *et al.*, 2014; Wolfgang *et al.*, 1986). Su efectividad depende fuertemente de su transporte al interior de las células sensibles por medio de un sistema permeasa-peptídico, y de su hidrólisis a anticapsina que finalmente inhibe a la glucosamina sintasa, una enzima que evita su acción antimicrobiana (Parker y Walsh, 2013; Perry y Abraham, 1979). En este trabajo, este *cluster* tiene una probabilidad mayor al 50% en actividad anti Gram positiva y negativa, es el más conservado entre las cepas y el de mayor porcentaje de identidad. Pero, es probable que este BGC no sea el responsable de mediar la muerte celular con base en que bacilisina necesita una interacción célula-célula para actuar, y en el contexto de la comunidad BARS, la inhibición inicia inmediatamente después de mezclar a Sh20a con Bp145. Es decir, el metabolito secundario podría biosintetizarse durante la incubación individual de la cepa antagonista y no después de confrontar ambas cepas. Además, en los ensayos de confrontación en MML en donde se pusieron a prueba los cultivos de las cepas antagonistas al llegar a su fase exponencial y estacionaria, se observó una muerte celular igual en ambos tratamientos en las interacciones de la cepa sensible *vs* las cepas ecológicamente equivalentes (Bp145, Bp144 y Bp150). Esto quiere decir, que el metabolito antagonista no se acumula en fase estacionaria, sino que permanece en la misma cantidad que en la fase exponencial. Mientras que, bacilisina se produce en mayor cantidad durante la fase exponencial, y en menor cantidad durante la fase estacionaria (Steinborn *et al.*, 2005).

Utilizando el ensayo en agar, también se logró explorar la posible participación de múltiples metabolitos para el antagonismo en diferentes cepas, a través de ensayos donde se combinaron cultivos de cepas antagonistas para buscar sinergias. Se sabe que la combinación de antibióticos diferentes mejora su efecto bactericida, asimismo, se ha visto que el empleo de estrategias basadas

en sinergias ha podido mejorar la eficacia antimicrobiana de la zwittermicina. Por ejemplo, la combinación de este metabolito secundario con N-acil homoserina-lactonasa para la prevención de la virulencia de *Erwinia carotovora*, o el efecto sinérgico de este compuesto y delta-endotoxina que incrementa la toxicidad de *Bacillus thuringiensis* (Rigatto y Falci, 2016; Zhao *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009). Entonces, bajo el fundamento de que algunos antibióticos incrementan el diámetro de la zona de inhibición al mezclarse con un antibiótico diferente (Kali *et al.*, 2016) se planteó la hipótesis de que las cepas ecológicamente equivalentes (Bp145, Bp144 y Bp150) utilizan el mismo metabolito y por ende serían incapaces de efectuar un antagonismo mayor al observado normalmente de manera individual. Sin embargo, las pruebas de sinergismo y cooperación entre las cepas antagonistas sobre Sh20a resultaron en una inhibición igual a la producida por las cepas de manera independiente. Esto podría sugerir que las tres cepas equivalentes antagonizan con la misma molécula, pero, aún es necesario realizar este experimento en medio líquido.

Tomando en cuenta que el *Bp-ZmA-Like* se convirtió en el *cluster* candidato, como posiblemente asociado a la síntesis del metabolito responsable de producir el antagonismo de la comunidad BARS, se optó por utilizar las herramientas predictivas de *Machine Learning*, PRISM 4, CheckMol y STOUT, para explorar su actividad biológica, biosíntesis y estructura. La actividad biológica de un policétido se rige por las variaciones estructurales proporcionadas por las policétido sintasas (PKS), las cuales condensan precursores (unidad iniciadora y unidades extensoras) de ácido carboxílico tioesterificado en una cadena de policétido en crecimiento. En el *cluster* de zwittermicina de *B. cereus*, el gen *zmaK* es el responsable de codificar el complejo enzimático de PKS en la biosíntesis de ZmA: ZmaK (Kevany *et al.*, 2008; Chan y Thomas, 2010). En Bp145, como se observó en esta investigación, el gen *03360* del *cluster Bp-ZmA-Like* es homólogo a *zmaK* con un alto nivel de identidad, y representa la región que hace que éste *cluster* sea 18% similar a ZmA. Además, de acuerdo al perfil de genes involucrados en la actividad antimicrobiana, *03360* se traduce a un complejo PKS que probablemente sea similar a ZmaK. En la biosíntesis de ZmA se involucran tres dominios enzimáticos que son necesarios para un solo ciclo de elongación de la cadena: aciltransferasa, que es una proteína transportadora de acilo a la cual se unen unidades extensoras como malonil-CoA, un dominio tioesterasa, y una cetosintasa (KS) responsable de la condensación. Pueden existir dominios adicionales como cetoreductasa (KR) que tiene capacidad de óxido-reducción, una deshidratasa (DH) o una enoilreductasa (ER) (Chan y Thomas, 2010). Después de completar los ciclos de elongación, la cadena de acilo se escinde del complejo PKS

por un dominio de tioesterasa, liberando el esqueleto de policétido en forma lineal o ciclada (Khosla *et al.*, 1999). En el *cluster Bp-ZmA-Like* de Bp145, el gen *03315* codifica una enzima tioesterasa, los genes *03340*, *03350*, *03355* y *03360* codifican acil transferasas y cetosintasas que llevan a cabo la incorporación de malonil-CoA y la condensación en la biosíntesis de este metabolito. También se predice que los genes *03340*, *03350* y *03355* son de síntesis de dominios de cetoreductasas, lo que indica que la biosíntesis de *Bp-ZmA-Like* podría ser muy similar al proceso de síntesis de ZmA de *B cereus*. A pesar de estas similitudes, ninguna de las tres estructuras moleculares predichas a partir de *Bp-ZmA-Like* se parece a la de zwitermicina. Además, según la base de datos de PubChem (Kim *et al.*, 2019) esta molécula no se ha descrito, por lo tanto, es posible que el metabolito capaz de producir el antagonismo en la comunidad BARS sea una nueva molécula con actividad biológica antimicrobiana. En resumen, el análisis bioinformático predictivo indica que las interacciones antagonistas que rigen las propiedades emergentes de la comunidad BARS podrían estar mediadas por un metabolito no descrito, con características de policétido-péptido no ribosomal que depende de la incorporación adicional de asparagina y glutamato. Aunque aún se necesita verificación experimental, estas predicciones pueden guiar futuros experimentos para estudiar esta molécula, por ejemplo, a través de sus precursores.

## 8. CONCLUSIONES

Utilizando herramientas de bioinformática, se generó un perfil global de *clusters* biosintéticos de los genomas de la cepa antagonista *Bacillus pumilus* 145, así como 5 cepas de *B. pumilus* filogenéticamente cercanas, identificando *clusters* de biosíntesis de antibióticos como liquenisina, fengicina, bacilisina, bacilibactina y zwitermicina. Además, el mismo análisis para las cepas de *Sutcliffiella horikoshii* mostró que sus genomas contienen una cantidad menor de BGC de síntesis de antibióticos en comparación con *B. pumilus*; finalmente, las cepas de *Bacillus cereus* también presentan *clusters* de biosíntesis de antibióticos, compartiendo con *B. pumilus* únicamente los BGC identificados como bacilibactina y fengicina.

Se logró montar el sistema experimental de la comunidad BARS, sustituyendo a la cepa antagonista Bp145 con cepas filogenéticamente cercanas. En confrontaciones dobles, las cepas de *B. pumilus* 150 y 144 son las únicas capaces de replicar el antagonismo que produce la cepa 145 sobre la cepa sensible *S. horikoshii* 20a, por lo tanto, se identificaron como cepas ecológicamente equivalentes. Sin embargo, en la confrontación triple, la cepa resistente *B. cereus* 111 es capaz de evitar el antagonismo solamente en la interacción con la cepa equivalente Bp150.

Empleando las condiciones normales de la interacción de la comunidad BARS en medio líquido, se evaluó el antagonismo a diferentes fases de crecimiento. En el caso de Bp145 y las cepas ecológicamente equivalentes, el antagonismo se produce de la misma manera tanto en fase exponencial como en fase estacionaria. Por lo tanto, el antagonismo efectuado por las tres cepas es mediado por un metabolito secundario que no se acumula durante el crecimiento de las cepas y, al observarse el mismo patrón, es probable que las tres inhiban a la cepa sensible con el mismo mecanismo.

Integrando la información de predicción bioinformática (AntiSMASH) y ensayos experimentales de equivalencia ecológica, se podría hipotetizar que el BGC *Bp-ZmA-Like* es el *cluster* candidato para mediar el antagonismo en la comunidad BARS.

Se emplearon análisis bioinformáticos basados en líneas de comando y *Machine Learning* para caracterizar a fondo el *cluster Bp-ZmA-Like*. Estos análisis indican que el metabolito codificado por este *cluster* podría tener actividad anti Gram positiva. En su biosíntesis intervienen enzimas como acil transferasas y cetosintas involucradas en la incorporación de malonil-CoA, que

convierten al metabolito en una combinación entre policétido-péptido no ribosomal. En su estructura se incorporan los aminoácidos asparagina y glutamato, que tal vez son esenciales para su biosíntesis y función. Parece ser un metabolito secundario aún no reportado.

En este trabajo, se lograron generar herramientas para mejorar el sistema experimental de la comunidad sintética BARS, y también se exploró el antagonismo modificando las condiciones experimentales. Se obtuvieron mutantes de Sh20a resistentes a rifampicina para optimizar el proceso de conteo de UFC luego de una interacción. Así mismo, se montaron las interacciones de la comunidad BARS en agar, que permite la introducción de un mayor número de variables. Utilizando este sistema en agar se evaluó la participación de un posible sideróforo como coadyuvante de la inhibición; además, a través de combinaciones de cultivos se evaluó el fenómeno de sinergia entre pares de cepas antagonistas, para explorar la participación de múltiples metabolitos. De este modo, este trabajo contribuye a la consolidación de la comunidad BARS como herramienta experimental.

## 9. RECOMENDACIONES

Es necesario comprobar experimentalmente la participación del *cluster Bp-ZmA-like* en el fenómeno de antagonismo en la comunidad BARS. Para esto, se debe generar mutantes en la cepa Bp145 eliminando los genes de dicho *cluster*. En este trabajo se comenzaron los ensayos para esta mutación con una estrategia de doble recombinación homóloga. Se logró amplificar los fragmentos (gen marcador de resistencia flanqueado por fragmentos adyacentes corriente arriba y corriente debajo del *Bp-ZmA-like*) y ensamblarlos con la estrategia de Gibson Assembly, sin embargo, faltó insertarlos en un plásmido para continuar con el proceso de transformación en *E. coli* y posteriormente en *B. pumilus* e intercambio alélico. Una de las limitaciones para continuar con esta parte del proyecto fue que existen muy pocos registros sobre transformación de plásmidos en cepas de *Bacillus pumilus*. Inicialmente se intentó transformar por medio de electroporación, variando el medio, la intensidad de la electroporación, el tiempo de cultivo, etc. Así como también se puso a prueba la cepa Bp145 como competente natural, sin embargo, no se obtuvieron resultados. Al ser una cepa cercana a *Bacillus subtilis*, se recomienda tomar en cuenta los protocolos descritos para transformar cepas de esta especie.

Con base en la actividad biológica predicha para el metabolito producido por el *cluster Bp-ZmA-like*, será necesario probar el efecto antagonista tanto de la cepa Bp145 como del metabolito contra bacterias Gram negativas y hongos. Es importante trabajar en el aislamiento de la molécula con actividad antagonista, y montar un ensayo experimental en donde se emplee el metabolito aislado sobre la cepa Sh20a. Esto serviría para probar la participación de este *cluster* en el antagonismo, además, se podría descubrir si el antagonismo es producto de uno o más metabolitos.

Se predijo que asparagina, glutamato y malonil-CoA son moléculas precursoras de la biosíntesis del metabolito que codifica *Bp-ZmA-like*, por lo tanto podría ser útil desarrollar medios de cultivo donde se varíen las concentraciones de estos compuestos, para ver el efecto sobre la producción del metabolito y sobre antagonismo.

Los ensayos de participación de sideróforos y de sinergias entre pares de cepas se montaron específicamente en medio marino con agar. Sin embargo, al notar la diferencia en el antagonismo que se efectúa en líquido y en sólido, se recomienda montar dichos ensayos en medio marino líquido.

En la etapa final del trabajo experimental, se estandarizó un método para observar directamente la interacción entre células de Bp145 y Sh20a en microscopía de micro colonias, a través de *timelapse*. Se logró observar la lisis de células de la cepa sensible en un lapso de 1 h, solamente en presencia de células de la cepa antagonista:

<https://drive.google.com/drive/folders/1iZ45n2KEsnQT3AbY6ampIrsvzy2ci18C?usp=sharing>

Esta es una herramienta muy prometedora para estudios de continuación donde se puede probar cualitativa y cuantitativamente, y en tiempo real, el antagonismo y otros fenómenos emergentes en la comunidad BARS, en diferentes condiciones, presencia de nutrientes, cepas mutantes, etc.



## 10. REFERENCIAS

- Aguilar-Salinas, B. (2018). Propiedades Emergentes de las Interacciones Bacterianas en una Comunidad Sintética. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados. Irapuato, Gto.
- Bascompte J. 2010. Ecology. Structure and Dynamics of Ecological Networks. *Science*. 329: 765-766.
- Becker J., Eisenhauer N., Scheu S. y Jousset A. 2012. Increasing Antagonistic Interactions Cause Bacterial Communities to Collapse at High Diversity. *Ecology Letters*. 15: 468-474.
- Bode H. B., Bethe B., Hofst R. y Zeeck A. 2002. Big Effects from Small Changes: Possible Ways to Explore Nature's Chemical Diversity. *ChemBioChem*. 3. 7: 619-627.
- Bodelier P. 2011. Toward Understanding, Managing, and Protecting Microbial Ecosystems. *Frontiers in Microbiology*. 2: 1664-3021.
- Braun V. 2001. Iron Uptake Mechanisms and Their Regulation in Pathogenic Bacteria. *Int J Med Microbiol* 291: 67-79.
- Burgess J.G., Jordan E.M., Bregu M., Mearns-Spragg A., y Boyd K. G. 1999. Microbial Antagonism: a Neglected Avenue of Natural Products Research. *J Biotechnol*. 70: 27-32.
- Çadirci B.H. y Çitak S. 2005. A Comparison of Two Methods Used for Measuring Antagonistic Activity of Lactic Acid Bacteria. *Pakistan Journal of Nutrition* 4 (4): 237-241
- Calvo J. y Martínez-Martínez L. 2009. Mecanismos de Acción de los Antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 27. 1: 44-52.
- Chan Y.A. y Thomas M.G. 2010. Recognition of (2S)-Aminomalonyl-Acyl Carrier Protein (ACP) and (2R)-Hydroxymalonyl-ACP by Acyltransferases in Zwittermicin A Biosynthesis. *Biochemistry*. 49. 17: 3667-3677.
- Ciric V., Manojlovic M., Nestic L. y Belic M. 2012. Soil Dry Aggregate Size Distribution: Effects of Soil Type and Land Use. *J Soil Sci Plant Nutr*. 12: 689-703.
- Cordero O. y Datta M. 2016. Microbial Interactions and Community Assembly at Microscales, *Current Opinion in Microbiology*. Science Direct. 31: 227-234.
- Curtis T., Sloan W. y Scannell J. 2002. Estimating Prokaryotic Diversity and its Limits. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99: 10494 - 10499.
- De Anda V., Zapata-Peñasco I., Eguiarte L.E. y Souza V. 2018. Toward a Comprehensive Understanding of Environmental Perturbations in Microbial Mats from the Cuatro Ciénegas Basin by Network Inference. *Springer, Cham*. 85-97.
- De Roy K., Marzorati M., Van den Abbeele P., Van de Wiele T. y Boon N. 2014. Synthetic Microbial Ecosystems: an Exciting Tool to Understand and Apply Microbial Communities. *Environ Microbiol*. 16: 1472-1481.
- Dertz E., Xu J., Stintzi A. y Raymond K. 2006. Bacillibactin-Mediated Iron Transport in *Bacillus subtilis*. *Journal of the American Chemical Society*. 128. (1): 22-23.

- Ebrahimi A, y Or D. 2016. Microbial Community Dynamics in Soil Aggregates Shape Biogeochemical Gas Fluxes from Soil Profiles—Upscaling an Aggregate Biophysical Model. *Glob Change Biol.* 22: 3141–3156.
- Ee-Been G., Yim G., Tsui W., McClure J., Surette M. y Davies J. 2002. Transcriptional Modulation of Bacterial Gene Expression by Subinhibitory Concentrations Of Antibiotics. *PNAS.* 99. 26: 17025-17030.
- Emmert B., Klimowicz A., Thomas M. y Handelsman J. 2004. Genetics of Zwittermicin A Production by *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* . 70. (1): 104-113.
- Falkowski P.G., Fenchel T. y Delong E.F. 2008. The Microbial Engines that Drive Earth’s Biogeochemical Cycles. *Science.* 320: 1034–1039.
- Faust K. y Raes J. 2012. Microbial Interactions: from Networks to Models. *Nat Rev Microbiol.* 10: 538–550.
- Fischbach M.A. y Walsh, C.T. 2006. Assembly-Line Enzymology for Polyketide and Nonribosomal Peptide Antibiotics: Logic, Machinery, and Mechanisms. *Chemical Reviews.* 106.(8): 3468–3496.
- Freilich S., Zarecki R., Eilam O., Segal E.S, Henry C.S., Kupiec M. Gophna U., Sharan R. y Rupp E. 2011. In Competitive and Cooperative Metabolic Interactions In Bacterial Communities. *Nat Commun,* 2: 589.
- Gallien, L. 2017. Intransitive Competition and its Effects on Community Functional Diversity. *Oikos.* 126. (5): 615–623.
- Gallucci M.N., Oliva M., Casero C., Dambolena J., Luna A., Zygodlo J. y Demo M. 2009. Antimicrobial Combined Action of Terpenes Against the Food-Borne Microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. *Flavour and Fragrance Journal.* 24. 6: 348-354.
- Gans J., Wolinsky M. y Dunbar J. 2005. Microbiology: Computational improvements reveal great bacterial diversity and high toxicity in soil. *Science.* 309 (5739): 1387–1390.
- Gilchrist C. y Chooi Y. 2021. Clinker & Clustermap.js: Automatic Generation of Gene Cluster Comparison Figures. *Bioinformatics.* 37. 16: 2473–2475.
- Graham A. y Mitchell D. 2018. RiPP Antibiotics: Biosynthesis and Engineering Potential. *Current Opinion in Microbiology.* 45. 61-69.
- Grangemard I., Wallach J. y Maget-Dana R. 2001. Lichenysin. *Appl Biochem Biotechnol.* 90: 199–210.
- Grundmann G., Dechesne A., Bartoli F., Flandrois J., Chasse J. y Kizungu R. 2001. Spatial Modeling of Nitrifier Microhabitats in Soil. *Soil Sci. Soc. Am.* 65: 1709-1716.
- Haider N. 2010. Functionality Pattern Matching as an Efficient Complementary Structure/Reaction Search Tool: an Open-Source Approach. *Molecules.* 15. 5079-5092.
- Hertweck C. 2009. The Biosynthetic Logic of Polyketide Diversity. *A Journal of the German Chemical Society.* 48. 26: 4688-4716.
- Hibbing M.E., Fuqua C., Parsek M.R., y Peterson S.B. 2010. Bacterial Competition: Surviving and Thriving in the Microbial Jungle. *Nat Rev Microbiol.* 8:15–25.

- Kali A., Bhuvaneshwar D., Pravin M.V.C. y Seetha K.S. 2016. Antibacterial synergy of curcumin with antibiotics against biofilm producing clinical bacterial isolates. *J Basic Clin Pharm.* 7. (3): 93-6.
- Kelsic E., Zhao J. y Vetsigian K. 2015. Counteraction of Antibiotic Production and Degradation Stabilizes Microbial Communities. *Nature.* 521: 516-519.
- Kevany B., Rasko D. y Thomas M. 2008. Characterization of the Complete Zwittermicin A Biosynthesis Gene Cluster from *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* . 75. (4): 1144-1155.
- Khosla C., Gokhale R. S., Jacobsen J. R. y Cane D. E. 1999. Tolerance and Specificity of Polyketide Synthases. *Annu. Rev. Biochem.* 68. 219–253.
- Kinkel L.L., Schlatter D.C., Xiao K., y Baines A.D. 2014. Sympatric Inhibition and Niche Differentiation Suggest Alternative Coevolutionary Trajectories Among Streptomycetes. *ISME.* 8: 249–256.
- Lee J.Y., Passalacqua K.D., Hanna P.C., Sherman D.H. 2011. Regulation of Petrobactin and Bacillibactin Biosynthesis in *Bacillus anthracis* under Iron and Oxygen Variation. *PLoS ONE* 6(6): e20777.
- Long R.A. y Azam F. 2001. Antagonistic Interactions Among Marine Pelagic Bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 67:4975–4983.
- Lozupone C.A. y Knight R. 2007. Global Patterns in Bacterial Diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* <https://doi.org/10.11436-11440>.
- Luo Y., Ruan L., Zhao C., Wang C., Peng D. y Sun M. 2011. Validation of the Intact Zwittermicin A Biosynthetic Gene Cluster and Discovery of a Complementary Resistance Mechanism in *Bacillus thuringiensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 55. (9): 4161–4169.
- Macchi M., Martinez M., Neme Tauil R.M., Valacco M.P., Morelli I.S. y Coppotelli B.M. 2018. Insights into the Genome and Proteome of *Sphingomonas paucimobilis* Strain 20006FA Involved in the Regulation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 34. (7).
- Manage P.M., Kawabata Z. y Nakano S. 2001. Dynamics of Cyanophage-Like Particles and Algicidal Bacteria Causing *Microcystis aeruginosa* Mortality. *Limnology.* 2. 73–78.
- McGuire K. y Treseder K. 2010. Microbial Communities and Their Relevance for Ecosystem Models: Decomposition as a Case Study. *Soil Biology and Biochemistry.* 42. (4): 529-535.
- Medema M.H., Blin K., Cimermancic P., De Jager V., Zakrzewski P., Fischbach M. A., Weber T., Takano E., y Breitling R. 2011. AntiSMASH: Rapid Identification, Annotation And Analysis of Secondary Metabolite Biosynthesis Gene Clusters in Bacterial and Fungal Genome Sequences. *Nucleic Acids Research.* 39. (2): 339-346.
- Mesquita R., Nóbrega M. y Wellington L. 2016. Microbial Interactions: Ecology in a Molecular Perspective. *Brazilian Journal of Microbiology.* 47: 86-98.
- Naglot A., Goswami S., Rahman I., Shrimali D.D., Yadav K.K., Gupta V.K., Rabha A.J., Gogoi H.K. y Veer V. 2015. Antagonistic Potential of Native *Trichoderma viride* Strain against Potent Tea Fungal Pathogens in North East India. *Plant Pathol.* 31. (3): 278-89.

- Nicholson W. y Maughan H. 2002. The Spectrum of Spontaneous Rifampin Resistance Mutations in the *rpoB* Gene of *Bacillus subtilis* 168 Spores Differs from That of Vegetative Cells and Resembles That of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology*. 184. (17): 4936-4940.
- Ongena M., Jacques P. y Touré Y. 2005. Involvement of Fengycin-Type Lipopeptides in the Multifaceted Biocontrol Potential of *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 69: 29-38.
- Pacheco A. y Segrè D. 2019. A Multidimensional Perspective on Microbial Interactions. *FEMS Microbiology Letters*. 366. (11).
- Pankaj K., Dubey R. y Maheshwari D. 2012. *Bacillus* Strains Isolated from Rhizosphere Showed Plant Growth Promoting and Antagonistic Activity Against Phytopathogens. *Microbiological Research*. 167 (8): 493-499.
- Parker J.B. y Walsh C.T. 2013. Action and Timing of BacC and BacD in the Late Stages of Biosynthesis of the Dipeptide Antibiotic Bacilysin. *Biochemistry*. 52. (5): 889-901.
- Patin N. Duncan K. Dorrestein P. y Jensen P. 2016. Competitive Strategies Differentiate Closely Related Species of Marine Actinobacteria. *ISME*. 10: 478–490.
- Pérez-Gutiérrez R. A., López-Ramírez V., Islas Á., Alcaraz L. D., Hernández-González I., Olivera B. C. L. y Olmedo-Álvarez G. 2013. Antagonism Influences Assembly of a *Bacillus* Guild in a Local Community and is Depicted as a Food-Chain Network. *ISME Journal*. 7. (3): 487–497.
- Perry D. y Abraham E.P. 1979. Transport and Metabolism of Bacilysin and Other Peptides by Suspensions of *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol*. 115:213–221.
- Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E. 2004. UCSF Chimera Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *J Comput Chem*. 25. (13):1605-12.
- Pettit R.K. 2011. Small-Molecule Elicitation of Microbial Secondary Metabolites. *Letters in Applied Microbiology*. 4. 4: 471-478.
- Pierce E. y Dutton R. 2022. Putting Microbial Interactions Back into Community Contexts. *Current Opinion in Microbiology*. 65: 56-63.
- Rajan K., Zielesny A. y Steinbeck C. 2021. STOUT: SMILES to IUPAC Names Using Neural Machine Translation. *J Cheminform*. 13. 34.
- Raynaud X. y Nunan N. 2014. Spatial Ecology of Bacteria at the Microscale in Soil. *Plos One*. 9. (1).
- Rigatto M. H., y Falci D. 2016. Polymyxins Combined With Other Antibiotics for the Treatment of Multi-Resistant Gram Negative Bacteria: Review of the Literature. *Principles and Practice of Clinical Research*. 2(1): 1-7.
- Rodríguez-Torres M. D., Islas-Robles Á. Gómez-Lunar Z., Delaye L., Hernández-González I., Souza V. y Olmedo-Álvarez G. 2017. Phenotypic Microdiversity and Phylogenetic Signal Analysis of Traits Related to Social Interaction in *Bacillus* spp. From Sediment Communities. *Frontiers in Microbiology*. 8. (29).
- Rohr R., Saavedra S. y Bascompte J. 2014. Ecological Networks on the Structural Stability of

Mutualistic Systems. *Science*. 345. (6195): 383-387.

- Sansinenea E. y Ortiz A. 2012. Zwittermicina A: Un Antibiótico Aminopoliol Prometedor de Bacterias de Biocontrol. *Química Orgánica Actual*, 16(8), 978–987.
- Schroeder J.W. y Simmons L.A. 2013. Complete Genome Sequence of *Bacillus subtilis* Strain PY79. *Genome Announcements*. 1. (6): 1085-1093.
- Senthilkumar M., Swarnlakshmi K., Govindasamy V., Lee Y. y Annapurna K. 2009. Biocontrol Potential of Soybean Bacterial Endophytes Against Charcoal Rot Fungus *Rhizoctonia Bataticola*. *Curr Microbiol*. 58: 288-293.
- Sinervo B. y Lively C. M. 1996. The Rock-Paper-Scissors Game and the Evolution of Alternative Male Strategies. *Nature*. 380. (6571): 240–243.
- Skinnider M.A., Johnston C.W., Gunabalasingam M. et al. 2020. Comprehensive Prediction of Secondary Metabolite Structure and Biological Activity From Microbial Genome Sequences. *Nat Commun*. 11. 6058.
- Solé R.V. y Bascompte L. 2006. *Self-Organization in Complex Ecosystems*. Princeton University Press, Princeton, NJ. 37.
- Souza V., Escalante A., Espinoza L. y Valera A. 2004. Cuatrociénegas, un Laboratorio Natural de Astrobiología. *Ciencias*. 75: 4-12.
- Souza V., Moreno A., Travisano M., Alcaraz L., Olmedo G. y Eguiarte L. 2018. The lost world of Cuatrociénegas Basin, a Relictual Bacterial Niche in a Desert Oasis. *eLife*. 7.
- Stachowicz J. 2001. Mutualism, Facilitation, and the Structure of Ecological Communities: Positive Interactions Play a Critical, but Underappreciated, Role in Ecological Communities by Reducing Physical or Biotic Stresses in Existing Habitats and by Creating New Habitats on which Many Species Depend. *BioScience*. 51. (3): 235–246.
- Stacy A., Everett J. y Jorth P. 2014. Bacterial Fight-and-Flight Responses Enhance Virulence in a Polymicrobial Infection. *Proc Natl Acad Sci*. 111. (7819).
- Steinborn G., Hajirezaei M.R. y Hofemeister J. 2005. Bac Genes for Recombinant Bacilysin and Anticapsin Production in *Bacillus* Host Strains. *Arch Microbiol* 183, 71–79.
- Stubbendieck R.M., y Straight P.D. 2016. Multifaceted Interfaces of Bacterial Competition. *Journal of Bacteriology*. 198. (16): 2145–2155.
- Van Bergeijk D.A., Elsayed S.S., Du C., Núñez-Santiago I., Roseboom A.M., Zhang L. Carrión V.J., Spaink H.P. y Van Wezel G.P. 2022. The Ubiquitous Catechol Moiety Elicits Siderophore and Angucycline Production in *Streptomyces*. *Commun Chem*. 5. 14.
- Van der Heijden M.G.A., Bardgett R.D. y Van Straalen N.M. 2008. The Unseen Majority: Soil Microbes as Drivers of Plant Diversity and Productivity in Terrestrial Ecosystems. *Ecol. Lett*. 11. 296–310.
- Van Elsas J., Chiurazzi M., Mallon C., Elhottova D., Kristufek V. y Salles J. 2012. Microbial Diversity Determines the Invasion of Soil by a Bacterial Pathogen. *Proc Natl Acad Sci*. 109: 1159-1164.
- Vetsigian K., Jajoo R. y Kishony R. 2011. Structure and Evolution of *Streptomyces* Interaction Networks in Soil and In Silico. *PLOS Biology*. 9. (12): e1001184

- Walker A.S. y Clardy J. 2021. A Machine Learning Bioinformatics Method to Predict Biological Activity from Biosynthetic Gene Clusters. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 61. (6). 2560-2571.
- Wawrik B., Kerkhof L., Zylstra G.J. y Kukor J.J. 2005. Identification of Unique Type II Polyketide Synthase Genes in Soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 71. 5: 2232-2238.
- Wei T., Yin y., Wen J. 2022. Increasing Fengycin Production by Strengthening the Fatty Acid Synthesis Pathway and Optimizing Fermentation Conditions. *Biochemical Engineering Journal*. 177. 108235. 369-703X.
- Weitz J.S., Wilhelm S.W., 2012. Ocean Viruses and Their Effects on Microbial Communities and Biogeochemical Cycles. *F1000 Biol Rep*. 4. (17).
- Wolaver B., Crossey L., Karlstrom K., Banner J., Cárdenas M., Ojeda C. y Sharp J. 2013. Identifying Origins of and Pathways for Spring Waters in a Semiarid Basin Using he, sr, and C isotopes: Cuatrociénegas basin, México. *Geosphere*. 9: 113-125
- Wolfgang L., Johannes S., Tschén M., Vanittanakom N., Kugler M., Knorpp E., Hsieh T-F. y Tene-Gene M.S. 1986. Antifungal Effects of Bacilysin and Fengymycin from *Bacillus subtilis* F-29-3 A Comparison with Activities of Other *Bacillus* Antibiotics. *Journal of Phytopathology*. 115. 3: 204-213.
- Wright E. S., y Vetsigian K. H. 2016. Inhibitory Interactions Promote Frequent Bistability Among Competing Bacteria. *Nature Communications*, 7.
- Wu L., Wu H. Chen L., Xie S., Zang H., Borriss R., Gao X. y Pettinari M. J. 2014. Bacilysin From *Bacillus Amylolyquefaciens* FZB42 has Specific Bactericidal Activity Against Harmful Algal Bloom Species. *Applied and Environmental Microbiology*. 80. 24: 7512-7520.
- Xia L., Miao Y., Cao A., Liu Y., Liu Z., Sun X., Xue Y., Xu Z., Xun W., Shen Q., Zhang N. y Zhang R. 2022. Biosynthetic Gene Cluster Profiling Predicts the Positive Association Between Antagonism and Phylogeny in *Bacillus*. *Nat Commun*. 13. 1023.
- Young I. y Ritz K. 1998. Can there be a contemporary ecological dimension to soil biology without a habitat? Discussion. *Soil Biol. Biochem*. 30: 1229-1232.
- Yu D., Xu F., Zeng J. y Zhan J. 2012. Type III Polyketide Synthases in Natural Product Biosynthesis. *IUBMB LIFE*. 64. 4: 285-295.
- Zapién-Campos R., Olmedo-Álvarez G., y Santillán M. 2015. Antagonistic Interactions are Sufficient to Explain Self-Assemblage of Bacterial Communities in a Homogeneous Environment: a Computational Modeling Approach. *Frontiers in Microbiology*. 6. (489).
- Zhang X., Liang Z., Siddiqui Z. A., Gong Y., Yu Z. y Chen, S. 2009. Efficient Screening and Breeding of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* for High Toxicity Against *Spodoptera Exigua* and *Heliothis Armigera*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. 36. 815-820.
- Zhao C., Luo Y., Song C., Liu Z., Chen S., Yu Z. y Sun M. 2007. Identification of Three Zwittermicin A Biosynthesis-Related Genes From *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* Strain YBT-1520. *Arch. Microbiol*. 187, 313-319.