



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

Facultad de Ciencias

Estudios de evolución experimental en  
microorganismos: análisis de la tolerancia al  
sulfuro en las cianobacterias *Microcystis*  
*aeruginosa* y *Oscillatoria* sp., y de la transición  
unicelularidad-pluricelularidad en la levadura  
*Kluyveromyces lactis*

Elena Martín Clemente

Noviembre 2020

Directores: María Jesús García Sánchez

Antonio Flores Moya


Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal

Programa Doctorado Diversidad Biológica y Medio Ambiente



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

AUTOR: Elena Martín Clemente

 <http://orcid.org/0000-0002-0365-6377>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): [riuma.uma.es](http://riuma.uma.es)



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



**UNIVERSIDAD DE MÁLAGA**

**Facultad de Ciencias**

**Estudios de evolución experimental en microorganismos:  
análisis de la tolerancia al sulfuro en las cianobacterias  
*Microcystis aeruginosa* y *Oscillatoria* sp., y de la transición  
unicelularidad-pluricelularidad en la levadura *Kluyveromyces  
lactis***

**TESIS DOCTORAL**

**Elena Martín Clemente**

**Programa Doctorado Diversidad Biológica y Medio Ambiente**

**Septiembre 2020**

**Directores: María Jesús García Sánchez**

**Antonio Flores Moya**

UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA





## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña ELENA MARTÍN CLEMENTE

Estudiante del programa de doctorado DIVERSIDAD BIOLÓGICA Y MEDIO AMBIENTE de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: ESTUDIOS DE EVOLUCIÓN EXPERIMENTAL EN MICROORGANISMOS: ANÁLISIS DE LA TOLERANCIA AL SULFURO EN LAS CIANOBACTERIAS MICROCYSTIS AERUGINOSA Y OSCILLATORIA SP., Y DE LA TRANSICIÓN UNICELULARIDAD-PLURICELULARIDAD EN LA LEVADURA KLUYVEROMYCES LACTIS

Realizada bajo la tutorización de ANTONIO FLORES MOYA y dirección de ANTONIO FLORES MOYA Y MARÍA JESÚS GARCÍA SÁNCHEZ (si tuviera varios directores deberá hacer constar el nombre de todos)

DECLARO QUE:

La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo.

Igualmente asumo, ante a la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse en caso de plagio de contenidos en la tesis presentada, conforme al ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a 29 de JUNIO de 2020

Fdo.: ELENA MARTÍN CLEMENTE



EFQM AENOR





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



Escuela de Doctorado

UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



EFQM AENOR



Edificio Pabellón de Gobierno. Campus El Ejido.  
29071  
Tel.: 952 13 10 28 / 952 13 14 61 / 952 13 71 10  
E-mail: doctorado@uma.es



D<sup>a</sup> MARÍA JESÚS GARCÍA SÁNCHEZ, Profesora Titular de Universidad, adscrita al Área de Fisiología Vegetal, y D. ANTONIO FLORES MOYA, Catedrático de Universidad, adscrito al área de Botánica de la Universidad de Málaga

### INFORMAN

Que el trabajo de investigación: **Estudios de evolución experimental en microorganismos: análisis de la tolerancia al sulfuro en las cianobacterias *Microcystis aeruginosa* y *Oscillatoria* sp., y de la transición unicelularidad-pluricelularidad en la levadura *Kluyveromyces lactis***, realizado por D<sup>a</sup> ELENA MARTÍN CLEMENTE bajo nuestra dirección en el Dpto. de Botánica y Fisiología Vegetal, se considera finalizado y puede ser presentado para su evaluación y defensa como Tesis Doctoral en el marco del Programa de Doctorado de Diversidad Biológica y Medio Ambiente de la Universidad de Málaga.

Málaga, 29 de junio de 2020

Fdo. Dra. D<sup>a</sup> María Jesús García Sánchez

Fdo. Dr. D. Antonio Flores Moya





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



La presente Tesis Doctoral ha sido desarrollada dentro del grupo de investigación de la Junta de Andalucía Biodiversidad, Conservación y Recursos Vegetales (RNM-0115) y ha sido financiada por los proyectos de investigación *Ecología evolutiva de cianobacterias de aguas sulfurosas: ¿cómo aparece la tolerancia al sulfuro?* (CGL2014-53682-P, Ministerio de Economía y Competitividad), y *Evolución rápida de cianobacterias y microalgas en escenarios de deterioro ambiental: Rescate evolutivo y papeles de la adaptación, el azar y la historia* (CGL2017-87314-P, Ministerio de Economía, Industria y Competitividad).

La doctoranda ha sido beneficiaria de una beca de Formación de Personal Investigador de la Secretaría de Estado de Investigación, Desarrollo e Innovación del Ministerio de Economía y Competitividad (BES-2015-072984). En el marco de esta beca, disfrutó de una ayuda para Estancias de investigadores de la Universidad de Málaga en centros de investigación de calidad, en concreto, en la Universidad de Minnesota (EEUU). Además, la doctoranda ha sido beneficiaria de una ayuda para contratos puente para doctores del Plan Propio de Investigación y Transferencia de la Universidad de Málaga.

Parte de los resultados incluidos en esta memoria han sido presentados en el 7th Congress of European Microbiologists, 26th Spanish Society for Microbiology (SEM; Julio 2017, Valencia, España); en el IGC Symposium 2018 Microbial Eco-Evolutionary Dynamics, Lisboa (Octubre 2018, Lisboa, Portugal); en el XXVII Congreso Nacional de Microbiología, (SEM, Julio 2019, Málaga, España) y en el VIII Congress of European Microbiologist, (Julio 2019, Glasgow, Escocia).

Parte de los resultados de esta Tesis se han publicado en la revista *Journal of Phycology*. Además, algunos aspectos de esta Tesis han formado parte de una segunda publicación en la revista *Water*:

Martín-Clemente, E., Melero-Jiménez, I. J., Bañares-España, E., Flores-Moya, A., García-Sánchez, M. J. (2019). Adaptation dynamics and evolutionary rescue under sulfide selection in cyanobacteria: a comparative study between *Microcystis aeruginosa* and *Oscillatoria* sp. (cyanobacteria). *Journal of Phycology*, 55(6): 1348 - 1360. DOI: 10.1111/jpy.12911

Reul, A., Martín-Clemente, E., Melero-Jiménez, I. J., Bañares-España, E., Flores-Moya, A., García-Sánchez, M. J. (2020). What Triggers the Annual Cycle of Cyanobacterium *Oscillatoria* sp. in an Extreme Environmental Sulfide-Rich Spa? *Water*, 12(3): 883. DOI:10.3390/w12030883

UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



“Gracias a la vida  
que me ha dado tanto...”

*Violeta Parra*  
*Artista chilena*

“Life did not take over the world by combat,  
but by networking”

*Lynn Margulis*  
*Científica estadounidense*

UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



## AGRADECIMIENTOS

Terminar de crear y escribir una Tesis Doctoral es un momento agrisulce. Durante años he fantaseado, con emoción, con escribir los agradecimientos, recordando a todas las personas que me han ayudado durante estos años. He pensado en mi familia, mis amigos, mis Directores... Confieso que estos años de investigación han sido los mejores de mi vida. He disfrutado trabajando, leyendo, escribiendo. Me lo he pasado fenomenal. He sido libre, y he sido muy feliz. Durante este proceso, he viajado y he conocido a personas ahora imprescindibles para mí. Y aunque no es fácil dejar ir la Tesis... Se ha acabado ir en bici a echar sulfuro!!

Espero no olvidar a nadie; aun así, que estas líneas sirvan para reconocer a todas las personas que han estado, de una u otra forma, presentes estos años.

Las primeras *gracias* son para María Jesús y Antonio, mis Directores de Tesis. No hay dos mejores personas para formarse en Ciencia, para aprender a trabajar desde la confianza y el respeto. Antonio, gracias gracias gracias gracias. Porque confiaste en mí en el Máster de Biología Evolutiva, y me diste esta oportunidad. Porque tienes toda la sabiduría, el talante y la calma del mundo para resolver dudas, proponer mejoras, solucionar problemas... Y con toda la disponibilidad del mundo. Han sido años trabajando juntos y ojalá que puedan ser muchos más. Y María Jesús... Qué te digo. Has sido la mejor directora, supervisora y jefa. Si me pongo a pensar en todo lo que he aprendido de ti, en todo el apoyo que me has dado, en todo lo que te has preocupado de cada paso que he dado... No me imagino a una persona con mejor preparación y bondad con la que sobrellevar estos años de Tesis. A los dos, millones de gracias!!

Ignacio, se quedaría corto decirte un “sin ti esto no habría sido posible”, porque es mucho más que eso. Has trabajado conmigo al 100%; me has aguantado en mis momentos insoportables, cuando me daban los nervios, el hambre, las ganas de irme, el cansancio, y sobre todo, la pesadez de echar sulfuro! De verdad, gracias mil por todo de corazón.

A todos mis compañeros del Departamento. Antonio Picornell, por tantos ratos compartidos, tantas charlas y tantas risas; Noelia, tan atenta y pendiente siempre, siempre tan comprensiva y positiva! Mamen, Raquel, Andrea, y Pepe, gracias por todo y por tener siempre una risa preparada para pasarlo bien!



Por supuesto, esta Tesis también es gracias a todos los profesores del Área de Botánica. Sobre todo, Elena Bañares, llena de experiencia y paciencia, gracias por enseñarme tanto! Qué habría hecho yo sin ti. Gracias por estar siempre ahí, por responder todas mis dudas, por sacar siempre tiempo, por sentarte conmigo tantas veces... A María, María del Mar, Andrés, Marta, Baltasar, Teresa, Rosa, José María, Enrique, Blanca y Alfredo, gracias por vuestra profesionalidad; habéis sido los mejores profesores. Todo lo que sé de algas y plantas ha sido gracias a vosotros.

A todos los profesores del Área de Fisiología Vegetal. En primer lugar, a Antonio Matas, porque con él empecé en Ciencia, y eso nunca se olvida. Siempre te lo voy a agradecer! A Luis Toscano, que no se puede ser más bonito y generoso. Por mantener siempre mis cositas preparadas y estériles, y por no querer venirte nunca a tomarte una cerveza conmigo. A Lourdes Rubio, por sus consejos llenos de sabiduría y alegría, su generosidad y sus palabras de aliento. Porque la centrífuga y el laboratorio de electrofisiología han sido mi tercera casa! Y por las risas que nos hemos echado. A Nieves, por estar siempre súper dispuesta a facilitarme la vida y a proporcionarme todo lo que he necesitado. A todos los chicos del laboratorio de Fisiología Vegetal, por darme todo el espacio necesario. Gracias.

A Andy Reul, del Área de Ecología, por ser tan currante y facilitarme siempre el trabajo. Por ser consciente, siempre, de todas las dificultades y estar siempre pendiente de mí!

A Miguel Hernández, del Departamento de Química Analítica, porque me ha enseñado de química, sulfuro y paciencia a partes iguales! Gracias por haberme prestado EL COLORÍMETRO, la herramienta que me ha permitido medir sulfuro todos los días y ha sido imprescindible para mí. Gracias Miguel!

A Conchi, del SCAI, porque el experimento de  $^{14}\text{C}$  fue gracias a ti, a tu profesionalidad y tu disponibilidad. Eres la mejor Conchi!

To Michael Travisano, from the University of Minnesota. Mike, you've been an essential person in this process. Since I arrived to Minneapolis, you've been the most generous, wise and patient supervisor ever!! You've not idea how much I've learned from you. And I still do! Thanks Mike!! And Will Driscoll, you helped me sooo much when I arrived, and you give me so many tips to manage in the lab, thanks! And everyone one there, Rodrigo, Noah, Nate, Pu... Thanks!

A Valeria Souza y Luis Eguiarte, de la Universidad Nacional Autónoma De México, por abrirme las puertas de su casa, por ser tan buenos maestros y sobre todo, por

permitirme conocer el paraíso de Cuatrociénegas. Que la vida nos mantenga cerca y sigamos conectados!

Y por supuesto, a mi familia... A mi madre, que me lo ha enseñado todo en la vida. La perseverancia, el trabajo, la bondad, la alegría, el sentido del humor... Lo tiene todo, y con todo me ha seguido y me ha apoyado toda la vida. Mamá, aunque suene a cliché, de verdad es que no sería quién soy, ni sería bióloga, ni habría llegado aquí sin ti. Gracias! A mi padre, que me ha inculcado el amor por la Ciencia y el conocimiento, por las plantas y la Biología. A mis hermanos M<sup>a</sup> Paz, Marta y Pablo, porque no se puede ser más granaínos, siempre estáis cerca, siempre me habéis apoyado, me habéis enseñado a reírme de mi misma y a mirar la vida con humor. A mis sobrinos, que conforme van creciendo me van recordando lo vieja que soy, y que son mi alegría.

A mis amigos, por tantas horas hablando de Ciencia, de la Tesis, del sulfuro, y que son mi otra familia, la que he ido eligiendo y formando a lo largo de los años. Rocío, eres mi hermana y mi mayor apoyo, y Andrés, os voy a necesitar toda la vida. A mis niñas, Candela, Mar, Mónica, Almu, Lore, Mel, Adela, Palo, por todo el amor, el apoyo, las charlas, los momentos compartidos. A Jorge, que siempre tiene tiempo y atención para mí. A Edu, David, Josele, Juan, Omar, Bruno, Fran gracias por tantas horas de risas, cervezas y de vida juntos.

Y me dejo para el final lo principal, mi compañero de vida. Guille, eres lo mejor de todos los hemisferios, el más grande de todos los continentes. Este es sólo uno de los pasos que daremos durante la vida. Y LO QUE NOS QUEDA WEÓN!!!



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



*A mi madre*  
*A Guillermo*

UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



# ÍNDICE

---



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



	<b>Página</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>I</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>V</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>IX</b>
<b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
I.1. Teoría de la Evolución	3
I.2. Microorganismos como organismos modelo en Evolución Experimental	7
I.3. Estudio del origen y evolución de la fotosíntesis oxigénica y la pluricelularidad: el papel de las cianobacterias	11
<i>I.3.1. Papel del H<sub>2</sub>S en el origen de la fotosíntesis oxigénica en cianobacterias</i>	12
<i>I.3.2. Origen y evolución de la pluricelularidad</i>	15
I.4. Antecedentes, hipótesis de partida y objetivos	17
<i>I.4.1 Objetivos</i>	18
 <b>CAPÍTULO II. DINÁMICA DE LA ADAPTACIÓN, RESCATE EVOLUTIVO Y FOTOSÍNTESIS BAJO SELECCIÓN POR SULFURO EN CIANOBACTERIAS: UN ESTUDIO COMPARATIVO DE LA TOLERANCIA AL SULFURO EN <i>MICROCYSTIS AERUGINOSA</i> Y <i>OSCILLATORIA SP.</i></b>	 <b>19</b>
II.1. INTRODUCCIÓN	21
II.2. MATERIALES Y MÉTODOS	33
II.2.1. Recolección de muestras y caracterización del manantial de La Hedionda	33
<i>II.2.1.1. El manantial de los Baños de la Hedionda</i>	33
<i>II.2.1.2. Medidas de pH, concentración de sulfuro y concentración de iones en las aguas de La Hedionda</i>	34
<i>II.2.1.3. Recolección de muestras de agua La Hedionda y caracterización de la comunidad fitoplanctónica</i>	35
II.2.2. Química del sulfuro [H <sub>2</sub> S, HS <sup>-</sup> , S <sup>2-</sup> ]	36
<i>II.2.2.1. Cuantificación de la concentración de sulfuro total</i>	38

II.2.2.2. Preparación de soluciones madre de sulfuro	39
II.2.2.3. Control de la concentración de sulfuro	40
II.2.2.4. Vida media del sulfuro en las condiciones de experimentación utilizadas	41
II.2.3. Organismos de estudio, condiciones de cultivo y cálculo de las tasas de crecimiento	44
II.2.3.1. Organismos utilizados y condiciones de cultivo	44
II.2.3.1.1. Aislamiento de <i>Oscillatoria sp.</i>	44
II.2.3.2. Cálculo de la tasa de crecimiento de los cultivos	45
II.2.3.3. Rectas patrón para la determinación de la concentración celular de <i>M. aeruginosa</i>	46
II.2.3.4. Tasa de crecimiento en función de la irradiancia	46
II.2.4. Prueba de toxicidad: efecto del sulfuro en la tasa de crecimiento de las cepas silvestres de <i>M. aeruginosa</i> y <i>Oscillatoria</i>	47
II.2.5. Diseño experimental	49
II.2.5.1. Estudio de los aspectos evolutivos de la aparición de la tolerancia al sulfuro	49
II.2.5.1.1. Análisis de fluctuación de la transformación de la sensibilidad a la resistencia a las aguas sulfurosas de La Hedionda en <i>M. aeruginosa</i>	49
II.2.5.1.2. Estimación de la máxima resistencia al sulfuro de <i>M. aeruginosa</i> y <i>Oscillatoria sp.</i>	53
II.2.5.1.3. Aclimatación vs. adaptación como mecanismo de tolerancia	56
II.2.5.1.4. Rescate evolutivo bajo selección por sulfuro en <i>M. aeruginosa</i> : efecto de la dispersión y de la tasa de deterioro	57
II.2.5.2. Estudio del coste de la resistencia al sulfuro de las cepas resistentes en términos de crecimiento, fotosintéticos y morfológicos	60
II.2.5.2.1. Condiciones de cultivo de las cepas resistentes a sulfuro	60
II.2.5.2.2. Crecimiento de las cepas resistentes	

<i>en condiciones no selectivas y en presencia de sulfuro</i>	60
<i>II.2.5.2.3. Tasa de fotosíntesis de las cepas silvestres y resistentes en ausencia de sulfuro. Medida de la producción de oxígeno</i>	61
<i>II.2.5.2.4. Composición pigmentaria de las cepas silvestres y resistentes. Cuantificación de pigmentos fotosintéticos</i>	62
<i>II.2.5.2.5. Contenido de carbono y nitrógeno total en las cepas silvestres y resistentes</i>	64
<i>II.2.5.2.6. Biovolumen celular de M. aeruginosa y distribución de tamaños de los agregados de Oscillatoria sp.</i>	64
<i>II.2.5.3. Estudio de las características fotosintéticas de las cepas silvestres y resistentes en presencia de sulfuro</i>	65
<i>II.2.5.3.1. Rendimiento cuántico máximo del PSII y tasa de transporte de electrones</i>	65
<i>II.2.5.3.2. Fotoincorporación de <math>\text{NaH}^{14}\text{CO}_3</math></i>	67
2.6. Análisis estadístico	69
II.3. RESULTADOS	71
II.3.1. Caracterización del manantial de La Hedionda	71
<i>II.3.1.1. Concentración de sulfuro total, iones y principales nutrientes</i>	71
<i>II.3.1.2. Microorganismos fotosintéticos y abundancia de Oscillatoria sp.</i>	73
II.3.2. Caracterización de las cepas silvestres de M. aeruginosa y Oscillatoriasp.	75
<i>II.3.2.1. Tasa de crecimiento en función de la irradiancia</i>	75
<i>II.3.2.2. Efecto del sulfuro en la tasa de crecimiento</i>	77
II.3.3. Aspectos evolutivos de la tolerancia al sulfuro en M. aeruginosa	79
<i>II.3.3.1. Análisis de fluctuación de la transformación de la sensibilidad a la resistencia de M. aeruginosa a las aguas sulfurosas de la Hedionda</i>	79



II.3.3.2. Límite de resistencia al sulfuro de <i>M. aeruginosa</i> y <i>Oscillatoria</i>	80
II.3.3.2.1. Mecanismo de tolerancia: aclimatación vs. adaptación	85
II.3.3.3. Rescate evolutivo bajo selección por sulfuro en <i>M. aeruginosa</i> : efectos de la dispersión y de la tasa de deterioro ambiental	86
II.3.4. Coste de la tolerancia al sulfuro en las cepas resistentes en términos de crecimiento, fotosintéticos y morfológicos	89
II.3.4.1. Tasa de crecimiento de las cepas resistentes en ausencia y presencia de sulfuro	89
II.3.4.2. Tasa de fotosíntesis en ausencia de sulfuro	92
II.3.4.3. Contenido de pigmentos fotosintéticos	96
II.3.4.4. Volumen celular de <i>M. aeruginosa</i> y distribución de tamaños de agregados celulares en <i>Oscillatoria</i>	98
II.3.4.5. Contenido en C, en N, y relación C:N	99
II.3.5. Caracterización fotosintética de las cepas silvestres y resistentes en presencia de sulfuro	99
II.3.5.1. Rendimiento cuántico máximo del PSII	99
II.3.5.2. Tasa de transporte de electrones (ETR)	102
II.3.5.3. Fotoincorporación de CO <sub>2</sub>	107
II.4. DISCUSIÓN	109
II.4.1. Dinámica de la adaptación y rescate evolutivo bajo selección por sulfuro	109
II.4.1.1. Adaptación de <i>M. aeruginosa</i> a las aguas de los Baños de La Hedionda	111
II.4.1.2. Rescate evolutivo en poblaciones de <i>M. aeruginosa</i> en condiciones letales de sulfuro	112
II.4.1.3. Límite de tolerancia al sulfuro de <i>M. aeruginosa</i> Y <i>Oscillatoria sp.</i>	115
II.4.2. Coste fisiológico de la tolerancia al sulfuro	118
II.4.2.1. Crecimiento y fotosíntesis en condiciones no selectivas	118

II.4.2.2. <i>Contenido pigmentario, C y N total y morfología celular</i>	120
II.4.3. Fotosíntesis en presencia de sulfuro: tolerancia del PSII, ETR y fijación de <sup>14</sup> C	124
II.4.4. Aspectos eco-evolutivos de la resistencia al sulfuro en <i>Oscillatoria</i>	131
II.4.5. Conclusiones	133
<b>CHAPTER III. ANALYSIS OF THE UNICELLULARITY-MULTICELLULARITY TRANSITION ON THE BUDDING YEAST <i>KLUYVEROMYCES LACTIS</i></b>	135
III.1. INTRODUCTION	137
III.1.1. Major transitions events in evolution	137
III.1.2. The origin of multicellularity	138
III.1.3. The opportunity of evolutionary reversal to unicellularity	141
III.1.4. An experimental perspective on the origin and reversion of multicellularity	142
III.2. MATERIAL AND METHODS	145
III.2.1. Strains characteristics and culture conditions	145
III.2.2. Experimental design	148
III.2.2.1. <i>Effect of selection pressure and genetic diversity on the transition towards multicellularity and its reversal</i>	148
III.2.2.2. <i>Competition and coexistence among strains</i>	151
III.3. RESULTS	153
III.3.1. Unicellular evolution towards multicellularity	154
III.3.2. Reversal to unicellularity in multicellular cultures	155
III.3.3. Changes on size distribution	156
III.3.3.1. <i>Changes on size distribution in the unicellular to multicellular transition</i>	156
III.3.3.2. <i>Change on the distribution of sizes in the multicellular to unicellular transition</i>	158
III.3.4. Colonization rate under favourable selection as invader	160
III.4. DISCUSSION	162
<b>CONCLUSIONS</b>	167
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	173

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	213
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	217
<b>ANEXO: PUBLICACIONES</b>	221

# ABREVIATURAS

---



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



---

$a^*$	Absorptancia
ALH	Agua de La Hedionda
Chl <i>a</i>	Clorofila a
CT	Carotenoides totales
DCMU	3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea
DEE	Diámetro esférico equivalente
ETR	Tasa de transporte de electrones
ETR <sub>max</sub>	Tasa de transporte de e <sup>-</sup> máxima
FC	Ficocianina
FE	Ficoeritrina
$F_v/F_m$	Eficiencia cuántica máxima del fotosistema II
<i>I</i>	Irradiancia
$I_{0,5}$	Constante de semisaturación para la luz
$I_c$	Irradiancia de compensación
<i>m</i>	Tasa de crecimiento
$m^f$	Tasa de crecimiento de células resistentes al sulfuro
$m^s$	Tasa de crecimiento de células sensibles al sulfuro
<i>PF</i>	Peso fresco
PQ	Cociente fotosintético
PSI	Fotosistema I
PSII	Fotosistema II
<i>q</i>	Frecuencia de alelos resistentes en poblaciones salvajes
RE	Rescate evolutivo
RubisCo	Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa
<i>s</i>	Coefficiente de selección
$t_{1/2}$	Vida media
TFN	Tasa de fotosíntesis neta
TFN <sub>max</sub>	Tasa máxima de fotosíntesis neta
TR	Tasa de respiración
$\alpha^{ETR}$	Eficiencia fotosintética estimada por la tasa de transporte de e <sup>-</sup>
$\alpha^{TFN}$	Eficiencia fotosintética estimada por la producción de O <sub>2</sub>
$\sigma$	Desviación estándar
$\mu$	Tasa de mutación

UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



# RESUMEN

---





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



En el marco de la Biología Evolutiva, la Evolución Experimental permite la comprobación de postulados mediante experimentos repetibles y controlados. En este estudio se han aplicado diferentes enfoques de Evolución Experimental para arrojar luz sobre el proceso de adaptación del sulfuro en cianobacterias, así como sobre los primeros pasos en la consecución de la pluricelularidad en levaduras.

La adaptación al sulfuro desempeñó un papel clave en la evolución de las cianobacterias, ya que la aparición de la fotosíntesis oxigénica ocurrió en un medio rico en H<sub>2</sub>S. Así, el que este compuesto haya influido en los estadios iniciales de la evolución de la fotosíntesis oxigénica podría explicar el hecho de que, hoy en día, algunas cianobacterias pueden proliferar en ambientes sulfurosos. Para el estudio se han usado tres cepas de la cianobacteria sensible al sulfuro *Microcystis aeruginosa*, incapaces de crecer por encima de ~ 0,1 y 0,2 mM de sulfuro, y una cepa presente en aguas sulfurosas del género *Oscillatoria*, aislada de una surgencia sulfurosa (~ 0,2 mM sulfuro total). En primer lugar, y realizando un diseño de análisis de fluctuación usando las aguas de los baños sulfurosos como agente selectivo, demostramos que *M. aeruginosa* se adaptó a este nivel de sulfuro. En segundo lugar, aplicando un protocolo de trinquete, se observó que dos de las tres cepas *M. aeruginosa* llegaron a soportar una concentración máxima de 0,4 mM sulfuro mediante un proceso adaptación, mientras que *Oscillatoria* sp. llegó a sobrevivir bajo una concentración de ~ 2 mM de sulfuro por un proceso de aclimatación, cuando su tolerancia máxima inicial fue de 0,9 mM sulfuro. Es decir, el límite máximo de resistencia al sulfuro dependió de la tolerancia inicial a este compuesto. En tercer lugar, utilizando un enfoque de rescate evolutivo, observamos que tanto la tasa de deterioro del medio (velocidad a la que aumentó la concentración de sulfuro) como la variabilidad genética de las poblaciones determinaron la supervivencia de *M. aeruginosa* a niveles letales de sulfuro, con una mayor dependencia de la diversidad genética. Para determinar el coste fisiológico de la adaptación y el posible mecanismo de tolerancia al sulfuro, se aislaron las cepas que mostraron la máxima tolerancia a este compuesto. La cepa resistente de *M. aeruginosa* presentó un coste fisiológico asociado a la mutación que confiere resistencia a sulfuro, en términos de un menor crecimiento y tasa de fotosíntesis máxima en ausencia de este agente selectivo. Además, presentó un menor tamaño y, en general, un menor contenido de pigmentos. Por su parte, la cepa resistente a 2 mM derivada de *Oscillatoria* sp. presentó, en general, un menor contenido de pigmentos y una

ligera disminución del crecimiento en ausencia de sulfuro; sin embargo, no se detectaron diferencias entre las dos cepas desde el punto de vista fotosintético.

Para determinar el mecanismo de tolerancia de las cepas resistentes, se analizó la resistencia del PSII al sulfuro y la capacidad de realizar fotosíntesis anoxigénica. La tolerancia de dicho fotosistema fue mayor en la cepa resistente de *Oscillatoria*, seguida de la cepa silvestre, mientras que las cepas resistente y silvestre de *M. aeruginosa* mostraron una tolerancia menor. Es decir, se observó una relación entre la tolerancia del PSII y el medio del que procedían las cepas. Por otra parte, no se observó la capacidad de realizar fotosíntesis anoxigénica dependiente de sulfuro en ninguna de las cepas, lo que sugiere que los mecanismos de tolerancia de *Oscillatoria* estarían ligados a la resistencia del PSII a la presencia del sulfuro. De hecho, se observó que el sulfuro estimulaba el crecimiento de *Oscillatoria*, tanto en el laboratorio como en su medio natural.

Se concluye que la supervivencia en medios sulfurosos de las cianobacterias sensibles al sulfuro es posible a través de mutaciones espontáneas, y que los límites de tolerancia dependen del nivel de sulfuro presente en el hábitat original de la cepa. Además, la alta diversidad genética presente en poblaciones sensibles al sulfuro podría asegurar su supervivencia incluso a un estrés por sulfuro severo.

Para analizar la transición unicelularidad-pluricelularidad, se estudió la influencia de la variabilidad genética y la presión selectiva en la ganancia y pérdida del carácter pluricelular en una cepa de la levadura *Kluyveromyces lactis*, que presentaba dos morfotipos constitutivos: uno unicelular y otro pluricelular. Se observó que la transición a la pluricelularidad era posible independientemente del nivel de diversidad genética de las poblaciones, siempre y cuando la presión selectiva favoreciera la selección del morfotipo pluricelular. Sin embargo, en los cultivos pluricelulares, tanto la diversidad inicial de la población como la presión selectiva condicionaron la aparición del morfotipo unicelular, que se observó incluso cuando la presión de selección favorecía el morfotipo pluricelular. Además, la alta tasa de crecimiento del morfotipo unicelular permitió una colonización rápida de un ambiente dominado por las formas pluricelulares; sin embargo, la tasa de colonización del morfotipo pluricelular, en un ambiente unicelular, fue mucho más baja. Se concluye que la evolución hacia organismos pluricelulares a partir de unicelulares podría haber estado determinada por la presión selectiva, mientras que el proceso de reversión sería más dependiente de la diversidad genética que su ganancia.

# SUMMARY

---



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



Cyanobacteria form a monophyletic Phylum within the Bacteria Kingdom, being the only group on this Kingdom that is capable of oxygenic photosynthesis. They are considered one of the oldest lineages on Earth, which appeared ~ 2.4 billion years ago. Its age has been estimated by molecular-phylogenetic analyses (Cavalier-Smith, 2006; Tomitani et al., 2006), studies based on the evolution of the O<sub>2</sub> levels on atmosphere (Bekker et al. 2004) and paleontological records (Schopf, 1993; Knoll, 2003). Thereby, their photosynthetic ancestors are estimated to have evolved approximately 3.5–2.3 billion years ago (Drews, 2011) when O<sub>2</sub> levels were much lower than at present times. Moreover, there is a consensus that chemosynthesis preceded phototrophy in microbial evolution, and that anoxygenic photosynthesis predated the oxygenic photosynthesis form.

In almost all cyanobacteria, oxygenic photosynthesis light reactions occur in thylakoids, internal membranes forming a closed compartment within the cell that contains both respiratory and photosynthetic electron transport chains. In this sense, cyanobacteria possess a more sophisticated internal structure, with some cell membranes, comparing to other bacteria (Flores & Herrero, 2014). Besides, these organisms display a great variety of forms, being uni, multicellular or filamentous, and forming one of the most diverse groups within the Bacteria Kingdom (Castenholz et al., 2001).

Sanchez-Baracaldo et al. (2005) stated that the earliest cyanobacterial lineages were likely unicellular organisms that lived on terrestrial or freshwater environments. Besides, they suggest that cyanobacterial lineages independently gained the ability to colonize other extreme environments through the acquisition of a large number of more complex traits, being the use of sulphide as an electron donor, and the multicellular filamentous forms two of them. These adaptations would be among the most important evolutionary achievements linked to the appearance of dense microbial mats early in Earth's history (Schirrmeister et al., 2013; Dick et al., 2018). In this sense, the use of sulphide as an electron donor and the multicellular filamentous forms are linked to two of the most relevant events in the history of life: the emergence of oxygenic photosynthesis (Schopf, 1999, 2011) and the emergence of multicellular organisms from unicellular ancestors (Travisano, 2009; Ratcliff et al., 2012; Driscoll & Travisano, 2017).

In fact, it has been stated that cyanobacteria tolerance to sulfide varies within the group (Miller & Bebout, 2004), because this compound is a potent biocide and photosynthesis inhibitor (Bagarinao, 1992). While cyanobacteria living on sulphide-free



environments are extremely sensitive to very low levels of sulfide, populations that proliferate in sulfurous habitats show some metabolic adaptations to survive to this compound (Cohen et al., 1986; Miller & Bebout, 2004). These adaptations, which normally imply photosynthetic resistance to sulphide, allow cyanobacteria to avoid its toxic effect. Previous studies support the fact that strains isolated from environments where sulfide is not present are extremely sensitive to very low levels ( $< 0.1$  mM; Cohen et al., 1986), whereas those isolated from sulfurous habitats display some adaptations to overcome the toxic effect of sulfide. These adaptations allow the maintenance of oxygenic photosynthesis through the resistance of PSII (Castenholz, 1977; Cohen et al., 1986; Dodds & Castenholz, 1990, Miller & Bebout, 2004), or rely on the capacity of performing anoxygenic photosynthesis, with sulfide as an electron donor to PSI (Cohen et al., 1975a,b, 1986; Hamilton et al., 2016; Leister, 2017; Walter et al., 2017). Actually, Cohen et al. (1986) proposed four different types of adaptations to sulfide among cyanobacteria, founded on the degree of toxicity to sulfide of PS II and PS I: (i) cyanobacteria which only can perform sulfide-sensitive oxygenic photosynthesis; (ii) those which possess sulfide-resistant oxygenic photosynthesis; (iii) those which can perform sulfide-resistant oxygenic photosynthesis simultaneously with sulfide-dependent anoxygenic photosynthesis; and (iv) those which have sulfide-sensitive oxygenic photosynthesis that is substituted by sulfide-dependent anoxygenic photosynthesis when sulfide reaches certain level. Interestingly, it has been proposed that the ability to tolerate sulfide in cyanobacteria is a characteristic that can appear or be lost relatively quickly, since it is a polyphyletic character within the group (Miller & Bebout, 2004; Sánchez-Baracaldo et al., 2005).

Cyanobacteria are supposed to have experienced an explosive evolutionary radiation (Garcia-Pichel et al., 1998), since a greater part of extant clades evolved abruptly after the increase of atmospheric oxygen (Ferris et al., 1996). Nevertheless, very little is known about the physiology, ecology and evolutionary processes of the first multicellular-like organisms (Herron & Michod, 2008; Ratcliff et al., 2012). Experimental studies suggest that multicellularity should have evolved relatively quickly after its origin, since it is possible to observe the transition from unicellularity to pluricellularity given the appropriate selective conditions (Ratcliff et al., 2012). In addition to the increase in size, multicellular organisms display a greater complexity, as a consequence of the formation of new biological structures (Ratcliff et al., 2012). Thus,



the arrival and development of an incipient multicellularity provided many benefits, like reducing predation (Maynard-Smith & Szathmáry, 1995) or division of labor (Michod, 2007). However, the evolution of increased complexity and the formation of multicellular complexes from single cells involved such numerous genetic changes that the reversion of this trait could be very improbable (Muller, 1939; Bull & Charnov, 1985; Rebolleda-Gómez & Travisano, 2018, 2019). In this sense, it is necessary to differentiate between the mechanisms that allowed the origin of multicellularity, and those that maintain it, since cells that make up an incipient multicellular organism could follow non-cooperative strategies (Ratcliff et al., 2012). Although it would be of great interest to study the origin and maintenance of multicellularity in cyanobacteria, there is already a deep background in this field using budding yeasts as model organisms to address the study of how the first undifferentiated multicellular aggregates arose.

One way to explore evolutionary processes like the mentioned above, i.e., the appearance of sulfide tolerance or the origin of multicellularity, is the Experimental Evolution approach, using microorganisms as a model species in the laboratory (Elena & Lenski, 2003). Microorganisms display a large number of advantages in experimental evolution experiments (Elena & Lenski, 2003), among others: (i) they are easy to propagate; (ii) they usually have a high growth rate, allowing experiments to be carried out with many generations; (iii) large populations can be cultivated in moderately small spaces, enabling as many biological replicates as needed; (iv) many microorganisms reproduce asexually, so the source of variation relies exclusively on random mutations; and (v) the establishment of environmental variables is easier, as well as the modification of environmental conditions and ecological resources.

In a previous work, our research group, using an experimental evolution approach (fluctuation analysis), demonstrated that the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* strain Ma1G, from non-sulfurous waters, was able to adapt quite quickly to the sulfurous waters of Los Baños del Vilo (Periana, Málaga, ~ 0.24 mM total sulfide) through preselective mutations allowing adaptation (Fenández-Arjona et al., 2013). Considering that, we hypothesize that other strains of *M. aeruginosa* could be able to thrive in La Hedionda waters through mutations conferring resistance, i.e., by adaptation.

Natural populations exposed to environmental pressure through an abrupt stress (like an increase in sulfide levels) may go extinct, unless they recover through natural selection, a process named as “evolutionary rescue” (ER). It is known that ER could





depend on the previous eco-evolutionary history (Gonzalez et al., 2013), being the speed of environmental deterioration (the rate at which the selection pressure increases) and the genetic variability two factors that could modulate the probability of ER. In fact, in bacterial and yeast populations submitted to environment deterioration in the laboratory, it has been found that the highest the genetic variation, the highest the possibility of ER events, and that the rate at which selective pressure increases is inversely proportional to the ability to proliferate in lethal conditions (Bell & Gonzalez, 2011; Lindsey et al., 2013). Moreover, it should be noted that, in the recent field of research based on the use of microorganisms to study ER, most of them have been performed with viruses, bacteria, yeasts and microalgae (Elena & Lenski 2003; Garland & Rose, 2009; Bell, 2012; Lachapelle & Bell, 2012; Baselga-Cervera et al., 2016). However, this ER scenario has never been simulated before in cyanobacteria, and it has not, therefore, been analyzed using sulfide as a selective agent, a compound with remarkable eco-evolutionary implications for this group of microorganisms.

The limit of tolerance to sulfide can be explored using another experimental evolution tool, the ratchet experiment (Reboud et al., 2007). In this sense, it is possible to obtain strains that proliferate at the maximum selection pressure, i. e., at high levels of sulfide. On the other hand, it is possible that these resistant cells exhibit a physiological cost of the mutation that confers resistance to sulfide, that could be observed by lower growth rates and photosynthetic performance in no selective conditions i.e., in sulfide-free media (Lenski, 1998; Andersson & Levinn, 1999; Coustau et al., 2000; Costas et al., 2001; López-Rodas et al., 2007, 2008). Moreover, the photosynthetic characterization of different strains in the presence of sulfide would allow us to shed light on the mechanisms that confer sulfide resistance. It is known that the tolerance to sulfide in cyanobacteria depends on the previous evolutionary history (Miller & Bebout, 2004), so the maximum tolerance to this compound should be higher in strains isolated from sulfurous waters than in strains isolated from sulfide-free environments. In this sense, Flores-Moya et al. (2005) detected the presence of the cyanobacterium *Oscillatoria* sp. on a sulfurous spa with a sulfide level ~ 0.2 mM (La Hedionda, Casares, Málaga) which is well known as a sulfide-resistant genus (Oren, 1978; Miller & Bebout, 2004; Myers & Richardson, 2009; Grim & Dick, 2016; Belkin & Padan, 1983). This resistance could rely on the photosynthetic characteristics related to PSII sulfide tolerance (Miller & Bebout, 2004) or the capacity to use hydrogen sulfide as an electron donor in photosynthesis

(Myers & Richarson, 2009) in the case of *Oscillatoria* sp., as anoxygenic photosynthesis has been observed in some species of the genus.

Several experimental evolution approaches also allow us to study the evolution of multicellular lineages from unicellular ancestors in laboratory populations, improving our understanding of how multicellularity first evolved in nature (Ratcliff et al., 2012, 2013; Rebolleda-Gómez et al., 2012; Ratcliff & Travisano, 2014; Pentz et al., 2014). In this sense, Driscoll & Travisano (2017) used the budding yeast *Kluyveromyces lactis* as model organism, and settling selection as selection pressure (leading to the preferential survival of larger particles) as an ecological scenario to evolve multicellularity in the laboratory. However, experimental studies have been mainly focused on the appearance of multicellularity, rather than on their maintenance and reversal. Nevertheless, it is possible to simulate different types of selection, against or in favor of the development of multicellular morphotypes to analyze the achievement of multicellularity (Driscoll & Travisano, 2017; Rebolleda-Gómez & Travisano, 2019). It is also possible to found populations with different degree of genetic variability, influencing the evolutionary transition from single-cells to multicellular organisms (Maynard-Smith & Szathmáry, 1995; Michod, 1997; Bourke, 2011; Muraille, 2018). Besides, testing the capacity of each phenotype (uni- and multicellular) to colonize a foreign landscape (mainly composed by the opposite phenotype) can help us to determine the contribution of selection to the persistence of unicellular lineages in competition with multicellular competitors (Driscoll & Travisano, 2017).

Thereby, the main objective of this Thesis was double: on one hand, to analyze the appearance of sulfide tolerance in cyanobacteria showing different sensitivity to this compound (*M. aeruginosa* vs. *Oscillatoria*), analysing the evolutionary and physiological processes involved, and on the other hand, to study the origin of multicellularity, analysing how selection pressure and genetic diversity could affect the reversal of this character, using yeast as a model organism. Thus, this Thesis was divided into three chapters: an introduction (Chapter I) and two additional chapters, each one committed to one of the main objectives. Chapter II addressed four specific objectives: (i) to determine the adaptation capacity of *M. aeruginosa* to the sulfurous La Hedionda waters, and the ER dynamics of this species in the presence of sulfide; (ii) to estimate the maximum tolerance of *Oscillatoria* sp. and *M. aeruginosa* to sulfide, identifying the mechanism (acclimation vs. adaptation) involved in such resistance; (iii) to evaluate the cost of



sulfide resistance in morphological, photosynthetic and growth terms in both species; and (iv) to analyze the photosynthetic characteristics of wild and resistant strains in the presence of sulfide, identifying their possible tolerance mechanism. In addition, Chapter III addressed two specific objectives: (i) to analyze the effect of different types of selective pressure and different levels of genetic diversity, and their interaction, on the achievement and loss of multicellularity in *K. lactis*; and (ii) to study the effect of competition between unicellular and multicellular morphotypes of *K. lactis* on the gain and loss of the multicellular character.

In this investigation, we used three *M. aeruginosa* sulfide-sensitive strains, named as Ma1Vc, Ma5Vc and MaAVc, gently provided by the Veterinary School Algal Culture Collection, Complutense University (Madrid, Spain). These strains were isolated from sulphide-free waters, so it was expected that both growth and photosynthetic performance would be inhibited at low sulfide concentrations (Castenholz, 1977; Cohen et al., 1986, Garcia-Pichel & Castenholz, 1990). In fact, we observed that these strains were unable to grow at sulfide concentrations  $\sim 0.1$  mM (strain Ma1Vc) and  $\sim 0.2$  mM total sulfide (strains Ma5Vc and MaAVc; Fig. II.13). In addition, we studied an *Oscillatoria* strain, that we isolated from La Hedionda waters (LHW), named as O1LH, which was able to grow, although at low rates, till sulfide concentrations around 0.9 mM (Fig. 14). In fact, this strain showed maximum growth rates at total sulfide concentrations between 0.1 - 0.35 mM (Fig. II.14).

To address if the *M. aeruginosa* strain Ma1Vc was able to survive under the lethal sulfide levels of La Hedionda (above 0.1 mM total sulfide), and the possible mechanism involved (adaptation vs. acclimation), we performed a fluctuation analysis experiment, initially described by Luria & Delbrück (1943), modified to be used with liquid cultures (Costas et al. 2007, 2008; López-Rodas et al. 2007; Fig. II.5). For this purpose, two sets of experimental cultures were prepared from a genetically identical parental culture. Set 1 consisted of 90 independent cultures inoculated with a cell number small enough so it could be assumed that there were no pre-existing mutants. The cells were grown in non-selective conditions for two weeks (propagation period). After that, LHW was added to the tubes (selective conditions). Cultures were maintained for 6 weeks under selective conditions, thus ensuring that at least one mutant cell resistant to LHW could generate enough progeny for the population to be detected. Set 2 consisted of 40 aliquots of a high concentration culture from the parental population, grown directly in LHW for 3 weeks.



Set 2 is used as a control of the fluctuation analysis: a similar number of resistant cells between replicates should imply a small experimental error. When performing a fluctuation analysis, two possible results can be obtained, each interpretable as the independent consequence of two different resistance phenomena (Fig. II.5). If resistant cells arose after exposure to LHW by acclimation, the variance in the number of cells per culture would be low, because all replicates had the same probability of developing resistance to LHW. On the contrary, if resistant cells appeared due to mutations that arise before exposure to the selective agent, the number of resistant cells between cultures would show a high variance. In addition, another result can be obtained as well: no resistant cells in the cultures, which would point out that neither the selection of spontaneous mutations, nor acclimation during exposure to LHW, occurred. Once the experiment was finished we observed the presence of resistant cells and we could conclude that LHW-resistant cells arose by preselective mutations, rather than by acclimation (Table II.3). Indeed, it is an accepted fact that when the selective conditions or stress level do not exceed the limits of physiological tolerance, survival arises as a result of acclimation, through modifications in the genotype expression (Bradshaw & Hardwick, 1989). However, once the level of stress exceeds the physiological limit, survival depends on adaptation through mutations that confer resistance (Sniegowski & Lenski 1995; Flores-Moya et al., 2005; Sniegowski, 2005; Costas et al., 2007; López-Rodas et al., 2008a,b). Consequently, we estimated a spontaneous mutation rate ( $\mu$ ) of LHW-sensitive cells to resistant cells of  $2.1 \times 10^{-7}$  mutant cells per generation. We also estimated the frequency of LHW-resistant alleles in the absence of the selective agent, being  $9.4 \times 10^{-7}$ . That means that, among  $10^6$  wild cells, almost one LHW-resistant cell could be found in wild populations of *M. aeruginosa*.

It must be taken into account that previous evolutionary studies were usually performed under a homogeneous eco-evolutionary scenario (i.e., all the experimental culture cells were found from inocula having a similar history, and exposed to a similar selection pressure). However, it is known that evolutionary processes are contingent, closely dependent on the previous history (Gould, 1989; Travisano et al., 1995; Blount et al., 2008; Flores-Moya et al. 2008, 2012). In this sense, we found interesting to analyze the adaptation process to lethal sulfide levels, and avoidance of extinction, in a scenario of abrupt ecological changes (i. e., ER). The question would be how population adaptation to lethal and abrupt sulfide exposure could be affected by population dispersal



(or genetic variation) and the rate of ecosystem deterioration (different rates of sulfide concentration increase). Thus, an ER protocol was carried out using the wild *M. aeruginosa* strain Ma1Vc, following Bell and González (2011; Fig. II.7). We imposed nine different conditions, consisting of combinations of three environmental deterioration speeds (control -no deterioration-, slow or fast deterioration rates) and three dispersal modes to simulate three different levels of genetic diversity (control -no dispersal-, local or global dispersal; Fig. II.7). Cultures under each treatment were subjected to four sulfide stress gradients, which included four increasing sulfide concentrations per gradient, increasing 30  $\mu\text{M}$  each time. To simulate the three different environmental deterioration speeds, cultures were transferred to the next sulfide gradient at different rates. Populations were transferred to the next gradient every 4 or every 2 weeks in the slow and fast environmental deterioration treatments, respectively. Finally, every replicate was cultivated under lethal conditions for 4 weeks (lethal situation where ER could occur), calculating the growth rate value ( $m$ ) of every culture before and after the lethal situation. To mimic the three dispersal modes all cultures (from all deterioration modes) were transferred in three different ways (Fig. II.7). Control (no dispersal) was achieved by transferring a population aliquot; local dispersal was achieved by mixing the three populations subjected to the same sulfide concentration; and in global dispersal simulation, all 12 populations were mixed and 12 aliquots were transferred to the corresponding new media. Evolutionary rescue occurred under all combinations of population dispersal modes and rate of enhancement of sulfide concentration. Our results indicated that the occurrence of ER events was modulated by both genetic variation and deterioration rate, but the effect of the former was greater than the later (Table II.5). In particular, the highest ER events scores were recorded under global dispersal, regardless of the environmental deterioration rate (Fig. II.17). This suggests that a high genetic variation in *M. aeruginosa* populations is crucial for genetic adaptation and it could be enough to overcome sulfide stress in the range we examined under any speed of environmental change. However, when the genetic variation is lower or even minimal (as was simulated under the local or without dispersal, respectively) a fast deterioration rate does not favor the ER events (Fig. II.17). Moreover, at the lowest genetic variation, the ER event reduction occurs under any studied deterioration rate (Fig. II.17). The results found under local or without dispersal are in agreement with the hypothesis that the rate of environmental deterioration can modulate the effect of beneficial mutations, with rapid

change favoring a few mutations of large effect, whereas adaptation to slower deterioration is based on more mutations of smaller effect (Collins & De Meaux, 2009). In fact, Lindsey et al. (2013) obtained similar experimental results in *E. coli*.

On the other hand, with the aim to study the maximum resistance limit to sulfide of *M. aeruginosa* and *Oscillatoria*, a modified ratchet protocol was carried out (Fig. II.6). A requisite in this experimental design is to balance a strong selective pressure and a population size large enough to ensure the appearance of new mutations that confer resistance to the selective agent (Costas et al., 2001, 2007; Flores-Moya et al., 2005; Melero-Jiménez et al., 2019). In this sense, cultures were inoculated with a high cell density and exposed to three different levels of selection (i.e. three sulfide concentrations) in each ratchet cycle. The ratchet experiment to detect the maximum sulfide resistance of the three strains of *M. aeruginosa* (Ma1Vc, Ma5Vc and MaAVc) began with 4 independent populations for each initial sulfide level (0, 10, 30 and 90  $\mu\text{M}$  sulfide), as well as four sulfide-free controls. The ratchet cycle involved an increase in sulfide concentration by a factor of 3 at the beginning of the experiment and, later, by a factor of 1.5. The *Oscillatoria* experiment, on the other hand, started with 4 independent populations and 4 sulfide levels (200, 300, 400 and 500  $\mu\text{M}$  sulfide) increasing by 100  $\mu\text{M}$  sulfide at every ratchet cycle. The cultures were maintained for at least 7 days at each dose of sulfide. After this time, cell concentrations of sulfide cultures were compared with those of the controls. In the case that sulfide cultures showed a concentration similar to that observed in the controls, they were transferred to the next ratchet cycle, always using the same initial biomass. Cultures with a lower biomass than control ones were not transferred until they reached a biomass similar to that obtained in the control.

We found that *M. aeruginosa* and *Oscillatoria* strains were able to surpass the initial sulfide level that limited their growth (Figs. II.15 and II.16). Ma1Vc strain was able to survive under 0.4 mM sulfide, more than four times its initial sulfide tolerance limit; Ma5Vc strain was able to survive to 0.4 mM, twice its initial maximum tolerance while MaAVc strain survived at 0.27 mM sulfide, a level quite similar to its initial sulfide tolerance limit (Fig. II.15). Besides, the limit of resistance reached by Ma1Vc and MaAVc was independent of the initial sulfide exposure, whereas the highest tolerance of Ma5Vc cells was reached by those cultures exposed to the initial higher sulfide concentrations. On the other hand, on *Oscillatoria* cultures, the highest selection pressure

tolerated was detected by a culture that grew at 2 mM sulfide, twice its initial maximum tolerance level, and which was subjected to an initial concentration of 0.5 mM sulfide (Fig. II.16). Thus, previous culture conditions modulated the highest sulfide resistance level in *Oscillatoria* (Fig. II.16). However, we could not keep running the experiment beyond a total sulfide concentration of 2 mM. We detected sulfur ( $S^0$ ) precipitation on culture tubes submitted to sulfide concentrations above 0.4 mM, slight at this concentration but increasing with higher levels. This is a natural phenomenon observed in sulfide-rich waters (Camacho et al., 2005). In this sense, and due to the interference of turbidity on growth rate, we did not test sulfide concentrations above 2 mM. In addition, above 1.5 mM sulfide, the pH slightly increased, which could partially hide the toxic effect of sulfide. In this sense, the pH of the culture media were always carefully controlled during all the experiments as the concentration of sulfide forms present in the medium varies with pH.

As a result of this experiment, we selected a resistant population derived from each strain studied: Ma1Vc and Ma5Vc strains that were able to grow under 0.4 mM sulfide, named as Ma1R and Ma5R, respectively; a MaAVc population that could grow till 0.27, named as MaAR; and the O1LH culture that survived to 2 mM, named as O1R. Nevertheless, the ratchet protocol does not disentangle if the mechanism allowing this increased resistance to sulfide is adaptation or acclimation. For this purpose, an extra experiment was performed (Flores-Moya et al., 2012; Rouco et al., 2014; Melero-Jiménez et al., 2019), where we tested which mechanism allowed the survival of the strains to such a high levels of sulfide. In this sense, resistant cultures selected after running the ratchet experiment (Ma1R, Ma5R, MaAR and O1R) were maintained under non-selective conditions during 7 days (no-sulfide for Ma1R, Ma5R and MaAR; 0.2 mM for O1R). Then, the growth rate ( $m_1$ ) was measured on every replicate. After that, inoculums of those cultures were transferred to media supplemented with the maximum sulfide level reached (0.4 mM for Ma1R and Ma5R; 0.27 mM for MaAR; and 2 mM for O1R) for another week. Again, the growth rate was calculated ( $m_2$ ). The comparison of  $m_1$  and  $m_2$  allows us to disentangle if the mechanism allowing the increased resistance is acclimation or adaptation. If  $m_1 \sim m_2$ , the increased resistance would be due to adaptation. However, if  $m_1 > m_2$  the mechanism involved in cell survival would be acclimation (Rouco et al., 2014; Melero-Jiménez et al., 2019). Considering that  $m_1$  and  $m_2$  were similar in Ma1Vc and Ma5Vc strains the mechanism that allowed the increase in

sulfide tolerance in these strains was the occurrence of rare spontaneous mutations that allowed adaptation (Table II.4). However, in the MaAVc strain the process involved was acclimation (as in these case  $m_1$  was higher than  $m_2$ ; Table II.4). In fact, the Ma1Vc strain, the most sensitive strain studied, achieved a greater adaptation limit and the greatest number of tolerant populations, compared to Ma5Vc and MaAVc. These results revealed an interspecific variation on the limit of sulfide tolerance. Hence, it could be hypothesized that different sulfide-sensitive strains inhabiting sulfide-free aquatic ecosystems could adapt to different sulfide levels, showing different tolerance limits. Likewise, we conclude that the adaptation to initially lethal sulfide conditions was entirely possible in this sulfide-sensitive cyanobacterium, as was observed previously with the fluctuation analysis experiment. On the other hand, the higher resistance to sulfide of the O1R strain was due to an acclimation process (Table II.4), i. e., it was able to surpass the resistance limit to sulfide through physiological changes that appeared after the exposure to this lethal level of this compound.

The adaptation to a selective agent generally involves a physiological cost (Lenski, 1998; Andersson & Levin, 1999; Anderson, 2006), because it implies a modification of the preexisting phenotype, considered unfavorable on the ancestral environment (Coustau et al., 2000). In this sense, we compared the growth rate ( $m$ ) and photosynthetic performance of resistant (Ma1R, O1R) and wild-type (Ma1Vc, O1LH) strains in the absence of the selective agent (without sulfide), as well as cell size (when possible) and pigment content.

The growth rate of Ma1R was reduced by  $\sim 27\%$  compared to Ma1Vc, pointing out to a physiological cost of the mutation that confers resistance to sulfide (Fig. II.19). In *Oscillatoria*, the wild O1LH strain growth was  $\sim 33\%$  higher in absence of sulfide compared to O1R, although there were no differences between strains under 0.2 mM sulfide, conditions under which O1LH was maintained (Fig. II.20). We also measured the net photosynthetic rate (NPR) of resistant and wild-type cells under non-selective conditions by  $O_2$  evolution. We measured a  $\sim 50\%$  lower  $NPR_{max}$  on Ma1R when compared to Ma1Vc, plus an increase of  $\sim 40\%$  on the Ma1R respiration rate (Fig. II.21a). Again, this result indicates the physiological cost of the mutation conferring sulfide tolerance. Thus, the decrease in the net photosynthesis rate correlated with a lower cell growth. That is, the physiological cost of sulfide resistance is initially reflected in net photosynthetic terms, with consequences on the growth rate. Besides, Ma1R cells





contained half of the chlorophyll *a* (Chl *a*) and total carotenoid (TC) content, but almost 10 times more phycoerythrin (PE), and they exhibited half of the volume of wild-type strains (Table II.8). Bañares-España et al. (2016) also explored the physiological differences between two strains belonging to *M. aeruginosa*: the wild and sulphide-sensitive Ma1G strain, and a sulphide-resistant strain, obtained through the former one. They observed a decrease on the photosynthetic performance of the resistant strain, as well as a higher PE content. Nevertheless, the resistant strain obtained by Bañares-España et al. (2016) experienced an increase on cellular volume and had a higher content of Chl *a*. Thus, although a physiological cost was observed in both cases, the response was different.

Conversely, we did not find differences between O1LH and O1R  $\text{NPR}_{\text{max}}$  values (Fig. II.22). O1R and O1LH exhibited slight differences on Chl *a* content, although the resistant strain showed a reduction of  $\sim 50\%$  on the TC plus  $\sim 7$  times lower phycocyanin content (PC; Table II.8). These results are consistent with the fact that the resistance of the O1R strain was developed through an acclimation process, so fewer differences between strains were expected.

In order to get deeper on the influence of sulfide on the photosynthetic performance of resistant and wild-type strains, we measured the maximum quantum yield of the PSII ( $F_v/F_m$ ) and the electron transport rate (ETR) under different sulfide concentrations. In order to compare between the two different species,  $F_v/F_m$  values were expressed as relative  $F_v/F_m$ , i.e., as a function of the control in the absence of sulfide. Under sulfide levels ranging 25-100  $\mu\text{M}$ , Ma1R, O1LH and O1R showed a relative  $F_v/F_m$  values close to 1 (Fig. II.24). However, Ma1Vc strain relative  $F_v/F_m$  values decreased by  $\sim 75\%$  under this range, which could be explained by a higher PSII sensibility to sulfide compared to the mutant strain Ma1R, and the *Oscillatoria* strains. Nevertheless, O1R showed the highest relative  $F_v/F_m$  value under 200  $\mu\text{M}$  sulfide, followed by O1LH, Ma1R, and finally, Ma1Vc (Fig. II.24). Thus, the rate at which the relative  $F_v/F_m$  values were reduced varied among strains, being indicative of differences on PSII performance in the presence of sulfide. Taking all this into account, we observed a relationship between the degree of PSII tolerance to sulfide and the sulfide concentration of the environment where the strains were isolated, as Miller and Bebout (2004) pointed out.

In the absence of sulfide, the maximum electron transport rate ( $\text{ETR}_{\text{max}}$ ) was higher in Ma1Vc than in Ma1R, as were the  $\text{NPR}_{\text{max}}$  values, although the  $\text{ETR}_{\text{max}}$  of both strains



did not show significant differences at 25 and 50  $\mu\text{M}$  sulfide (Fig. II.25; Table II.12). This was because the  $\text{ETR}_{\text{max}}$  of Ma1Vc decreased more than 50% when 25 and 50  $\mu\text{M}$  of sulfide were added to the medium, whereas Ma1R values persisted quite stable. At 100  $\mu\text{M}$  sulfide,  $\text{ETR}_{\text{max}}$  decreased by 80% in Ma1Vc, being the electron flow undetectable from 200  $\mu\text{M}$  sulfide onwards. However, we observed a progressive decrease in the  $\text{ETR}_{\text{max}}$  of Ma1R from 0.1 mM sulfide, although at 0.6 and 0.8 mM sulfide,  $\text{ETR}_{\text{max}}$  values were close to 0. On the other hand,  $\text{ETR}_{\text{max}}$  values in the absence of sulfide did not show significant differences between *Oscillatoria* strains (Table II.13). In fact,  $\text{ETR}_{\text{max}}$  values did not show a clear pattern of variation, and no significant differences were observed between  $\text{ETR}_{\text{max}}$  values between O1LH and O1R strains at any sulfide concentration (Fig. II.26). Following our results, the sulfide concentration that promoted a significant decrease on  $\text{ETR}_{\text{max}}$  values varied significantly between strains, as explained before, being also indicative of differences on the photosynthetic performance in the presence of sulphide.

In order to know if the ability to perform anoxygenic photosynthesis could be underneath sulfide resistance, we measured  $^{14}\text{C}$  incorporation in both *M. aeruginosa* and *Oscillatoria* strains under 5 situations: (1) under light, aerobic and no sulfide conditions, measuring oxygenic photosynthesis; (2) under light, anaerobic conditions plus 0.5 mM sulfide, to detect sulfide-tolerant oxygenic photosynthesis; (3) under light, anaerobic media, plus 0.5 mM sulfide and 10  $\mu\text{M}$  DCMU (anoxygenic sulfide-dependent photosynthesis); (4) light, aerobiosis with the addition of 10  $\mu\text{M}$  DCMU (first control); and (5) dark and aerobic media (second control). DCMU deactivate the electron flow from PSII to PSI, being anoxygenic photosynthesis the only pathway for  $\text{CO}_2$  photoincorporation. In this case, sulfide would act as an  $e^-$  donor to PSI through a sulfide-quinonereductase SQR enzyme, essential for this process to occur (Hamilton et al.2018, Arieli et al., 1994; Theissen et al., 2003, Sousa et al., 2018).

We observed that none of the strains used on this experiment (Ma1R, Ma1Vc, O1LH and O1R) could perform anoxygenic photosynthesis, but *Oscillatoria* strains maintained  $\sim 30\%$  of the oxygenic photosynthesis under 0.5 mM sulfide (Table II.14). Nevertheless, *M. aeruginosa* strains did not perform any  $^{14}\text{C}$  photoincorporation under 0.5 mM sulfide. This result is in agreement with the  $F_v/F_m$  and ETR observations, which indicated that Ma1R PSII was sensitive to concentrations above 0.1 mM sulfide. Therefore, it would be included together with the Ma1Vc strain in the group I of Cohen et al. (1986). However,



*Oscillatoria* strains could be included on the second group, being strains whose PSII continues functioning under the presence of moderate sulfide concentrations. Besides, our results support the fact that the strain O1LH and O1R have the same level of PSII resistance, since they did not show significant differences between their photosynthetic parameters under sulfide conditions. This results agrees with the fact that several species belonging to the genus *Oscillatoria* proliferate in natural environments where sulfide levels can achieve concentrations  $\geq 1.5$  mM through the maintenance of oxygenic photosynthesis (Camacho et al. 1996, 2000, 2005). In addition, Cohen et al. (1986) argued that sulfide could be even essential for the operation of oxygenic photosynthesis under H<sub>2</sub>S concentrations up to 300  $\mu$ M. In this sense, we observed that in La Hedionda spa, sulfide concentration and *Oscillatoria* abundance followed an annual cycle, showing sulfide-rich and sulfide-poor periods (from June to November, and from December to May, respectively) which paralleled with a high and a low abundance of *Oscillatoria*. In fact, we observed that the lowest abundance of this cyanobacterium occurred on the period when sulfide concentration reached minimum values, and the highest abundance when sulfide ranged 100 - 200  $\mu$ M sulfide. Thus, the increase in sulfide level seemed to have induced an increase in the abundance of *Oscillatoria* which confirms our results in laboratory, as the maximum growth of this strain was observed between 0.1 and 0.35 mM sulfide.

Regarding the second main objective, we studied the gain and reversal of multicellularity, based on previous investigations performed by Ratcliff et al. (2012) and Driscoll & Travisano (2017). We selected the budding yeast *K. lactis* Y8 strain to analyze the influence of the selective pressure and the amount of genetic diversity on the achievement of multicellularity on a constitutive unicellular morphotype, and the reversal of this trait on a constitutive multicellular morphotype (named as “snowflake”, because of its shape).

Our procedure relies on Rattcliff *et al.* (2011) and Driscoll & Travisano (2017) sedimentation protocol (Fig. III.3). Every day, culture transfers were made transferring 100  $\mu$ L of the preexisting culture to a new tube containing 10 mL of fresh media. The eco-evolutionary scenarios differed in the genetic diversity of initial inoculums used to found populations, and in the procedure followed before taking the 100  $\mu$ L aliquots used for transfers, i. e., the selective pressure. Every protocol was performed once, was applied to both unicellular and snowflake morphotypes, and lasted 15 days.



We applied three types of selective pressure: size (+), looking for big particles; size (-), for small particles; and size (0), used as a control, with no selection (Fig. III.3). Applying selection (+) to the unicellular morphotype, we explored the transition of unicells to snowflakes. On the other hand, using size (-) selection on snowflakes cultures, we addressed the reversal of these cultures to the unicellular morphotype. Transfers using size (0) created an environment where neither snowflake nor unicellular selection was imposed. Furthermore, three levels of population genetic diversity were achieved by modifying the initial inoculums used to found the replicates. The scenario with high genetic variability was started with an inoculum taken directly from each unicellular or multicellular parental culture to each replicate; populations showing medium genetic variability were founded using one single colony per each replicate, so there was one single genotype in each population, but different among replicates; and finally, minimum genetic variability was simulated placing an inoculum from a culture founded by one single and identical colony on all the replicates (Fig. III.3). Not all the crossed treatments (genetic variability  $\times$  selection pressure) were applied due to logistic reasons. In particular, 6 out of 9 treatments, those that could be *a priori* more relevant were selected, including two opposite situations in the origin of multicellularity (high vs. low genetic diversity), and an intermediate one in the character reversal (medium genetic diversity). These treatments were applied to both unicellular and multicellular cultures (Table III.1). After 15 days of treatment, the unicellular-multicellular transitions and *viceversa* were estimated. To do this, the percentage of unicellular and multicellular colonies forming units (CFU) produced by each morphotype was computed.

Following our results, we observed morphotype evolution from unicellular to multicellular snowflakes and *vice versa* (reversion) when using the appropriate genetic population composition and nature of selective pressure (Tables III.3 and III.4). We already knew that snowflake clusters achievement from unicellular morphotype was possible in *K. lactis* (Driscoll & Travisano, 2017). On unicell cultures, and applying size (+) selection, multicellularity was achieved quite easily. Besides, the genetic diversity was irrelevant, since snowflakes developed in 100% cases when unicellular cultures were submitted to size (+) (Table III.3). Regarding to character reversal, multicellular clusters experienced morphotype change to unicells under size (0) and size (+) selection. This result was unexpected. We observed that the genetic diversity and nature of selection process were decisive when it came to obtain reversal of multicellularity to single cells



(Table III.4). On one hand, at high levels of genetic diversity, single cells evolved from multicellular genotype in every replicate, both in cultures under selection (0) and even when size (+) selection was carried out. On the other hand, none of the snowflake cultures experienced morphotype reversal to single cells in cultures under minimum genetic diversity, regardless the selective pressure imposed. Besides, the speed of colonization was different among morphotypes. When unicells were invading a snowflake environment, the percentage of unicell CFUs got from 0.1% to almost 100% within the first two days (Fig. III.7). Nevertheless, the snowflake colonization when this morphotype was acting as invader in a unicellular environment was much slower, because snowflakes grow at lower rates than single cells (Driscoll & Travisano, 2017).

Following our results, we argue that the achievement of multicellularity in the Y8 *K. lactis* strain depends on the selective pressure, and is less restricted by preexisting genetic diversity. However, the reversal to unicellularity is much more genetically constrained than its gain. Nonetheless, this assertion must be made carefully. Multicellular evolution may be critically dependent on the DNA “toolkits” available in unicellular ancestors (Rokas, 2008; Bowman, 2013; Niklas & Newman 2013; Smolarkiewicz & Dhonukshe 2013). For this reason, the scope of our conclusions should be carefully considered. The generalizability of our results may depend upon genetic similarities in mechanisms of multicellular evolution.

# CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

---



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



## I.1. Teoría de la Evolución

Desde su introducción, hace más de siglo y medio, por los naturalistas Darwin (1859) y Wallace (1858), la Teoría de la Evolución ha cambiado el paradigma científico establecido, provocando una de las revoluciones científicas más importantes de todos los tiempos (Mayr, 1991, 1994; Kutschera y Niklas, 2004; Koonin y Wolf, 2012). En la actualidad, la Biología Evolutiva representa la piedra angular y el hilo conector de la Biología moderna (Futuyma, 1995; Stockwell et al., 2003; Meagher, 2007; Bell y Collins, 2008; Neese y Stearns, 2008; Smith y Bernatchez, 2008). Efectivamente, como postuló Dobzhansky (1973), “*nothing in Biology makes sense except in the light of evolution*”.

La característica distintiva de la Teoría de la Evolución propuesta por Darwin y Wallace fue la explicación del cambio evolutivo a través de la selección natural (Brandon, 1978). A diferencia de Wallace, Darwin apoyó sus argumentos con una gran cantidad de datos, extraídos principalmente de hipótesis inductivas y del registro fósil (Kutschera y Niklas, 2004). También proporcionó observaciones detalladas en organismos directamente desde sus hábitats naturales (Darwin, 1859, 1872). No obstante, un análisis comparado de las publicaciones de ambos autores revela que las contribuciones de Wallace fueron más significativas de lo que generalmente se reconoce; tanto es así, que se ha propuesto hablar del "mecanismo de selección natural de Darwin-Wallace" para reconocer la importancia del "segundo Darwin" (Dawkins, 2002; Kutschera, 2003).

En sus obras, Darwin explicó su teoría de la evolución a través de cinco evidencias o pruebas, que él consideró hacían su propuesta irrefutable (Darwin, 1859, 1872): (i) evidencias paleontológicas, pues cuanto más recientes son los restos hallados en el registro fósil, más se parecen a las especies actuales; (ii) evidencias biogeográficas, basadas en que las especies actuales habitan generalmente en la misma región que sus antepasados; (iii) evidencias taxonómicas, manifestadas en que el parecido existente entre los seres vivos no es fruto del azar, sino de la existencia de antepasados comunes; (iv) evidencias morfológicas, basadas en que especies relativamente distantes, poseen órganos homólogos, que tienen la misma o parecida estructura interna, pese a que pueden estar adaptados a realizar funciones muy distintas; y (v) evidencias embriológicas, que explican que las etapas iniciales en la formación y desarrollo los



organismos son muy similares, aunque se diferencian sustancialmente en las etapas finales.

La genialidad (y a la vez, la debilidad) de Darwin es que identificara y desarrollara su teoría y estas cinco evidencias en ausencia de cualquier tipo de conocimiento claro de las leyes de la herencia (Ho y Saunders, 1979). Así, no es de extrañar que, de manera tácita, Darwin aceptara que las variaciones surgidas como consecuencia de la interacción entre un organismo y su entorno pudieran transmitirse a las generaciones posteriores, reconociendo la tan controvertida herencia de los caracteres adquiridos (Ho y Saunders, 1979). Hay que tener en cuenta que, en la década de 1860, Gregor Mendel ya había desarrollado sus leyes de la herencia. El descubrimiento fue anunciado en los boletines de una sociedad científica bastante conocida, pero atrajo poca atención (Castle, 1903). La teoría darwiniana fue el centro de la atención científica en esos años, y el brillante descubrimiento de Mendel pasó desapercibido durante un tercio de siglo. Las leyes de Mendel fueron redescubiertas independientemente por tres botánicos diferentes (Hugo de Vries, Carl Correns y Erich von Tschermak) en 1900. Finalmente, fue William Bateson quien, dos años después, señaló la importancia y la amplia aplicabilidad de las tres leyes de la herencia (Castle, 1903).

Desde entonces, la idea básica de Darwin-Wallace se unió a los preceptos de la genética mendeliana cristalizando en “el neo-darwinismo” (es decir, la teoría expandida de Darwin). Gracias a esta teoría, las variaciones se identificaron como alelos alternativos, y la aptitud o *fitness*, como el coeficiente de éxito reproductivo relativo asignado a los diferentes genotipos. Esta etapa en el desarrollo de la teoría evolutiva neo-darwiniana se remonta al zoólogo/citólogo alemán Weismann, quien proporcionó evidencia experimental contra esta “herencia cuasi-lamarckiana” y quien postuló que la reproducción sexual (recombinación) es la responsable de crear las variantes génicas en cada generación, la llamada “materia prima” sobre la que la selección natural puede actuar (Weismann, 1892; Ho y Saunders, 1979). De este modo, el neo-darwinismo enriqueció el concepto original de Darwin al esclarecer cómo se genera la variación biológica, excluyendo la herencia “lamarckiana” como un mecanismo viable para la evolución. Wallace, que popularizó el término “darwinismo”, incorporó completamente las conclusiones novedosas de Weismann, siendo uno de los primeros defensores del neo-darwinismo (Wallace, 1889).

El neo-darwinismo es estrictamente una teoría de genes (Ho y Saunders, 1979) que obvia el hecho de que *“an understanding of evolution requires an understanding of development”* (Maynard-Smith, 1975). Como consecuencia de los avances en genética, paleontología y sistemática, el neo-darwinismo se amplió sustancialmente entre 1937 y 1950 (Mayr, 1982), dando lugar a la actual Teoría Sintética de la Evolución (Kutschera y Niklas, 2004). De este modo, existe una clara diferencia conceptual entre el neo-darwinismo y la Teoría Sintética de la Evolución (o "Síntesis Neo-Darwiniana"; Mayr, 1991; Reif et al., 2000). Aunque muchos científicos desarrollaron estudios sobre los cuales se basa la Teoría Sintética, sus principales fundadores fueron Theodosius Dobzhansky, Ernst Mayr y Julian Huxley. Esta teoría destaca la concepción de las poblaciones como unidades de evolución, el reconocimiento de los genes como los elementos que transmiten la información hereditaria, y la ratificación de la selección natural como elemento fundamental en la evolución de las especies (Dobzhansky, 1973; Mayr, 1942; Huxley, 1942; Simpson, 1944; Rensch, 1947; Stebbins, 1950). La Teoría Sintética de la Evolución identifica, como elementos generadores de variabilidad genotípica, a dos eventos aleatorios: la recombinación génica (durante la meiosis) y la mutación durante la división celular. Así, la acumulación de pequeñas y constantes variaciones génicas serían las responsables, en última instancia, de la diferenciación entre individuos. Según la Teoría Sintética de la Evolución, las transiciones evolutivas en las poblaciones de organismos suelen ser graduales, es decir, las nuevas especies evolucionan a partir de variedades preexistentes mediante procesos lentos, manteniendo en cada etapa su adaptación específica acorde al ambiente en el que se desarrollan (Mayr, 1963). Esta especiación puede definirse como un paso en el proceso evolutivo en el que dos poblaciones, antes emparentadas, son finalmente incapaces de reproducirse entre ellas (Dobzhansky, 1937). Mayr (1963) afirmó que *“...toda evolución se debe a la acumulación de pequeños cambios genéticos, guiados por la selección natural, siendo la evolución interespecífica consecuencia de la extrapolación y el aumento de los eventos que ocurren dentro de las poblaciones y especies”*. Sobre esta premisa se basa el “gradualismo filético”, según el cual son los mismos factores genéticos y selectivos los responsables de la diferenciación entre especies, géneros, familias y demás categorías taxonómicas. Stebbins (1971) llegó a la misma conclusión: *“... la evolución de las categorías superiores ha sido a través de los mismos procesos que han provocado la evolución de razas y especies”*.

No obstante, el desarrollo de una teoría evolutiva acorde con los avances científicos actuales no acaba en los preceptos de la Teoría Sintética. Autores como Carroll (1997, 2000, 2002), Fleagle (2001) y Gould (2002) han señalado que las fuerzas que guían la evolución son mucho más variadas que aquellas postuladas por los pioneros de la Biología Evolutiva (Darwin, Wallace y Weismann) y los arquitectos de la teoría sintética (Dobzhansky, Mayr, Huxley). Como alternativa al gradualismo, Gould y Eldredge (1972) propusieron el modelo de cambio evolutivo del "equilibrio interrumpido". Según este modelo, la evolución tiende a caracterizarse por largos períodos de estasis morfológica ("equilibrio"), "interrumpidos" por episodios de cambio fenotípico rápido. Y es que, como señalaría Lewontin (1974), una teoría de la evolución no puede completarse a menos que incluya un conjunto de leyes epigenéticas que den explicación a la variación y distribución de fenotipos que resultan del desarrollo de un genotipo en diversos entornos. Con la inclusión de la epigenética en la Teoría Evolutiva se pueden entender los cambios heredables que no se producen como consecuencia de cambios en la secuencia de ADN (Bonasio et al., 2010), ya que se tendrían en cuenta los procesos a través de los cuales células genéticamente (casi) idénticas se pueden diferenciar en diversos tipos de células diferentes (Klironomos et al., 2013). A nivel molecular, los fenómenos epigenéticos están mediados por marcas reversibles en el genoma, como la metilación del ADN y las modificaciones (acetilación) de histonas (Bräutigam et al., 2012), así como por microARNs, que regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional (Giner et al., 2016). De este modo, se presupone que los cambios epigenéticos heredables afectan al proceso evolutivo de las poblaciones tanto como los patrones de cambio genotípico y fenotípico durante la adaptación, ya que los fenotipos adaptativos pueden surgir antes que los cambios genéticos (Klironomos et al., 2013). En particular, se ha sugerido que cuando la selección natural actúa no sólo sobre un pool de variantes genéticas, si no también ante variantes epigenéticas, las poblaciones se adaptan más rápido (Klironomos et al., 2013).

Sin embargo, ninguna población es capaz de generar todas las variantes genómicas teóricas posibles (Travisano et al., 1995), en parte por la contingencia histórica (Gould, 1989, 2002) y porque el número de individuos dentro de una población en particular es finito (Kutschera y Niklas, 2004). Además, el orden en el que se producen las mutaciones es impredecible (Mani y Clarke, 1990; Lenski et al., 1991), y la primera de ellas determina el resto a través de procesos como pleiotropías y epistasis (Cooper y



Lenski, 2000; Cooper et al., 2008), que pueden enmascarar o potenciar la expresión de determinados segmentos del genoma (Jacob, 1977; Wright, 1988; Yedid y Bell, 2002; Weinreich et al., 2005, 2006). Estos procesos, que a pequeña escala mezclan el azar y el determinismo pueden dar lugar a la supervivencia o la extinción de linajes enteros de organismos (Lewontin, 1966; Gould, 1985; Jablonski, 1986). Esto quiere decir que, si unimos la contingencia histórica con la naturaleza repentina y casi caprichosa de los cambios ambientales, la evolución se torna prácticamente impredecible (Gould, 1989, 2002; Beatty, 2006).

Basándose en estas mismas premisas, Gould (1989) sugirió que si “rebobináramos la cinta de la vida” desde cierto momento del pasado hasta hoy en día, los resultados obtenidos serían, con una alta probabilidad, totalmente diferentes. Y es que “*las rutas evolutivas son muchas, pero los destinos son limitados*” (Conway, 2010). De este modo, la evolución sería irrepetible, impredecible y limitada (Conway, 2010; Van Valem, 1991; Dawkins, 1996; Vermeij, 2006).

## I.2. Microorganismos como organismos modelo en Evolución Experimental

Siguiendo estos antecedentes, surge una cuestión trascendental: ¿cómo pueden, entonces, explorarse los caminos llevados por la vida a través de la evolución? Es más, ¿podría la ciencia replicar la historia evolutiva? Para contestar estas y otras preguntas surgió la Evolución Experimental. De esta forma, la Biología Evolutiva se constituye no solo como una disciplina puramente académica, sino que es parte esencial de las Ciencias Aplicadas (Kutschera y Niklas, 2004). Basándose en el razonamiento hipotético deductivo, la Evolución Experimental permite la comprobación de postulados de la evolución biológica mediante el uso de experimentos repetibles y controlados (Souza et al., 1997, 2002a, 2002b; Beatty, 2006; Trivisano et al., 1995; Blount et al., 2008). Bull y Wichman (2001) han recopilado muchos ejemplos socialmente relevantes en los que se han utilizado principios y métodos evolutivos para resolver problemas prácticos, como la creación de nuevos fármacos, el desarrollo de programas informáticos o el estudio y la minimización de la resistencia bacteriana a antibióticos. Por supuesto, volver a poner la “cinta de la vida” de Gould (1989) a escala planetaria es imposible, pero el uso y aplicación de experimentos de laboratorio controlados permite

conocer la historia de la vida de una manera modesta y a pequeña escala (Beattyl, 2006; Travisano et al., 1995).

Ahora bien, el estudio de los procesos evolutivos y sus réplicas tal y como ocurren en la naturaleza implican territorios y escalas de tiempo inabarcables para el ser humano. Es por ello que, en un esfuerzo por deducir cómo comenzó la vida, los evolucionistas modernos han centrado su atención en los microorganismos (Kutschera y Niklas, 2004). Cuando Darwin (1859, 1872), Wallace (1889) y Weismann (1892) propusieron sus conceptos de los mecanismos del cambio evolutivo, la microbiología estaba en ciernes. Es por ello que los arquitectos de la Teoría Sintética se ocuparon de los procesos evolutivos de los macroorganismos eucarióticos dioicos (animales, plantas), ignorando en gran medida las bacterias y otros microorganismos (Kutschera y Niklas, 2004). Sin embargo, desde hace dos décadas se vienen usando los microorganismos (virus, bacterias, arqueas, hongos y algas microscópicas) en Evolución Experimental, ya que sus ventajas son múltiples (Elena y Lenski, 2003): (i) son sencillos de propagar y de contar; (ii) se reproducen rápidamente, lo que permite que los experimentos puedan realizarse con muchas generaciones; (iii) se pueden cultivar grandes poblaciones en espacios relativamente pequeños, facilitando tener réplicas biológicas; (iv) muchos microorganismos se reproducen asexualmente, por lo que la fuente de variación sería única y exclusivamente la mutación aleatoria; (v) esta asexualidad permite rastrear fácilmente marcadores genéticos, lo que permite un seguimiento más específico de los antecedentes genómicos y la medición de la fitness; (vi) las variables ambientales son fáciles de establecer y cambiar, así como los recursos ambientales y la composición genética de los cultivos parentales; y (vii), hoy en día, la fuente de datos moleculares y genómicos es muy abundante, y las técnicas de análisis genético son muy precisas.

Otra importante ventaja que posee el uso de microorganismos en Evolución Experimental es que la mayoría pueden almacenarse congelados en un estado “estacionario” (Kawecki et al., 2012). Esta propiedad permite, efectivamente, viajar en el tiempo: se pueden comparar directamente organismos de diferentes generaciones, por ejemplo, poniendo a competir genotipos ancestrales y derivados (Dykhuizen y Hartl, 1983; Lenski, 1991). También se pueden realizar repeticiones de la historia evolutiva, lo que permite analizar el papel de la contingencia histórica, reiniciando el ensayo desde las generaciones ancestrales (Blount et al., 2008; Woods et al., 2011; Meyer et al., 2012).



Además, los microorganismos permiten realizar experimentos tan útiles como versátiles. La mayoría de ellos comienzan con un cultivo uniclonal, es decir, compuesto por organismos genéticamente idénticos, que dependería únicamente de las mutaciones como fuente de variación genética si sólo presentan reproducción asexual (Kawecki et al., 2012). Por otro lado, si se usan organismos con reproducción sexual, se ha de tener en cuenta que cualquier población cuenta, de facto, con una variabilidad genética fruto de la recombinación génica que se produce durante la meiosis. Sin embargo, hay determinados fenómenos centrales en la evolución de muchas plantas y animales (como el sexo, la selección sexual, el cuidado parental y la especiación) que están ausentes o involucran mecanismos muy diferentes en los microorganismos (particularmente bacterias o virus), lo que ha limitado históricamente su utilidad como sistemas modelo para el estudio de esos fenómenos (Kawecki et al., 2012). No obstante, recientemente, los estudios de Evolución Experimental con microorganismos que involucran patrones de vida más complejos se han ampliado. Los microorganismos eucariotas se han utilizado para estudiar la evolución del aislamiento reproductivo (Leu y Murray, 2006; Dettman et al., 2008), la selección sexual (Rogers y Greig, 2009) y el origen y evolución de la pluricelularidad (Travisano, 2009; Ratcliff et al., 2012, 2015; Driscoll y Travisano, 2017; Rebolleda-Gómez y Travisano, 2018, 2019). Además, se pueden analizar los efectos evolutivos de algunos factores como las tasas de mutación (de Visser, 1999), la recombinación génica (Malmberg, 1977; Goddard et al., 2005; Schoustra et al., 2010), y el parentesco (Chao y Levin, 1981, Turner y Chao, 1999; Velicer et al., 2000; Kaltz y Bell, 2002; Khare et al., 2009). De manera más reciente, también se ha usado el potencial de los microorganismos para exhibir comportamientos más complejos, típicos de organismos pluricelulares (Ackermann et al., 2003; Khare et al., 2009; Ratcliff et al., 2012), tales como comportamientos sociales (Velicer et al., 2000; Griffin et al., 2004; Khare et al., 2009). Por lo tanto, los microorganismos se utilizan ahora como sistemas modelo para estudiar la evolución de los rasgos que tradicionalmente se han atribuido solo a organismos multicelulares.

El clásico artículo de Lenski y Travisano (1994) ejemplifica la versatilidad de los microorganismos como modelo para estudiar conceptos tan complejos como el origen de las novedades genéticas y fenotípicas, la repetibilidad de la adaptación, la diversificación de los linajes y, por lo tanto, las causas y consecuencias de la singularidad de la historia evolutiva. Estos autores propagaron 12 poblaciones de *E. coli*

a lo largo de 10.000 generaciones (1.500 días), revelando que la evolución en poblaciones bacterianas ocurre como resultado de la selección de mutaciones beneficiosas. Estos resultados respaldan la interpretación de Wright (1932, 1982, 1988), en la cual los eventos que se producen al azar (mutación y deriva génica) juegan un papel fundamental en la evolución adaptativa. Wahl y Gerrish (2001) desarrollaron posteriormente un marco teórico integrado para el análisis de experimentos similares de evolución *in vitro*. Este enfoque se ha utilizado para estudiar experimentalmente la evolución de hongos microscópicos, moléculas de ARN autorreplicantes (ribozimas) y virus (Schuster, 2001; Joyce, 2002). En la revisión de Elena y Lenski (2003), se describen no sólo las ventajas de los microorganismos para los experimentos de evolución, sino también los métodos para medir la aptitud relativa de las poblaciones ancestrales y derivadas y la base genética de las adaptaciones evolutivas. En esta excelente revisión también se destaca la relevancia de los estudios con “organismos digitales”.

Uno de los retos más recurrentes en el estudio de Evolución Experimental con microorganismos se basa en la dinámica del *fitness change* o adaptabilidad (Souza et al., 1997; Couce y Tenaillon, 2015; Baselga-Cervera et al., 2016). Dado que la adaptación es el principal resultado visible de la evolución, estudiar sus patrones de cambio podría proporcionar una idea de los problemas claves de la Teoría Evolutiva, desde la dinámica de fijación de los caracteres hasta la arquitectura genética de los organismos (Couce y Tenaillon, 2015). La adaptabilidad (o capacidad de adaptación) incluye propiedades interrelacionadas, como la tolerancia a las fluctuaciones medioambientales, la flexibilidad fenotípica, la capacidad de mantener un cierto equilibrio (homeostasis) y la modulación de la capacidad de adaptación en función de la magnitud de los cambios ambientales (Goldschmidt, 1940; Ho y Saunders, 1979). Se ha observado que el potencial adaptativo de una población es inversamente proporcional a su grado de adaptación al medio (Couce y Tenaillon, 2015). Es decir, aunque el patrón general es que las poblaciones aumentan su nivel de adaptación con el tiempo, se sabe que después de una fase inicial de adaptación rápida, la ratio de mejora de la *fitness* generalmente se ralentiza (Wiser et al., 2013; Good y Desai, 2015). Además, la tasa de adaptación depende del nivel de adecuación inicial de la población al medio. Este hecho puede comprobarse estableciendo una colección de genotipos con diferentes niveles de adaptación que evolucione durante un período de tiempo, comparándolo posteriormente

con la población inicial. Aunque existe cierta variabilidad en los resultados, la tendencia general es que los genotipos menos adaptados tiendan a mostrar las tasas de adaptación más rápidas (Moore et al., 2000; Sanjuan et al., 2005; Barrick et al., 2010; Kryazhimskiy et al., 2014).

Además de la adaptabilidad, los microorganismos son también organismos modelo para estudiar la diversidad. Las poblaciones en un entorno heterogéneo muestran generalmente niveles de alta diversidad sostenidos en el tiempo, mientras que las poblaciones que cambian a un entorno homogéneo, sufren una rápida pérdida de diversidad (Rainey y Travisano, 1998). Estos resultados indican que la selección es la responsable del mantenimiento de la diversidad morfológica en un entorno heterogéneo, destruyendo la variabilidad en el entorno homogéneo (Rainey y Travisano, 1998). Si la selección es la fuerza evolutiva primaria que mantiene la diversidad en el entorno heterogéneo, se ha de esperar una compensación en las fuerzas competitivas para que se mantenga esa diversidad (Connell, 1961; Abrams, 1987; Hopf et al., 1993; Case y Taper, 1994): las diferentes variantes ocuparían diferentes nichos, siendo la competencia entre variantes la que impulsa la diversificación. Esto quiere decir, además, que los genotipos raros poseen ventajas adaptativas frente a los más frecuentes (Rainey y Travisano, 1998). Estos preceptos, unidos a los recientes avances en Biología Celular y Genómica, han permitido un aumento notable en la comprensión de la base molecular que sostiene el comportamiento cooperativo a escala microbiana (Cavalier-Smith et al., 2006).

### I.3. Estudio del origen y evolución de la fotosíntesis oxigénica y la pluricelularidad: el papel de las cianobacterias

La Biología Evolutiva y el análisis filogenético han mejorado notablemente nuestra capacidad de reconstruir las relaciones filogenéticas de todos los organismos y construir una imagen realista del árbol de la vida (Cavalier-Smith et al., 2006). La pregunta no es solo cómo pudo surgir la vida, si no cómo los primeros organismos pudieron adaptarse y prosperar en ambientes más hostiles como en los que se desarrollaron las primeras etapas de la historia de la vida en la Tierra. La Evolución Experimental se ha ayudado de los microorganismos para abordar los principales problemas conceptuales (Cavalier-



Smith et al., 2006; Barrick et al., 2009), como el estudio de dos de los eventos más relevantes de la historia de la vida: la aparición de los primeros organismos con fotosíntesis oxigénica, es decir, de los ancestros de las cianobacterias (Schopf, 1999, 2011) y la aparición de los organismos pluricelulares a través de ancestros unicelulares (Travisano, 2009; Ratcliff et al., 2012; Driscoll y Travisano, 2017), hecho que también se ha relacionado con la evolución de las cianobacterias (Sánchez-Baracaldo et al., 2005). Estos dos eventos modificaron significativamente los posibles patrones orgánicos futuros (Schopf et al., 1973; Schopf, 1999, 2011; Travisano, 2017). Así, la fotosíntesis oxigénica generó un incremento de los niveles de oxígeno de la atmósfera, provocando un cambio de condiciones reductoras a oxidantes (Olson y Straub, 2016). Por su parte, la aparición de los organismos pluricelulares permitió el aumento de la complejidad corporal, la división de las funciones celulares y la ocupación posterior del medio terrestre (Travisano 2009; Schirmermeister et al., 2013).

### *1.3.1. Papel del H<sub>2</sub>S en el origen de la fotosíntesis oxigénica en cianobacterias*

Cavalier-Smith (2006), basándose en evidencias filogenéticas, sostiene que la fotosíntesis oxigénica se originó algo antes de la diversificación de las cianobacterias, los únicos fotoautótrofos oxigénicos procariotas que existen. Además, combinando la evidencia filogenética y paleontológica, este autor sugiere que la duplicación de los fotosistemas, un evento que hubo de preceder a la aparición de la fotosíntesis oxigénica y al uso de la molécula de H<sub>2</sub>O como donadora de electrones, debió ocurrir hace aproximadamente 2.900 millones de años. Tanto la evidencia de biomarcadores revisada por Summons et al. (2006) como las proporciones de isótopos de carbono orgánico discutidas en detalle por Hayes y Waldbauer (2006) se han usado para argumentar que el linaje de las cianobacterias tiene al menos 2.700 millones de años de edad, contra la hipótesis de que surgieron hace 2.400 millones de años, inmediatamente antes del gran evento de oxidación (GEO, Kopp et al. 2005). No obstante, la aparición de la fotosíntesis oxigénica ocurrió en un medio rico en H<sub>2</sub>S, por lo que este compuesto habría influido en los estadios iniciales de la evolución de la fotosíntesis oxigénica (Kabil y Banerjee, 2010), lo que podría explicar que algunas especies de cianobacterias actuales sean capaces de vivir en medios ricos en sulfuro (Cohen et al., 1986). Es decir,

la fotosíntesis oxigénica se habría originado en lo que en la actualidad consideramos como ambientes extremos.

Aunque las cianobacterias se encuentran en casi todos los ecosistemas del mundo, precisamente desarrollándose a veces en condiciones extremas, el conocimiento de la diversidad de cianobacterias en estos ambientes es, desafortunadamente, insuficiente. Este cosmopolitismo es fruto de su rápida diversificación y adaptación a condiciones medioambientales cambiantes (Komárek y Kaštovský, 2003). Las cianobacterias tienen una amplia variabilidad genética, como se desprende de los análisis poblacionales (Kato et al., 1991; Barker et al., 2000). Si esta situación se combina con posibles transferencias horizontales de material genético dentro de las poblaciones (Rudi et al., 1998; Barker et al., 2000), es probable que el desarrollo de nuevos genotipos en cianobacterias sea relativamente sencillo. Así, es esperable la existencia de numerosos genotipos endémicos, especialmente en biotopos extremos y aislados (Komárek y Kaštovský, 2003). En el ámbito de investigación en el que se enmarca esta Tesis Doctoral, se han llevado a cabo estudios en cianobacterias y microalgas en los últimos años que han aportado claras evidencias de la relación entre mutación y selección en ambientes extremos (Flores-Moya et al., 2005; Costas et al., 2007, 2008; López-Rodas et al., 2008a,b, 2009, 2001; Fernández-Arjona, 2013; Melero-Jiménez et al., 2019). En ellos, se ha planteado la siguiente cuestión: ¿pueden los microorganismos fotosintéticos de medios no extremos, adaptarse y sobrevivir en medios acuáticos selectivos (aguas naturales de características extremas)? Si la respuesta es "sí", habría que diferenciar claramente entre i) aclimatación, fruto de la expresión de genes preexistentes en las poblaciones, y que se manifiesta a lo largo de la vida de los individuos; y ii) adaptación, basada en la aparición de nuevas variantes genéticas que, bajo condiciones selectivas, son seleccionadas (Bradshaw y Hardwick, 1989; Belfiore y Anderson, 2001). Mientras que la aclimatación pertenece al ámbito de estudio de la Fisiología y la Ecofisiología, la adaptación genética hay que enmarcarla dentro del campo de la Evolución. En casi todos los casos, se ha podido demostrar que la supervivencia de microorganismos fotosintéticos en medios extremos es fruto de la selección de nuevas variantes genéticas originadas por mutación (Flores-Moya et al., 2005; Costas et al., 2007, 2008; López-Rodas et al., 2001, 2008a, b, 2009; Fernández-Arjona, 2013) entre otros, como recombinación genética (García-Balboa et al., 2013). Desde el punto de vista de la Biología Evolutiva esto es muy relevante, ya que apenas existen evidencias empíricas

que permitan demostrar la relación directa entre mutación y selección en sistemas naturales.

¿Puede relacionarse la alta diversidad fenotípica, con base genética, con la capacidad de adaptación? Las mutaciones genéticas usualmente conllevan un coste fisiológico que puede afectar a las poblaciones que se están adaptando (Lenski, 1998; Anderson y Levin, 1999). La evidencia más importante de dicho coste fisiológico es la disminución de la tasa de crecimiento de las variantes mutantes en comparación con la variante ancestral. La consecuencia directa es el balance mutación-selección en condiciones no selectivas (un estimador de cuánta variación persiste en las poblaciones naturales; Kimura y Maruyama, 1966). No obstante, también debe reflejarse el coste fisiológico de la mutación en otros caracteres fenotípicos, aunque esto se ha explorado escasamente (Coustau et al., 2000). En el caso de la adaptación genética de cianobacterias y microalgas, se detecta una disminución de la tasa de crecimiento de los mutantes resistentes frente a la de las cepas salvajes (López-Rodas et al., 2006b; Bañares-España et al., 2016) y en la eficiencia y capacidad fotosintética, así como en el rendimiento cuántico del fotosistema II (PSII; Fernández-Arjona et al., 2013; Bañares-España et al., 2016).

En Andalucía (España) existen cuerpos de agua que, por sus extremas características fisicoquímicas, son modelos ideales para estudios de Evolución Experimental de microorganismos fotosintéticos. En particular, las aguas sulfurosas de las charcas de La Hedionda (Casares, Málaga) y de Los Baños de Vilo (Periana, Málaga) presentan altos niveles de sulfuro, un potente bactericida, fungicida y alguicida. Sin embargo, se ha comprobado que en estas charcas proliferan microorganismos fotosintéticos característicos de medios no extremos (Flores-Moya et al., 2005; Fernández-Arjona et al., 2013). En el caso de las cianobacterias, la adaptación al sulfuro constituye un tema de especial relevancia, ya que estos organismos presentan una amplia diversidad de niveles de tolerancia a este compuesto (Cohen et al., 1986; Miller y Bebout, 2004). La relevancia de este tipo de adaptación en cianobacterias se debe a que el sulfuro es tóxico e incide negativamente en la fotosíntesis oxigénica, ya que inhibe irreversiblemente el PSII (Cohen et al., 1986; García-Pichel y Castenholz, 1990). Por ello, estudiar cómo aparece la adaptación al sulfuro en cianobacterias procedentes de ambientes no sulfurosos resulta interesante desde un punto de vista no sólo fisiológico, si no también eco-evolutivo.

### 1.3.2. Origen y evolución de la pluricelularidad

Según el registro fósil, ya existían varios morfotipos de cianobacterias hace más de 2.000 millones de años (Hofmann, 1976; Amard y Bertrand-Sarfati, 1997). Ahora bien, las primeras formas de cianobacterias que surgieron en la Tierra habrían sido cocoides, apareciendo el morfotipo filamentoso posteriormente (Sánchez-Baracaldo et al., 2005). Por lo tanto, el carácter ancestral sería unicelular, y el pluricelular, (s. l.) filamentoso, sería el carácter derivado. Sin embargo, muchos taxones de cianobacterias filamentosas actuales están asociados con los estromatolitos (Reid et al., 2000; Neilan et al., 2002) por lo que el carácter pluricelular debió surgir muy temprano en la historia de las cianobacterias, hecho también apoyado por evidencias filogenéticas (Schirrmeister et al., 2011, 2013). Como consecuencia de la transición a una forma filamentosa, estas primeras cianobacterias con una incipiente pluricelularidad habrían obtenido ventajas a nivel de movilidad (Adams, 1997) y de eficiencia energética (Schirrmeister et al., 2013). Estas ventajas conllevaron, presumiblemente, al mayor éxito en la dispersión, diversificación y colonización de territorios de las cianobacterias al final del Arqueano, hecho que podría haber provocado el aumento en la emisión de oxígeno hacia la atmósfera (Schirrmeister et al., 2013). Resulta tentador proponer que este estilo de vida filamentoso o pluricelular primigenio esté correlacionado con los cambios en el medio ambiente de la Tierra primitiva, lo que podría haber permitido la colonización de los ecosistemas de aguas poco profundas y la formación de tapetes microbianos (García-Pichel, 1998). De hecho, Schirrmeister et al., (2013) van más allá, apoyando la teoría de que el origen de la pluricelularidad coincidió con el inicio del gran evento de oxidación (GEO) y con el aumento de la diversificación de las cianobacterias.

A pesar de las claves del registro fósil y los datos filogenéticos, se sabe muy poco sobre la fisiología, la ecología y los procesos evolutivos de los primeros organismos que desarrollaron una pluricelularidad incipiente (Herron y Michod, 2008; Ratcliff et al. 2012). Los estudios experimentales han demostrado que esta debió evolucionar de una manera relativamente rápida tras su origen, ya que se presume que la presión selectiva que sufrieron los primeros organismos pluricelulares fue relativamente alta (Ratcliff et al., 2012). Además del innegable aumento de tamaño, los organismos pluricelulares disfrutaban de una mayor complejidad como consecuencia de la formación de nuevas estructuras biológicas (Ratcliff et al., 2012). Un ejemplo de este aumento de la



complejidad se observa en la cooperación y división funcional entre las células que conforman el organismo (Kirk, 2005; Simpson, 2012). De hecho, esta cooperación celular es lo que mantiene la integridad (Merlo et al., 2006; Ratcliff et al. 2012); sin ella, el individuo sufre el riesgo de morir (lo que ocurre, por ejemplo, con los tumores cancerosos). Es por ello que existen múltiples mecanismos para garantizar la cooperación entre las células que componen la mayoría de las especies pluricelulares existentes (Grosberg y Strathmann 1998; Campisi et al., 2001; Leroi et al., 2003; Ostrowski et al., 2008; Ratcliff et al., 2012).

Sin embargo, se ha de diferenciar entre los mecanismos que permitieron el origen de la pluricelularidad, y aquellos que la mantienen, ya que las células que componen un organismo pluricelular incipiente podrían seguir estrategias no cooperativas (Ratcliff et al. 2012). ¿Cómo ocurre, entonces, la evolución a la pluricelularidad? Según Koschwanez et al. (2011), esta transición se realizó en tres pasos principales. En primer lugar, se produjo la aparición de agregados celulares indiferenciados; tras ello, se comenzó a generar una división funcional entre los diferentes tipos de células; finalmente, comenzó a primar la reproducción del organismo como un todo, en lugar de hacerlo como células individuales y por separado.

Para abordar el estudio de cómo surgieron los primeros agregados pluricelulares indiferenciados, existe un grupo de organismos modelo: las levaduras. Estos hongos unicelulares se dividen por gemación, formando una especie de racimo (Sullivan y Huffaker, 1992). Tal es el caso de *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E .C. Hansen, uno de los organismos modelo eucariotas más utilizados (Karathia et al., 2011), capaz de sufrir una rápida transición hacia la pluricelularidad cuando se dan una serie de condiciones determinadas (Ratcliff et al., 2012). En este punto, es posible priorizar el crecimiento de los agregados celulares por encima de las células individuales (Koschwanez et al., 2011; Ratcliff et al., 2012). Sin embargo, Driscoll y Travisano (2017) han propuesto el uso de *Kluyveromyces lactis* como organismo modelo para el estudio de los primeros estadios pluricelulares. Ambas levaduras desarrollan rápidamente mecanismos paralelos de formación de racimos multicelulares (copos de nieve o “snowflakes”; Driscoll y Travisano, 2017). De hecho, *K. lactis* es capaz de formar “snowflakes” en unos 10 días (~ 70 generaciones), aunque las formas unicelulares no desaparecen totalmente del medio (Driscoll y Travisano, 2017). Experimentalmente, la formación de “snowflakes” se consigue mediante la

sedimentación del cultivo, un proceso extremadamente sencillo de llevar a cabo en el laboratorio (Ratcliff et al., 2012; Driscoll y Travisano 2017). El sometimiento del cultivo a sedimentación representaría, de este modo, la presión selectiva hacia la pluricelularidad. Sin embargo, si deja de ejercerse esta presión, la condición de “snowflake” se pierde fácilmente. Es por ello que el mantenimiento de la presión selectiva, en este sentido, resulta imprescindible.

#### I.4. Antecedentes, hipótesis de partida y objetivos

Si bien se han realizado estudios previos de la adaptación de cianobacterias a ambientes extremos (López-Rodas et al., 2006a; Bañares-España et al., 2006, 2007, 2013; Baselga-Cervera et al., 2016, 2019; Melero-Jiménez et al., 2019) y, en particular, a ambientes sulfurosos (Fernández-Arjona, 2013; Bañares-España et al., 2016), nunca se ha aplicado una combinación de tres diseños experimentales en el marco de la Evolución Experimental (análisis de fluctuación, trinquete y rescate evolutivo) usando cianobacterias como modelo de estudio, y sulfuro como agente selectivo (Martín-Clemente et al., 2019). Por otra parte, estos estudios previos se han realizado con especies sensibles al sulfuro, con lo cual resulta de interés conocer si existen diferencias en la respuesta de diferentes especies con distinto grado de tolerancia al sulfuro. Estas especies tolerantes deberían poder localizarse en manantiales sulfurosos, ecosistemas que, como hemos mencionado, se encuentran presentes en la provincia de Málaga. Como consecuencia de la aplicación de estos experimentos de Evolución Experimental, es posible obtener cepas más tolerantes al sulfuro que sus cepas ancestrales, y se puede analizar cuál es mecanismo de tolerancia (aclimatación vs. adaptación) que permite la supervivencia de poblaciones de cianobacterias, *a priori* sensibles, en ambientes sulfurosos. Por otra parte, analizando las características de las cepas sensibles y resistentes, incluyendo su caracterización fotosintética en presencia y en ausencia de este agente selectivo, se puede arrojar luz sobre el mecanismo fisiológico que explique dicha tolerancia.

La influencia del acervo genético y de la intensidad de presión selectiva en la obtención y pérdida del carácter pluricelular en poblaciones unicelulares de levaduras se ha demostrado experimentalmente (Driscoll y Travisano, 2017). Sin embargo, no



existen estudios previos que analicen la influencia de la variabilidad genética de una población en la ocupación del medio bajo presión selectiva a favor y en contra del desarrollo del carácter pluricelular. Por ello, resulta interesante abordar el estudio de la ganancia de la condición de pluricelularidad haciendo hincapié sobre la reversión del carácter, es decir, el paso de organismos pluricelulares a organismos unicelulares. El cambio de enfoque en el estudio de la aparición de la pluricelularidad mediante el análisis de la reversión del carácter resulta desafiante, ya que existe unanimidad en la aceptación de la hipótesis de que una vez obtenido, el carácter pluricelular es muy difícil de perder (Muller, 1939; Bull y Charnov, 1985; Rebolleda-Gómez & Travisano, 2018, 2019).

### *I.4.1. Objetivos*

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral es doble y consiste, bajo el marco de la Evolución Experimental, en:

1. Estudiar la aparición de la tolerancia al sulfuro en cianobacterias con distinta sensibilidad al mismo, analizando la contribución de procesos evolutivos y fisiológicos en dicho proceso.
2. Estudiar el origen de la pluricelularidad, analizando cómo afecta la presión de selección y la diversidad genética a la reversión de dicho carácter, utilizando una especie de levadura como modelo.

Se intentará responder así dos preguntas clave: (i) ¿cómo aparece la tolerancia al sulfuro en cianobacterias?; y (ii) ¿de qué depende la aparición y mantenimiento de los organismos pluricelulares? Estos dos objetivos generales se abordarán en dos capítulos diferentes de esta Tesis, y allí se desglosarán en sus correspondientes objetivos específicos.

**CAPÍTULO II. DINÁMICA DE LA ADAPTACIÓN,  
RESCATE EVOLUTIVO Y FOTOSÍNTESIS BAJO  
SELECCIÓN POR SULFURO EN CIANOBACTERIAS: UN  
ESTUDIO COMPARATIVO DE LA TOLERANCIA AL  
SULFURO EN *MICROCYSTIS AERUGINOSA* Y  
*OSCILLATORIA* SP.**

---



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



## II.1. INTRODUCCIÓN

Cuando la Tierra se formó hace unos 4.600 millones de años, era inhóspita y carente de vida (Olson y Straub, 2016). Debieron transcurrir 2.000 millones de años para que se acumulase  $O_2$  hasta niveles significativos en la atmósfera (aunque mucho más bajos que los niveles actuales), fruto de la fotosíntesis oxigénica de los ancestros de las cianobacterias actuales (Flores y Herrero, 2014). Los antepasados de las cianobacterias desarrollaron la capacidad de utilizar electrones a partir de la fotólisis del agua, realizando la fotosíntesis con dos fotosistemas (PSI y PSII; Bussell y Kehoe, 2014), a diferencia de los organismos fotosintéticos anoxigénicos preexistentes, que poseían un solo fotosistema. En este sentido, las estimaciones de la antigüedad de la familia de genes del PSI y PSII son consistentes con las evidencias del registro geológico, que muestranciertos rastros de oxígeno a lo largo del eón Arcaico (4.000 - 2.500 millones de años; Cardona, 2018; Cardona et al., 2019). De estos hallazgos se puede inferir que la fotosíntesis oxigénica se originó hace ~ 3.000 millones de años (Wang et al., 2018). Como resultado de esta reacción, se comenzó a producir  $O_2$  a tasas más elevadas que en períodos anteriores, oxidando significativamente la atmósfera hace 2.400 - 2.000 millones de años (Bekker et al., 2004), lo que se denomina gran evento de oxidación (GEO). En otras palabras, las formas primitivas de oxidación del agua, llevadas a cabo por fotosistemas ancestrales podrían haberse originado ~1.000 millones de años antes del GEO (Cardona et al., 2019; Sánchez-Baracaldo y Cardona, 2020). Por otra parte, los fotosistemas de las primitivas cianobacterias evolucionaron hacia el eón Arcaico tardío (Blank y Sánchez-Baracaldo, 2010; Schirrneister et al., 2015) o la era Paleoproterozoica temprana (Shih et al., 2016). Así, la fotosíntesis oxigénica no sólo proporcionó a las primeras cianobacterias la ventaja de una fuente ilimitada de  $e^-$  a partir del  $H_2O$  sino que la producción de  $O_2$  como producto de desecho también cambió profundamente la composición de los océanos, los continentes y la atmósfera (Sessions et al., 2009). El GEO fue un acontecimiento trascendental tanto para la biosfera como para la geosfera, allanando el camino para la evolución de la vida tal y como hoy la conocemos (Sessions et al., 2009). Así, se considera que el mayor cambio global que ha acontecido en la Tierra (probablemente irreversible) es el GEO (Kirschvink et al., 2000; Schirrneister et al., 2013).

Canfield (1998), basándose en estudios previos (Cloud, 1972; Holland, 1984; Knoll, 1992; Karhu y Holland, 1996), propuso un modelo en dos etapas para explicar el aumento de los niveles de oxígeno atmosférico durante el GEO. En la primera etapa, hace 2.300 - 2.000 millones de años, había ya suficiente O<sub>2</sub> en la atmósfera como para que se generaran de manera espontánea muchas reacciones redox, pero no el suficiente como para que difundiese hasta el océano más profundo. En esta fase, y debido a procesos de meteorización y lixiviación, se produjo un aumento en los niveles de azufre en el océano. Al reducirse el azufre, se produjo sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S), que comenzaría a retener Fe del medio acuático en forma de FeS. Así, grandes áreas del océano se volvieron euxínicas (anóxicas y sulfhídricas, Olson y Straub, 2016). En la segunda etapa, ya existía suficiente O<sub>2</sub> como para oxidar paulatinamente el H<sub>2</sub>S de las aguas oceánicas. Siguiendo este modelo, el océano Proterozoico temprano experimentó una transición lenta de un ambiente ferroso a uno sulfuroso, un proceso consistente con el registro de isótopos de azufre sedimentarios no hidrotermales (Hayes et al., 1996).

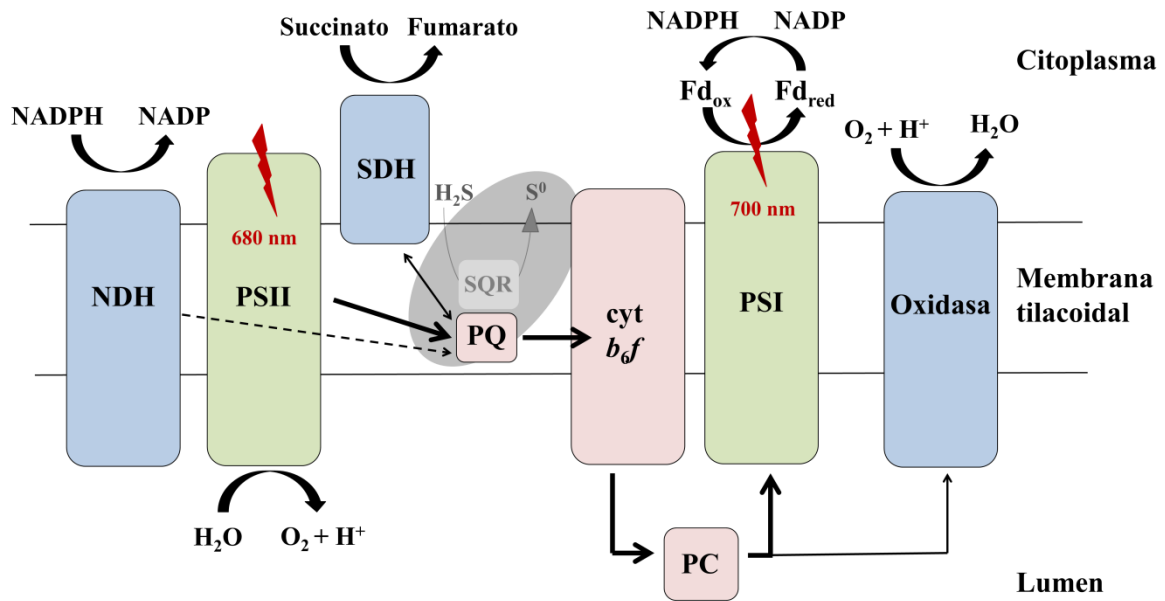
La fotosíntesis oxigénica surgió a partir de ancestros fotótrofos anoxigénicos hoy en día extintos (Hohmann-Marriott y Blankenship 2011; Sánchez-Baracaldo y Cardona, 2020). A menudo se asume que la aparición de la fotosíntesis oxigénica coincidió con el origen de las cianobacterias (Soo et al., 2017). Si bien, hasta cierto punto, es razonable pensar que ambos eventos ocurrieran de manera paralela, existen diferencias en cuanto al origen de la fotosíntesis oxigénica y las cianobacterias (Sánchez-Baracaldo y Cardona, 2020). A nivel de la familia de genes, el origen de las proteínas del centro de reacción dilucida el origen de la oxidación fotosintética del agua (Cardona, 2018; Cardona et al., 2019). A nivel de organismo, los enfoques filogenómicos desentrañan la historia evolutiva de los organismos que actualmente son capaces de realizar la fotosíntesis oxigénica (Blank & Sánchez-Baracaldo, 2010; Schirromeister et al., 2013, 2016). Como se ha mencionado anteriormente, las cianobacterias poseen dos fotosistemas (PSI y PSII; Fig. II.1.), mientras que los fotótrofos anoxigénicos poseen sólo un tipo de fotosistema, análogo bien al PSI o al PSII (Sánchez-Baracaldo y Cardona, 2020). Existe una corriente de investigadores que han propuesto que el linaje de cianobacterias proviene de una ‘protocianobacteria’ ancestral, poseedora de dos fotosistemas anoxigénicos originados por duplicación (Mulkidjanian et al., 2006; Martin et al., 2018). Por otra parte, otras investigaciones sugieren que la coexistencia de dos fotosistemas se produjo por transferencia horizontal de genes (Raymond et al., 2002).

Sin embargo, en su reciente trabajo, Sánchez-Baracaldo y Cardona (2020) argumentan que los fotosistemas desarrollaron la capacidad de realizar la oxidación del agua antes del origen de las primeras cianobacterias (Cardona et al., 2019) y que su especialización continuada llevó a lo que hoy se conoce como fotosíntesis oxigénica (Cardona, 2017; Cardona, 2019; Cardona y Rutherford, 2019). Por lo tanto, dado que la fotosíntesis oxigénica parece haber evolucionado en organismos similares a las cianobacterias que vivían en aguas ricas en  $\text{H}_2\text{S}$  (Battistuzzi et al., 2004), este compuesto, sin duda alguna, habrá influido en las etapas primarias de la evolución de la fotosíntesis oxigénica (Kabil y Banerjee, 2010).

Por otra parte, varios factores apoyan el hecho de que fuera el  $\text{H}_2\text{S}$ , en lugar del  $\text{H}_2$ , la fuente de energía primigenia (Olson y Straub, 2016): (i) las fuentes hidrotermales, donde se cree que se pudo originar la vida, liberan más  $\text{H}_2\text{S}$  que  $\text{H}_2$ ; (ii) los sulfuros de los metales de transición ( $\text{FeS}$ ) pueden potencialmente liberar (producir) más  $\text{H}_2\text{S}$  por volumen a partir de depósitos de  $\text{FeS}$  ( $55,000 \text{ mol m}^{-3}$  de  $\text{FeS}$ ) que  $\text{H}_2$  a partir de olivino ( $500 \text{ mol m}^{-3}$  de olivino); Fisher, 2005; Martin et al., 2008); (iii) la oxidación de  $\text{H}_2\text{S}$  produce más energía que la oxidación de  $\text{H}_2$ ; y (iv) la oxidación completa de  $\text{H}_2\text{S}$  a  $\text{H}_2\text{SO}_4$  libera ocho electrones (suficiente para reducir completamente el carbono a metano) mientras que la de  $\text{H}_2$  libera solo dos. Estas evidencias apoyan que el  $\text{H}_2\text{S}$  fuera la fuente más probable de energía para la producción primaria pre-GEO, por lo que la fotosíntesis anoxigénica basada en  $\text{H}_2\text{S}$  sería, de este modo, ancestral (Allen, 2005; Martin et al., 2008). En este mar primigenio arqueano pre-GEO, la alta intensidad de luz y el denso crecimiento de los organismos fotosintéticos anoxigénicos en la zona fótica prácticamente podrían haber agotado las reservas de  $\text{H}_2\text{S}$ , manteniendo el S en estado oxidado, aunque la acción respiratoria de los organismos heterótrofos reductores de azufre produjera azufre en estado reducido (Martin et al., 2008). Esto supone que, en los estadios anteriores a la aparición de la fotosíntesis oxigénica, ni la cantidad luz ni el  $\text{CO}_2$  habrían sido limitantes para la producción primaria; ahora bien, la disponibilidad de moléculas reductoras habría limitado el crecimiento de los productores primarios. Si bien las especies de S oxidadas se reducirían a  $\text{H}_2\text{S}$  mediante organismos reductores de sulfato, estas reacciones parecen haberse realizado a un ritmo más lento que la fotooxidación (Martin et al., 2008). Con el reemplazo del  $\text{H}_2\text{S}$  por la molécula de  $\text{H}_2\text{O}$  como principal donador de  $e^-$  para la fotosíntesis por los ancestros de las cianobacterias, el reductor ya no habría sido el elemento limitante.

A diferencia del resto de organismos fotosintéticos oxigénicos, la membrana tilacoidal de las cianobacterias alberga las cadenas de transporte de  $e^-$  de los procesos respiratorio y fotosintético (Vermaas et al., 2001; Fig. II.1). Es decir, no sólo se entrecruzan ambos procesos, sino que se comparten ciertas enzimas de la cadena de transporte: el conjunto de plastoquinonas (PQ), el complejo de citocromo  $b_6f$  y la plastocianina (PC)/cyt  $c_6$  (Vermaas et al., 2001). La fracción fotosintética de la cadena de transporte de  $e^-$  en cianobacterias es esencialmente idéntica a la de las plantas; de hecho, la teoría más aceptada es que los cloroplastos de las células fotosintéticas eucariotas en las plantas poseen un origen cianobacteriano (Sagan, 1967; Archibald, 2015; de Vries et al., 2016). No obstante, una diferencia importante en la cadena de transporte de  $e^-$  entre plantas y cianobacterias es la estequiometría PSII:PSI. Mientras que en plantas la proporción entre ambos fotosistemas es, normalmente,  $\sim 1$ , en cianobacterias la relación estequiométrica es  $< 1$ , pues el número de PSI es mayor que el de PSII (Vermaas et al., 2001). Una posible explicación para esta diferencia de las cianobacterias con respecto a las plantas es la participación del PSI en un alto flujo cíclico de  $e^-$ , en el cual los  $e^-$  fluyen desde el PSI a la PQ vía ferredoxina (Fd), al citocromo  $b_6f$ , y de ahí al PSI de nuevo (Bendall y Manasse, 1995).

Sin embargo, no se tienen evidencias experimentales de este fenómeno, por lo que se ha propuesto también que, dado que el flujo de electrones respiratorio confluye en el “pool” de PQ, una mayor cantidad de PSI puede garantizar que éste se mantenga oxidado a altas intensidades de luz, minimizando el daño oxidativo (Andersson y Barber, 1996), así como para competir con la citocromo oxidasa cuando hay luz disponible, maximizando así la cantidad de electrones que se pueden usar para la fijación de  $CO_2$  (Vermaas et al., 2001).



**Fig. II.1** Representación esquemática de las rutas de transporte de electrones, fotosintética y respiratoria, presentes en las membranas tilacoidales en cianobacterias. Las flechas indican la transferencia de electrones, y los rayos designan la energía en forma de luz que excita los pigmentos en los PSI y PSII. Los complejos de transferencia de electrones involucrados únicamente en la transferencia de electrones fotosintéticos (en verde) son PSII y PSI, mientras que los específicos para el flujo de electrones respiratorio (en azul) incluyen NDH, SDH y la oxidasa terminal. La PQ, el cyt  $b_6f$  y la PC son compartidos por ambas vías (en rosa). Las flechas de transferencia de electrones que involucran a la SDH muestran que el flujo de electrones puede ocurrir en ambas direcciones dependiendo de las concentraciones relativas de PQ oxidada y reducida, succinato y fumarato. Mediante una elipse gris, se representa como, con  $H_2S$  como donante alternativo de  $e^-$  a través de la enzima SQR, se produciría la fotosíntesis anoxigénica en algunos grupos de cianobacterias. Abreviaturas: cyt  $b_6f$ , complejo citocromo  $b_6f$ ;  $Fd_{ox}$  y  $Fd_{red}$ , ferredoxina en formas oxidadas y reducidas, respectivamente; NDH, NADPH deshidrogenasa; PC, plastocianina; PQ, plastoquinona; PSI, fotosistema I; PSII, fotosistema II; SDH, succinato deshidrogenasa; y SQR, sulfuro quinona reductasa. Tomado y modificado de Vermaas et al., 2001.

A pesar de haber sido un compuesto abundante en el contexto de aparición de las primeras cianobacterias, el  $H_2S$  es un compuesto bastante tóxico para este grupo y el resto de organismos. Ataca el metabolismo aeróbico, deteniendo la respiración y la fotosíntesis oxigénica de manera inmediata, ya que induce la inhibición de la enzima citocromo c oxidasa (Beauchamp et al., 1984; Cooper y Brown, 2008, Klatt et al., 2015) y el complejo de producción de oxígeno (Sivaraja et al., 1988). Esta última enzima está involucrada en la fotólisis de la molécula de agua, por lo que se detiene el flujo de  $e^-$  hacia el centro de reacción del PSII y, consecuentemente, hacia la cadena transportadora

(Cohen et al., 1986; Miller y Bebout, 2004). Así, el H<sub>2</sub>S resulta letal, incluso a concentraciones muy bajas, para la mayoría de cianobacterias (Cohen et al. 1986; Miller y Bebout 2004). Sin embargo, el nivel de tolerancia de las cianobacterias al H<sub>2</sub>S varía dentro del grupo, dependiendo de los niveles ambientales de H<sub>2</sub>S, ya que el grado de tolerancia a sulfuro requerida depende de los niveles existentes en el medio (Cohen et al., 1986; Miller y Bebout, 2004). De hecho, Cohen et al. (1986) realizaron una clasificación de las cianobacterias en función del nivel de tolerancia del PSI y PSII al H<sub>2</sub>S y la capacidad de inducción de la fotosíntesis anoxygenica: (i) cianobacterias con fotosíntesis oxigenica sensible al H<sub>2</sub>S a concentraciones entre 10 - 50 μM H<sub>2</sub>S; (ii) con fotosíntesis oxigenica resistente al H<sub>2</sub>S hasta una concentración en torno a 300 μM; (iii) con fotosíntesis oxigenica resistente al H<sub>2</sub>S, aunque algo menor que el tipo (ii), concurrente con la inducción parcial de fotosíntesis anoxygenica cuando los niveles exceden 200 μM H<sub>2</sub>S; y (iv) aquellas en las que la fotosíntesis anoxygenica dependiente de H<sub>2</sub>S reemplaza la fotosíntesis oxigenica a concentraciones por encima de 1 mM H<sub>2</sub>S, ya que esta última se bloquea a concentraciones relativamente bajas, aunque muy variables, de sulfuro.

La respuesta más común, exhibida por la gran mayoría de las cianobacterias, es la fotosíntesis oxigenica sensible al sulfuro (Myers y Richardson, 2009). Menos comunes son los últimos tres mecanismos, por los cuales las cianobacterias pueden tolerar el sulfuro (Cohen et al., 1986; Miller y Bebout, 2004; Myers y Richardson, 2009). Algunas cianobacterias (de los géneros *Synechococcus* y *Oscillatoria*) poseen fotosíntesis oxigenica resistente al sulfuro, lo que permite su crecimiento durante la exposición a este agente tóxico (Castenholz et al., 2001; Myers y Richardson, 2009). El tercer mecanismo es la inhibición parcial de la fotosíntesis oxigenica combinada con la estimulación de la fotosíntesis anoxygenica (Cohen et al., 1986), en la que el sulfuro actúa como donante de electrones al PSI. La capacidad de realizar fotosíntesis usando tanto H<sub>2</sub>O como H<sub>2</sub>S como donadores de electrones, permite una fijación eficiente de CO<sub>2</sub> por cianobacterias en medios que exhiben transiciones entre condiciones oxidantes y reductoras. Las cianobacterias que muestran esta capacidad incluyen especies de los géneros *Microcoleus* y *Oscillatoria* (Castenholz y Utkilen, 1984; Cohen et al., 1986; Garcia-Pichel y Castenholz, 1990; Myers y Richardson, 2009). El cuarto mecanismo es la inhibición total del PSII (fotosíntesis oxigenica) y la inducción de la fotosíntesis anoxygenica utilizando sulfuro como donante de electrones (Cohen, et al., 1986; Miller

& Bebout, 2004). Un ejemplo de una cianobacteria que exhibe esta característica es *Oscillatoria limnetica* (Cohen et al., 1984), que ha sido reclasificada como *Geitlerinema* PCC9228 (Castenholz et al., 2001).

Las especies de cianobacterias que poseen la capacidad de realizar fotosíntesis anoxigénica usando  $H_2S$  como donante de electrones requieren una enzima deshidrogenasa específica (Arieli et al., 1994; Theissen et al., 2003). Existen, al menos, tres isoenzimas, no relacionadas filogenéticamente, que oxidan el  $H_2S$ : una sulfuro quinona-oxidorreductasa (SQR, Visser et al., 1997), una flavo-citocromo-c sulfuro deshidrogenasa (FCSD, Reinartz et al., 1998) y una proteína similar a la tiosulfato sulfurtransferasa, SoxL (Frigaard y Dahl, 2008). Las tres enzimas permiten que se produzca la fotosíntesis anoxigénica mediante la transferencia de electrones desde el  $H_2S$  hasta el PSI. La encima FCDS realiza el traspaso vía citocromo c, y la SQR a través del conjunto de quinonas (Hamilton et al. 2018, Arieli et al., 1994; Theissen et al., 2003, Sousa et al., 2018). Sin embargo, en cianobacterias, sólo se han podido aislar e identificar enzimas del tipo SQR (Fig. II.1; Sousa et al., 2018). Estudios recientes (Hamilton et al., 2018) sugieren que la tasa máxima de fotosíntesis anoxigénica no sólo depende del nivel de sulfuro disponible. Esto es, a niveles bajos de sulfuro, parece ser que es la propia cinética enzimática de la SQR la que modula la tasa a la que se realiza la fotosíntesis anoxigénica, mientras que a concentraciones de sulfuro altas, es la intensidad de luz el factor limitante (Klatt et al., 2015a, 2016). Además, la afinidad de la SQR por el  $H_2S$  y el “pool” de plastoquinonas, por ejemplo, varía sustancialmente entre las cianobacterias estudiadas que poseen esta enzima (de Wit y van Gemerden, 1987; Castenholz et al., 2001; Griesbeck et al., 2000; Klatt et al., 2015a, 2016). Con todo, realizar estas observaciones en el medio natural es, cuanto menos, complicado, teniendo en cuenta la variabilidad de las adaptaciones específicas a los niveles de sulfuro en ambientes naturales, normalmente fluctuantes, y a la irradiancia cambiante en el medio ambiente, sobre todo en los tapetes microbianos (Hamilton et al., 2018).

Es interesante señalar que la capacidad de realizar fotosíntesis anoxigénica usando  $H_2S$  como donante de electrones siempre se ha considerado una habilidad heredada por las cianobacterias de sus antepasados (Oren et al., 1977; Padan, 1979). Sin embargo, Hamilton et al. (2016) postularon que esta capacidad es consecuencia de un estadio intermedio y transitorio que sufrieron las cianobacterias durante la evolución de la fotosíntesis oxigénica, en el que usaron  $H_2O$  y  $H_2S$ , de manera alternativa, en zonas





fóticas y sulfhídricas. De hecho, la aparición de la enzima SQR en la filogenia de las cianobacterias parece ser polifilética, apuntando a posibles eventos de transferencia lateral de genes entre estos organismos (Sousa et al., 2018). Además, se ha demostrado que la tolerancia del PSII al H<sub>2</sub>S en cianobacterias es un carácter polifilético en este grupo (Miller y Bebout, 2004; Sánchez-Baracaldo et al., 2005). Este hecho respalda la idea de que el uso de H<sub>2</sub>S en este grupo no es un rasgo primigenio, a diferencia de la fotosíntesis oxigénica, que se confirma que es ancestral (Miller y Bebout, 2004; Sánchez-Baracaldo et al., 2005). De hecho, Miller y Bebout (2004) estudiaron el efecto del sulfuro en doce cepas de cianobacterias, señalando que la tolerancia a este compuesto estaba correlacionada con la concentración en el ambiente del cual se habían aislado dichas poblaciones. En otras palabras, demostraron que existe una correlación positiva entre la tolerancia del PSII al sulfuro y los niveles de sulfuro presentes en el medio en que se desarrolla una población. Además, observaron que este carácter fenotípico de tolerancia al sulfuro no estaba correlacionado filogenéticamente, lo que sugiere que la evolución del aparato fotosintético cianobacteriano en respuesta a los cambios en el sulfuro ambiental no está constreñida por la historia evolutiva previa. Es decir, la tolerancia se puede adquirir o puede desaparecer relativamente rápido en respuesta a la variación ambiental en los niveles de sulfuro (Miller y Bebout, 2004). Estos autores indican que esta falta de restricción puede ayudar a explicar la polifilia de la tolerancia al sulfuro en cianobacterias, siendo un rasgo dinámico que se puede ganar (o perder) en este grupo de organismos en respuesta a cambios en la concentración de sulfuro ambiental.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, surge una interesante cuestión eco-evolutiva que puede ser abordada desde la perspectiva de la Evolución Experimental: ¿cómo aparece la tolerancia al sulfuro en cianobacterias? Además, se plantea otra cuestión desde un punto de vista fisiológico, ¿cuáles serían las características fotosintéticas que podrían explicar dicha tolerancia?

En un trabajo previo publicado por el grupo de investigación en el que se enmarca esta Tesis Doctoral, se demostró que una cepa perteneciente a la especie de cianobacterias *Microcystis aeruginosa*, procedente de aguas no sulfurosas, consiguió adaptarse a las aguas sulfurosas de Los Baños del Vilo (Periana, Málaga; Fernández-Arjona et al., 2013). Previamente, en otro cuerpo de aguas sulfurosas (La Hedionda, Casares, Málaga) se detectó la presencia de la cianobacteria *Oscillatoria* sp. (Flores-

Moya et al., 2005) que sería, en principio, tolerante al sulfuro. Por ello cabe preguntarse si otra cepa de *M. aeruginosa*, diferente a la anterior, podría también llegar a adaptarse por mutaciones preselectivas a las aguas sulfurosas de La Hedionda. Por otro lado, dado que la historia evolutiva previa condiciona la adaptabilidad de las poblaciones, se podría esperar que la máxima tolerancia al sulfuro que pueda alcanzar *Oscillatoria* sp. sea, en principio, mayor a la que pudiera conseguir *M. aeruginosa*. Igualmente, cabe pensar que este límite podría no ser igual en distintas cepas de la misma especie.

El análisis de fluctuación propuesto por Luria y Delbrück (1943), originalmente diseñado para bacterias en medio sólido y modificado posteriormente para microalgas y cianobacterias en medio líquido (López-Rodas et al., 2001), permite discernir si el proceso de adquisición de tolerancia por parte de los microorganismos a un agente selectivo es fruto de procesos de aclimatación o, alternativamente, se consigue por la selección de nuevas variantes genéticas originadas al azar, esto es, por adaptación. Este fue el diseño experimental aplicado en el caso de la cepa Ma1G de *M. aeruginosa* cultivada durante varias generaciones en las aguas de los Baños de Vilo (Fernández-Arjona et al., 2013) y que permitió determinar que la tolerancia observada en dicha cepa tras varias generaciones derivó de la presencia de mutaciones en la población, previas a la exposición al agente selectivo. El análisis de fluctuación fue aplicado unos años antes y por primera vez en microorganismos fotosintéticos en diferentes especies de microalgas y cianobacterias expuestas a diferentes cuerpos de aguas extremas (Costas et al., 2007, 2008; López-Rodas et al., 2007, 2008a, b, 2009, 2011; Baselga-Cervera et al., 2016, 2019) concluyendo en la mayoría de los casos que la supervivencia en dichas aguas era fruto de la interacción mutación-selección. Nuestra hipótesis, por tanto, es que otra cepa de *M. aeruginosa* también pueda llegar a tolerar las aguas de la Hedionda a través de un proceso de adaptación. Por otra parte, la tasa a la que surgen las mutaciones aleatorias en esta cepa se puede calcular en el caso de que exista adaptación al sulfuro, y esta tasa puede diferir a las observadas con otras cepas y/o otros agentes selectivos. Existen diferentes enfoques para realizar esta estimación (Rosche y Foster, 2000; Foster, 2006). Debido a las limitaciones metodológicas impuestas por un análisis de fluctuación utilizando cultivos líquidos, la proporción de cultivos del Set 1 que no muestran células resistentes (estimador  $P_0$ ; Luria y Delbrück, 1943) se utilizó para calcular dicha tasa de mutación ( $\mu$ ).

Una vez aislados los mutantes resistentes a diferentes agentes selectivos mediante el análisis de fluctuación, se pudo estudiar también si estas mutaciones que permitían la supervivencia en condiciones previamente letales conllevaban una disminución de la eficacia biológica (un estimador del coste fisiológico de la mutación, Lenski, 1998; Anderson y Levin, 1999; López-Rodas et al., 2006b). La evidencia más importante de dicho coste fisiológico es la disminución de la tasa de crecimiento de las variantes mutantes en comparación con las variantes ancestrales, lo que genera un balance mutación-selección en condiciones no selectivas. No obstante, también debe reflejarse en otros caracteres fenotípicos. En el caso de los estudios mencionados anteriormente, realizados con microalgas y cianobacterias, siempre se ha detectado una disminución de la tasa de crecimiento de los mutantes resistentes frente a las cepas silvestres en ausencia del agente selectivo, así como cambios en la morfología celular (Costas et al., 2007, 2008; López-Rodas et al., 2007, 2008a, b, 2009, 2011). Este fue el caso también de la tasa de crecimiento de los mutantes de la cepa Ma1G resistentes al sulfuro en ausencia del mismo (Fernández-Arjona et al., 2013). Además, las cepas resistentes mostraron un aumento significativo del volumen celular, una mayor cantidad de Chl *a* por célula, y además, una menor eficiencia fotosintética (Bañares-España et al., 2016). Es de esperar, por tanto, que las cepas resistentes a las aguas de La Hedionda también manifiesten este coste fisiológico.

Ambos cuerpos de aguas sulfurosas mencionados presentan una concentración de sulfuro en torno a 0,2 mM (Flores-Moya et al., 2005; Fernández-Arjona et al., 2013); sin embargo, ¿sería posible aumentar la presión de selección y ser capaz de detectar resistencia a niveles más elevados de sulfuro? Reboud et al. (2007) propusieron un diseño experimental, el experimento de trinquete, que maximizaba la aparición de mutantes en la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* resistentes a un herbicida. Este diseño experimental permite analizar cuál es la tolerancia máxima de poblaciones independientes de un organismo, sometiéndolas a concentraciones cada vez mayores de un agente selectivo en un ciclo recurrente de selección. Este diseño experimental se modificó para estudiar la máxima tolerancia de diferentes microalgas y cianobacterias al herbicida simazina y al cobre, encontrándose que el límite de tolerancia máxima para el mismo agente selectivo variaba entre diferentes grupos taxonómicos y ecológicos de microorganismos fotosintéticos, y que este límite también difería según el agente selectivo utilizado (Huertas et al., 2010, 2011; Rouco et al., 2014). Teniendo en cuenta

que la máxima capacidad de adaptación al sulfuro depende de la historia evolutiva previa (Miller y Bebout, 2004), nuestra hipótesis es que la cepa de *Oscillatoria* aislada de aguas sulfurosas alcanzará un límite de tolerancia mayor que las cepas de *M. aeruginosa*, que no poseen una historia previa de crecimiento en presencia de sulfuro. Además, es posible realizar un experimento complementario para conocer si el mecanismo que ha permitido alcanzar dicha tolerancia a niveles inicialmente letales de sulfuro ha sido la aclimatación o la adaptación (Rouco et al., 2014).

Debe tenerse en cuenta que todos los estudios citados anteriormente se realizaron con cepas de microorganismos que tienen una historia eco-evolutiva homogénea (es decir, todas las células del cultivo experimental se fundaron a partir de inóculos con una historia similar, y se expusieron a una presión de selección parecida). Sin embargo, se sabe que los procesos evolutivos son contingentes, es decir, dependientes de la historia previa (Gould, 1989; Travisano et al., 1995; Blount et al.; 2008, Flores-Moya et al.; 2008, 2012). Por lo tanto, la posibilidad de que las poblaciones naturales expuestas repentinamente a condiciones letales puedan adaptarse a través de la selección natural, un proceso conocido como "rescate evolutivo" (RE), podría depender de la historia eco-evolutiva previa (Gonzalez et al., 2013). De hecho, en poblaciones experimentales de bacterias y levaduras, se ha encontrado que una mayor variación genética favorece la posibilidad de eventos de RE, y que la tasa a la que aumenta la presión selectiva es inversamente proporcional a la capacidad de proliferar en condiciones letales (Bell y Gonzalez, 2011; Lindsey et al., 2013). La mayoría de estos estudios se han realizado con virus, bacterias, levaduras y microalgas (Elena y Lenski, 2003; Garland y Rose, 2009; Bell, 2012; Lachapelle y Bell, 2012; Baselga-Cervera et al., 2016), pero las singulares características de las cianobacterias también las convierten en un grupo de organismos modelo ideal para su uso en este tipo de aproximación de evolución experimental. Por ello puede ser también relevante conocer cómo la historia previa de una cianobacteria sensible al sulfuro, en este caso, *M. aeruginosa*, podría afectar la dinámica de RE, que permitiría su supervivencia a concentraciones inicialmente letales de sulfuro. Así, se puede analizar el efecto de la dispersión de individuos entre poblaciones dentro de una metapoblación (dispersión genética) a diferentes ritmos de cambio en las condiciones ambientales (distintas velocidades de incremento de la concentración de sulfuro).

La existencia de tolerancia a la presencia de sulfuro debería implicar, asimismo, una serie de características fotosintéticas que expliquen dicha resistencia. Como se ha mencionado anteriormente, las especies elegidas para este estudio varían significativamente en su tolerancia al sulfuro. *Microcystis aeruginosa*, procedente de aguas no sulfurosas, se espera que pertenezca al grupo (i) descrito por Cohen et al. (1986). *Oscillatoria* sp., por su parte, representa un taxón ampliamente estudiado en relación a su resistencia al sulfuro (Cohen et al., 1975ab, 1977, 1986; Belkin y Padan, 1983; Shahak et al., 1987; Arieli et al., 1991), pudiendo pertenecer, dependiendo de la especie al grupo (ii) o (iii) de Cohen et al., (1986). Aunque previamente se habían estudiado las características fotosintéticas de mutantes resistentes al sulfuro de *M. aeruginosa* (Bañares-España et al. 2016), dicha caracterización se realizó en ausencia de sulfuro. No obstante, el estudio de estas características en presencia de este agente selectivo puede dar idea de los mecanismos que permiten dicha tolerancia, como el grado de tolerancia del PSII, que puede ser estimado mediante fluorescencia (Miller y Bebout, 2004), o debido a la existencia de fotosíntesis anoxigénica dependiente de sulfuro, analizando la incorporación de  $^{14}\text{C}$  (Myers y Richardson, 2009; Hamilton et al. 2018).

Así, los objetivos específicos que se plantean en este capítulo son:

1. Determinar la capacidad de adaptación de *M. aeruginosa* a las aguas sulfurosas de La Hedionda, así como la dinámica de rescate evolutivo de esta especie en presencia de sulfuro.
2. Estimar la máxima tolerancia de *Oscillatoria* sp. y *M. aeruginosa* al sulfuro, identificando el mecanismo (aclimatación vs. adaptación) implicado en dicha resistencia.
3. Evaluar el coste de la resistencia al sulfuro en términos morfológicos, fotosintéticos y de crecimiento en ambas especies.
4. Caracterizar fotosintéticamente las cepas silvestres y resistentes de ambas especies en presencia de sulfuro, e identificar su posible mecanismo de tolerancia.

## II.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### II.2.1. Recolección de muestras y caracterización del manantial de La Hedionda

#### II.2.1.1. El manantial de los Baños de la Hedionda

El manantial de Los Baños de La Hedionda (Fig. II.2) se encuentra en el río Manilva (Casares, Málaga; latitud: 36.398063, longitud: -5.263059). Se trata de una surgencia sulfurosa subterránea que desemboca en una balsa de  $5 \times 5 \times 1$  m (Jiménez-Sánchez et al., 2011), y debe su nombre al olor que genera su nivel de azufre. La surgencia se compone de dos sectores: uno externo, que es el río propiamente dicho, y otro interno, techado, equipado para el baño, que recibe el nombre de Baños de La Hedionda.

El agua de La Hedionda (ALH) se considera de naturaleza bicarbonatada - clorurada cálcica - sódica, de mineralización moderada - alta ( $842 \mu\text{S cm}^{-1}$ ), con una temperatura media de  $19,9 \text{ }^\circ\text{C}$  (IGME-JA, 1991), un pH 7,25 (Jiménez-Sánchez et al., 2011), y con propiedades mineromedicinales sulfuradas en el rango a la concentración descrita en otros manantiales sulfurosos (Fernández-Arjona et al., 2013; Armijo et al., 2017). Así, el ALH se ha utilizado con fines curativos, principalmente como remedio para las afecciones de la piel, ya que el sulfuro actúa como un poderoso bactericida y fungicida.

De hecho, se cree que el origen de estos baños se remonta al emperador romano Julio César. Parece ser que él mismo los mandó construir con el objetivo de que tanto él, como sus tropas, aliviaran sus enfermedades de la piel en este manantial sulfuroso natural ([http://www.malaga.es/es/turismo/patrimonio/lis\\_cd-5490/banos-romanos-hedionda-casares-rincon-singular-patrimonio-hidraulico](http://www.malaga.es/es/turismo/patrimonio/lis_cd-5490/banos-romanos-hedionda-casares-rincon-singular-patrimonio-hidraulico)).



**Fig. II.2** Los Baños de La Hedionda, con la parte techada a la izquierda, y la zona externa a la derecha (foto originalmente tomada por el Dr. Andreas Reul).

Dado que solo existían algunos estudios en los que se había caracterizado hidrológica y químicamente este cuerpo de agua (IGME-JA, 1991), Flores-Moya et al. (2005) realizaron un estudio de los microorganismos fotosintéticos presentes en dicho manantial y sus niveles de sulfuro. Mostraron que la comunidad fitoplanctónica del manantial de La Hedionda poseía una riqueza en microalgas muy baja, siendo el alga verde *Spirogyra* el género más abundante. La cianobacteria *Oscillatoria*, así como las diatomeas *Navicula*, *Nitzschia* y *Achnanthes*, también estaban representadas, aunque en menor número. Además, observaron unos niveles de sulfuro en el ALH en julio de 2003, de  $0,22 \pm 0,01$  mM ( $n = 5$ ; Flores-Moya et al. 2005).

### II.2.1.2. Medidas de pH, concentración de sulfuro y concentración de iones en las aguas de La Hedionda

Se realizaron medidas del pH del agua utilizando un pH - metro portátil (Hanna HI 9125), a lo largo de un ciclo anual (junio 2016 - mayo 2017), obteniéndose una media de  $7,23 \pm 0,06$  ( $n = 20$ ), similar a la reportada en estudios previos (pH 7,25; Jiménez-Sánchez et al. 2011). Teniendo en cuenta que el  $pK_{a1}$  del  $H_2S$  es de 6,98 a 20 °C, las especies químicas  $H_2S$  y  $HS^-$  se encontrarían en una proporción de alrededor de 35% y 65%, respectivamente. En aras de simplificar la nomenclatura, se usará el término

“sulfuro” para referirse al total de las tres especies químicas disueltas en el agua:  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{HS}^-$  y  $\text{S}^{2-}$ .

Para medir la concentración total de sulfuro disuelto en el agua se realizaron medidas *in situ* a lo largo del mismo ciclo indicado para el pH. En cada muestreo, se realizaron tres medidas utilizando un colorímetro portátil multiparámetro DR900 (Hatch Co., Loveland, CO, EEUU), cuya medida se basa en el método del azul de metileno (Pachmayr, 1960; Cline, 1969; ver apartado II.2.2.1.).

Con el objetivo de determinar la concentración de algunos de los aniones y cationes presentes en el agua durante el mismo ciclo anual, se tomaron muestras de 500 mL de ALH en botellas de polietileno que se mantuvieron en oscuridad y frío hasta que las muestras se congelaron a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .

La concentración de diferentes aniones y cationes se analizó por cromatografía iónica. En concreto se midieron los niveles de cloruro ( $\text{Cl}^-$ ), nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), fosfato ( $\text{PO}_4^{2-}$ ), potasio ( $\text{K}^+$ ), sodio ( $\text{Na}^+$ ), calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ). Las medidas se realizaron mediante un cromatógrafo 930 Compact IC Flex (Methrom), utilizando una columna Metrosep C3 250/4.0 para la determinación de los cationes y una columna Metrosep A Supp 7-250/4.0 para la determinación de aniones. Esta cuantificación se realizó en las instalaciones de los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI, Universidad de Málaga).

Por otra parte, dado que no podía ser determinado por cromatografía, la concentración de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) se analizó por reacción colorimétrica basada en el método de Berthelot (Slawyk y MacIsaac, 1972).

### II.2.1.3. Recolección de muestras de agua La Hedionda y caracterización de la comunidad fitoplanctónica

Semanalmente, durante junio y julio de 2016, se recolectaron muestras de ALH de la zona interior de los baños para el experimento de análisis de fluctuación (ver apartado II.2.5.1.1.). El agua se almacenó en botellas de polietileno de 1,5 L cerradas herméticamente y sin burbujas de aire, en oscuridad y a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . Además, *in situ*, se midió la concentración de sulfuro (ver apartado II.2.2.1.), que osciló entre 97 y 207  $\mu\text{M}$  a lo largo de las seis semanas de recolección, con un valor medio de  $147 \pm 36\text{ } \mu\text{M}$  ( $n = 6$ ).



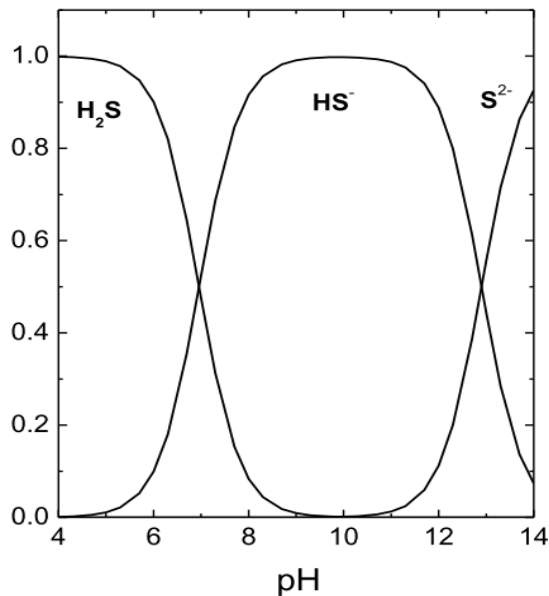
Para la determinación de los organismos presentes en La Hedionda, se recolectaron muestras de agua de la zona externa de los baños y del tapete microbiano que recubre las paredes del mismo. Estas muestras se analizaron con un microscopio óptico invertido (Axiovert 35, Zeiss, Oberkóchen, Alemania) y un sistema FlowCAM (Benchtop VS4C / 488 / DSP; Fluid Imaging, Scarborough, Maine, EEUU), y los organismos se identificaron de acuerdo con Komárek y Anagnostidis, 2005.

Con el objetivo de determinar la abundancia de *Oscillatoria* en La Hedionda (cianobacteria dominante de este hábitat, como se mostrará en el apartado II.3.1.2.) durante el ciclo anual mencionado (junio 2016 - mayo 2017), se tomaron muestras de 5 L de ALH, que se almacenaron en botellas de polietileno, en frío y oscuridad. Una vez en el laboratorio, la concentración total de *Oscillatoria* se estimó con un fluorímetro sumergible, con un espectro de excitación de cinco longitudes de onda (BBE-Moldaenke FluoroProbe, Beutler et al., 2002). El fluorímetro sumergible discrimina entre los cuatro grupos fitoplanctónicos principales: (i) diatomeas y dinoflagelados; (ii) cianobacterias; (iii) algas verdes; y (iv) criptófitos. El proceso de discriminación se realiza en función de la intensidad de fluorescencia relativa de la Chl *a* a 680 nm. Tras ello, la muestra se somete a una excitación secuencial de 5 diodos emisores de luz (LED) que emiten a longitudes de onda de 450, 525, 570, 590 y 610 nm (Beutler et al., 2002; Leobulanger et al., 2011). Como se indicó anteriormente, al ser *Oscillatoria* la cianobacteria dominante, se asumió que los niveles de clorofila detectados por este método correspondían a esta especie (Reul et al., 2020).

### II.2.2. Química del sulfuro [ $\text{H}_2\text{S}$ , $\text{HS}^-$ , $\text{S}^{2-}$ ]

El azufre es un elemento químico que posee cuatro valencias principales (-2, +3, +4, +6) y que, en función de su estado de oxidación, puede formar numerosos oxiácidos y sulfuros. En aguas naturales abundan los compuestos con valencia -2, esto es, sulfuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{S}$ ), bisulfuro ( $\text{HS}^-$ ) y sulfuros ( $\text{S}^{2-}$ ), y los de estado +6, los sulfatos (Armijo et al., 2017). El manantial de La Hedionda, como antes se indicó, presenta en solución compuestos con valencia -2 [ $\text{H}_2\text{S} + \text{HS}^- + \text{S}^{2-}$ ] lo que, para simplificar, se ha denominado sulfuro total, además de sulfatos ( $\text{SO}_2^{4-}$ ) y azufre coloidal ( $\text{S}^0$ ), lo que da un aspecto opalino al ALH (Jiménez-Sánchez et al., 2011).

La relación entre las diferentes especies iónicas de sulfuro depende del pH y la temperatura (Fig. II.3):



**Fig. II.3** Equilibrio químico entre diferentes especies de sulfuro en función del pH a una temperatura de 25 °C (tomada de Miloshova et al., (2003))

El sulfuro, en forma  $\text{H}_2\text{S}$ , es un gas inflamable y venenoso, lipofílico, de olor característico a huevos podridos, que se hace perceptible en el aire incluso a concentraciones por debajo de  $1 \mu\text{M}$  (Armijo et al., 2017). Teniendo en cuenta que el  $\text{H}_2\text{S}$  es un ácido débil, se disocia fácilmente en el agua (ecuación 1), por lo que las soluciones acuosas de sulfuro no son estables.



El valor de  $\text{pK}_{a1}$  depende, además, de la temperatura (Olson, 2005) (ecuación 2).

$$\text{pK}_{a1} = 3,122 + 1132 \cdot \text{T}^{-1} (\text{K}) \quad [\text{ecuación 2}]$$

El  $\text{pK}_{a1}$  es de 6,98 a 20 °C y 6,76 a 37 °C (Hughes et al., 2009). Sin embargo, el segundo valor de  $\text{pK}_a$  ( $\text{pK}_{a2}$ ) del  $\text{H}_2\text{S}$  no se ha llegado a determinar con exactitud. Así, todavía hay poco acuerdo sobre el valor de  $\text{pK}_{a2}$ , incluso a 25 °C, y los valores propuestos van desde 12,5 a 18,5 (Migdisov et al., 2002).

Teniendo en cuenta que las soluciones acuosas de H<sub>2</sub>S son ligeramente ácidas (pH ~ 4,0), y que la solubilidad del H<sub>2</sub>S depende de la temperatura, una solución saturada tendría una concentración aproximada de ~ 0,11 mM a temperatura ambiente, mientras que a 0 °C la concentración de saturación llegaría a ~ 0,21 mM (Housecroft y Constable, 2006).

Además, el H<sub>2</sub>S reacciona con O<sub>2</sub> formando azufre elemental (ecuación 3), que precipita, provocando el enturbiamiento típico de las aguas sulfurosas.



### II.2.2.1. Cuantificación de la concentración de sulfuro total

La medida del contenido de sulfuro total en ALH se realizó a través de dos métodos diferentes: el método de azul de metileno (Pachmayr, 1960; Cline, 1969), y el método yodométrico, siguiendo a APHA- AWWA-WPCF (1992).

El método yodométrico, o volumetría, es una técnica analítica que permite conocer la concentración de sulfuro total (en la forma S<sup>2-</sup>) haciéndolo reaccionar con yodo (I<sub>2</sub>) (ecuación 4):



En esta reacción, el sulfuro actúa como agente reductor, y el yodo como agente oxidante. Este método se conoce también como método colorimétrico, ya que se usa un indicador (en este caso, almidón) que sufre un cambio de color cuando se alcanza el punto de equivalencia entre los moles del oxidante y del reductor.

Sin embargo, y teniendo en cuenta la complejidad de esta técnica, impracticable para su realización *in situ*, se optó por un colorímetro portátil multiparámetro HATCH DR900 para la medición de la concentración de sulfuro total en el campo. Esta técnica se basa en el método del azul de metileno. Se comprobó con varias muestras de ALH que los resultados obtenidos con este último método eran equivalentes a las obtenidas con el método volumétrico.

El colorímetro DR900 se basa en el método de Pachmayr (1960) y Cline (1969), un método sensible y específico para la medición de sulfuro – azufre, y fácilmente adaptable a los análisis rutinarios del laboratorio. La concentración de sulfuro en una muestra se calcula a partir de (ecuación 5):

$$C_{\Sigma S} = F \times (A - A_b), \quad [\text{ecuación 5}]$$

donde  $C_{\Sigma S}$  es la concentración de sulfuro en las unidades dadas al factor  $F$ ;  $A$  es la absorbancia de la muestra; y  $A_b$  es la absorbancia del blanco. El factor  $F$  se evalúa por estandarización con concentraciones conocidas de sulfuro. En nuestro caso, usando el colorímetro DR900, se genera una reacción entre el sulfuro y el sulfato de N, N-dimetil-p-fenilendiamina en presencia del agente oxidante  $\text{Fe}^{3+}$  en ácido clorhídrico, para formar azul de metileno (Lawrence et al., 2000). La intensidad del color azul es proporcional a la concentración de sulfuro, que se mide a una longitud de onda de 610 nm.

El colorímetro DR900 posee dos cubetas, y es necesario disponer de dos reactivos comerciales (reactivos 1 -ácido sulfúrico 65 %- y 2 -dicromato potásico-) para hacer la medida. En primer lugar, se seleccionó el programa “690 Sulphide”. Seguidamente, se realizó el blanco de la medida, añadiendo 25 mL de agua destilada y 1 mL de cada reactivo a una de las cubetas. Posteriormente, se repitieron los mismos pasos, pero añadiendo 25 mL de la muestra de agua sulfurosa en lugar del agua destilada. Las muestras se analizaron de inmediato, ya que no pueden conservarse para su posterior análisis.

Es necesario precisar que el rango de medición del colorímetro está entre 0,3 y 21  $\mu\text{M}$  de sulfuro por lo que, normalmente, fue necesario diluir las muestras para que su concentración estuviera dentro de ese rango.

### II.2.2.2. Preparación de soluciones madre de sulfuro

La adición de sulfuro al medio de cultivo, en los distintos experimentos realizados, se hizo siempre a partir de una solución madre. Esta solución se preparó disolviendo una determinada cantidad de  $9\text{H}_2\text{O} \cdot \text{Na}_2\text{S}$  (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Alemania) en una solución acuosa de NaOH 0,1 M (pH 13), previamente burbujeada durante 15 minutos con  $\text{N}_2$  (para eliminar el  $\text{O}_2$  de la solución y evitar así su reacción con el sulfuro)



en un tubo Falcon <sup>TM</sup> (BD Biosciences, San Jose, CA, EEUU) de 15 mL, cerrado herméticamente. Bajo este pH alcalino, la forma de sulfuro prevalente es  $S^{2-}$ , que es la más estable. Cada vez que se tenía que añadir sulfuro a los cultivos, se analizaba la concentración de la solución madre con el colorímetro DR900. Además, por norma general, estas soluciones se usaban, como mucho, entre 2 - 3 días tras su preparación, manteniéndolas en oscuridad y frío (4 °C). La concentración de la solución madre preparada dependió de los requerimientos del cultivo a inocular, estando normalmente en un rango entre 10 y 400 mM de sulfuro total.

### II.2.2.3. Control de la concentración de sulfuro

Cuando se trabaja con sulfuro en medios acuáticos, se deben tener en cuenta una serie de dificultades experimentales asociadas a tres fenómenos (Miloshova et al., 2003; Luther et al., 2011; Olson y Straub, 2016): (i) equilibrio químico entre las diferentes especies de sulfuro dependiendo del pH; (ii) procesos redox; y (iii) volatilidad del  $H_2S$ . Teniendo en cuenta estos tres factores, el sulfuro desaparece dentro de las primeras 24 h tras la adición del mismo (independientemente de las concentraciones añadidas en nuestros experimentos, en el rango micromolar o milimolar, ver apartado II.2.2.4.), por lo que fue necesario añadir diariamente a los cultivos la concentración final requerida. No fue posible recrear un entorno sulfuroso estable permanentemente; sin embargo, se aceptó el efecto de las adiciones diarias de sulfuro ya que, a pesar de que el  $H_2S$  desaparece rápidamente, sus efectos biológicos posteriores pueden persistir durante horas (Olson & Straub, 2016). Por otra parte, hay que tener cuenta que la adición de sulfuro provoca una alcalinización del medio (mayor cuanto más alta es la concentración de sulfuro añadida). Por ello, el medio de cultivo se suplementó con tampón biológico HEPES (pH 7,2, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Alemania) con una concentración que dependió de la concentración de sulfuro inoculada, fluctuando entre 5 y 20 mM. Por otra parte, el medio de cultivo se reemplazaba cada 7 días, con el objeto de mantener estable el pH.

Cabe destacar que tanto el  $H_2S$  como el  $SH^-$  pueden contribuir directamente a la acción perjudicial sobre los organismos. Como se ha comentado, el  $H_2S$  tiene una amplia variedad de efectos nocivos sobre los organismos, ya que reacciona con citocromos y

hemoproteínas, inhibiendo el transporte de  $e^-$  en las cadenas fotosintéticas y respiratorias (Bagarinao, 1992). Por otro lado, el  $\text{SH}^-$ , que es la forma que está en mayor proporción a pH 7,2, es un nucleófilo que se une fácilmente a los centros metálicos en las moléculas biológicas, siendo también dañino (Housecroft y Constable, 2006) y perjudicial para las membranas celulares (Olson y Straub, 2016). Sin embargo, el anión  $\text{S}^{2-}$  está presente en concentraciones extremadamente bajas a pH 7,2, y es poco probable que participe en la química biológica del sulfuro a pH neutro.

En lo concerniente a las reacciones redox, las especies de sulfuro son más estables en un entorno anóxico reductor. Como se ha comentado anteriormente, en presencia de  $\text{O}_2$  las especies de sulfuro se oxidan a azufre elemental y finalmente a  $\text{SO}_4^{2-}$ . Sin embargo, no se pudo recrear un ambiente anóxico en los cultivos, por lo que se trató de renovar los medios con la mayor frecuencia posible para eliminar el  $\text{O}_2$  generado por el proceso fotosintético. Es por ello que se contrarrestó el efecto de la oxidación de  $\text{H}_2\text{S}$  con adiciones diarias de sulfuro.

Por último, teniendo en cuenta que el  $\text{H}_2\text{S}$  es un gas y, por tanto, volátil, los cultivos utilizados en los experimentos se mantuvieron en tubos Falcon™ de 15 mL cerrados. Sin embargo, los cultivos en el cepario, enriquecidos con sulfuro, se mantuvieron en cajas de cultivo con el tapón perforado, con el objeto de cultivar todas las cepas en las mismas condiciones.

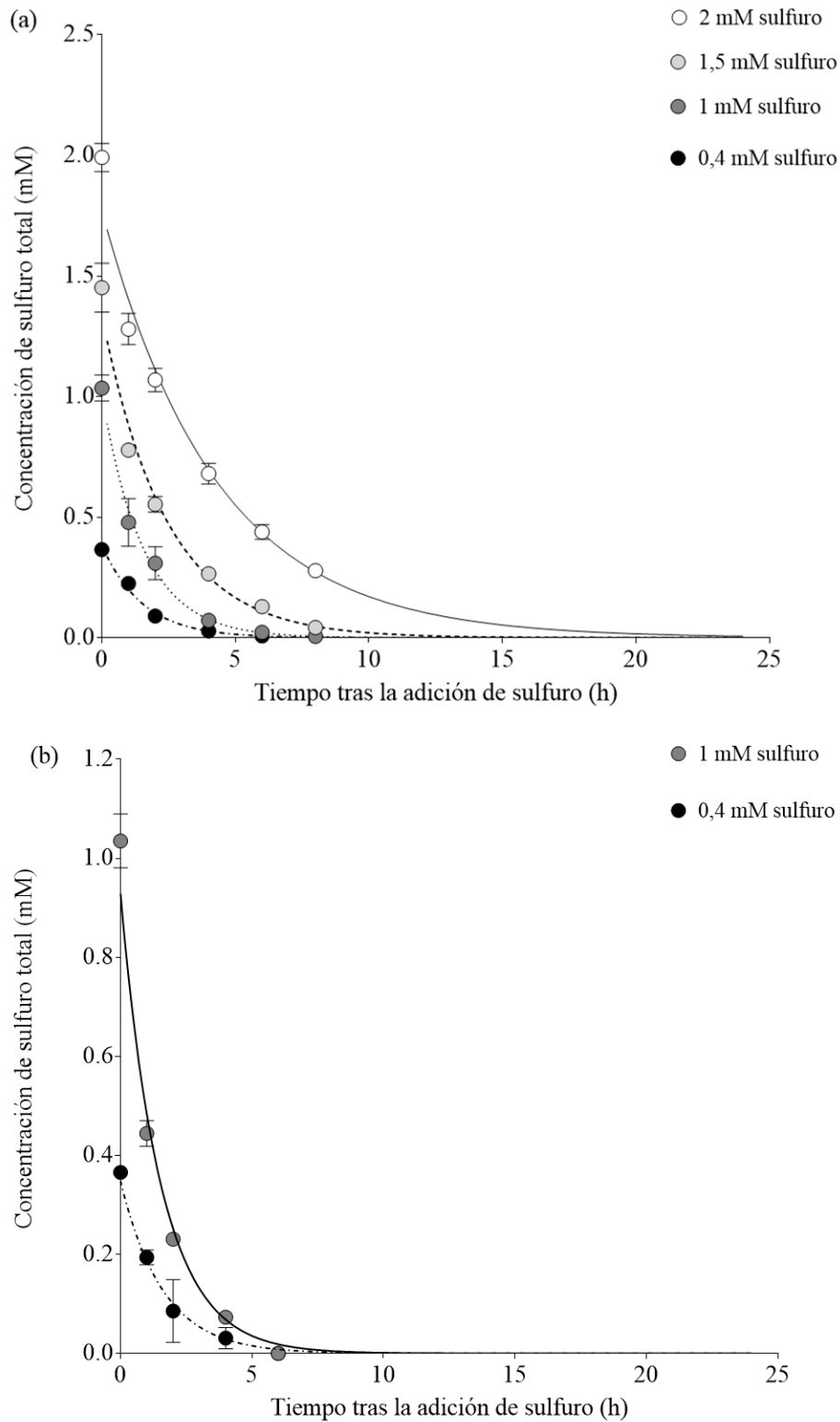
#### II.2.2.4. Vida media del sulfuro en las condiciones de experimentación utilizadas

Para determinar la velocidad de desaparición de sulfuro en los cultivos a las concentraciones que se usaron en diferentes experimentos, se realizó un ensayo para determinar la vida media ( $t_{1/2}$ ) de la concentración total de sulfuro añadida. Para ello, se comprobó la velocidad de desaparición de sulfuro tanto en cajas de cultivo con tapón perforado, tal y como se cultivaron algunas cepas en el cepario, como en tubos cerrados, tal y como se realizaron los experimentos de selección evolutiva. En cajas de cultivo, se realizó el experimento en 20 mL de BG11 diluido al 50% (en adelante, BG11-50%; ver apartado II.2.3.1.) tamponado con HEPES 20 mM (pH 7,2), a concentraciones iniciales de 0,4 y 1 mM de sulfuro. En los tubos Falcon de 15 mL, se añadieron 4 mL de BG11-50% tamponado con HEPES 20 mM (pH 7,2), a concentraciones iniciales de sulfuro de



0,4, 1, 1,5 y 2 mM. Los experimentos se realizaron a 20 °C. En ambas situaciones, y para simular las condiciones de cultivo, se añadieron cultivos de cianobacterias a una concentración de  $2,5 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup>, midiendo la concentración de sulfuro a 0, 1, 2, 4, 6, 8 y 24 h tras la adición de sulfuro a partir de una solución madre de 200 mM (pH ~ 13). El valor de  $t_{1/2}$  se calculó como el tiempo necesario para que la cantidad de sulfuro en los cultivos se redujese a la mitad (Fig. II.4).

La tendencia en la desaparición de sulfuro se ajustó a una función exponencial. En tubos Falcon de 15 mL, las ecuaciones del ajuste fueron (i)  $y = 0,3784 \times e^{-0,655x}$ , inoculando 0,4 mM de sulfuro total ( $R^2 = 0,9964$ ); (ii)  $y = 1,0097 \times e^{-0,645x}$ , inoculando 1 mM de sulfuro total ( $R^2 = 0,9984$ ); (iii)  $y = 1,3385 \times e^{-0,417x}$ , inoculando 1,5 mM sulfuro total ( $R^2 = 0,9917$ ); y (iv)  $y = 1,7731 \times e^{-0,234x}$ , inoculando 2 mM ( $R^2 = 0,9908$ ). En las cajas de 50 mL con tapón perforado las ecuaciones del ajuste fueron (i)  $y = 0,348 \times e^{-0,622x}$ , inoculando 0,4 mM de sulfuro total ( $R^2 = 0,9904$ ); y (ii)  $y = 0,9286 \times e^{-0,652x}$ , inoculando 1 mM de sulfuro total ( $R^2 = 0,9916$ ). Así, el valor de  $t_{1/2}$  osciló entre 1,05 h para una concentración inicial de 0,4 mM y casi 3 h en el caso de partir de 2 mM de sulfuro. El sulfuro prácticamente desapareció del medio a las 4 h a concentraciones iniciales de 0,4 y 1 mM, independientemente del recipiente usado (Fig. II.4) y, a las 8 h, a 1,5 mM (Fig. II.4a). En todos los casos, a las 24 h no quedó sulfuro disponible a ninguna de las concentraciones iniciales ensayadas (Fig. II.4). Por ello, se realizaron adiciones de sulfuro diarias para mantener en lo posible su efecto tóxico a lo largo de los experimentos.



**Fig. II.4** Desaparición de sulfuro tras su adición en el medio de cultivo (BG11-50%; 20 mM HEPES; pH 7,2; 20 °C) en (a) tubos de 15 mL, y (b) en cajas de 50 mL. Los datos muestran la media  $\pm \sigma$  ( $n = 4$ ). Las líneas muestran los ajustes a una función exponencial.



### II.2.3. Organismos de estudio, condiciones de cultivo y cálculo de las tasas de crecimiento

#### II.2.3.1. Organismos utilizados y condiciones de cultivo

Los experimentos se realizaron con tres cepas silvestres de la cianobacteria *Microcystis aeruginosa* (Ma1Vc, Ma5Vc y MaAVc) proporcionadas por la colección de cultivo de microalgas de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense (Madrid, España), y aisladas de aguas no sulfurosas del embalse de Valmayor (Comunidad Autónoma de Madrid, España). Además, también se realizaron experimentos con la cepa de *Oscillatoria* sp. aislada de los baños sulfurosos de La Hedionda (ver apartado II.2.3.1.1.), cianobacteria que se había descrito previamente como presente en dicho cuerpo de agua (Flores-Moya et al., 2005). Esta cepa se denominó O1LH.

Tanto los cultivos de *M. aeruginosa* como los de *Oscillatoria* sp. se cultivaron en cajas de cultivo celular de 50 mL con tapón ventilado con 20 mL de medio de cultivo y a una temperatura de 20 °C. Cuando se necesitó una mayor cantidad de material biológico se utilizaron cajas de cultivo de 250 mL, con 100 mL de medio de cultivo. Los cultivos se mantuvieron en crecimiento exponencial (Cooper, 1991) mediante la transferencia semanal de un inóculo a medio estéril y fresco. Los cultivos se incubaron a una irradiancia continua entre 50 - 60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  proporcionada por lámparas fluorescentes de luz blanca fría (Sylvania GRO-LUX, F36W/GRO, FeiloSylvania, España). El medio de cultivo de las cepas de *M. aeruginosa* fue medio BG11 diluido al 50% (BG11-50 %), preparado a partir de medio BG11 comercial (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Alemania), ajustado a pH 7,2. Sin embargo, el medio de cultivo de *Oscillatoria* sp. O1LH fue BG11-50 % tamponado con HEPES 5 mM (pH 7,2), ya que éste se enriqueció con sulfuro a una concentración de 0,2 mM (cercana a la encontrada en ALH).

#### II.2.3.1.1. Aislamiento de *Oscillatoria* sp.

Con el objetivo de aislar un cultivo axénico de la cianobacteria perteneciente al género *Oscillatoria* sp. (en adelante, *Oscillatoria*), se tomaron muestras del tapete presente en

las paredes de los Baños de La Hedionda y se colocaron en matraces estériles de 100 mL, a los que se añadió 100 mL de ALH. La concentración de sulfuro total en el ALH en el momento de la recolección de la muestra del tapete, el 6 de junio de 2016, fue de 109,4  $\mu\text{M}$  ( $\text{CV} < 3\%$ ).

Debido a la alta cantidad de biomasa, los 100 mL de ALH que contenían la muestra del tapete se diluyeron y se homogeneizaron en 900 mL de medio BG11-50%, pH 7,2. El aislamiento de la cianobacteria se hizo mediante el proceso de diluciones sucesivas, en una placa de 96 pocillos. La primera columna se rellenó con alícuotas de 200  $\mu\text{L}$  del medio homogeneizado; el resto de los pocillos se llenaron con alícuotas de 180  $\mu\text{L}$  de BG11-50%, pH 7,2. Por filas, y sucesivamente, se transfirió una alícuota de 20  $\mu\text{L}$  de cada pocillo al siguiente a la derecha. Diariamente, se observó el crecimiento celular en los pocillos bajo un microscopio invertido (Leica DM500). El último de los pocillos de una de las filas con crecimiento celular que se identificó que poseía un filamento de *Oscillatoria* se dejó crecer durante 1 semana, para verificar que se tratara de un cultivo uniclonal de la especie deseada. Tras ello, todo el cultivo se traspasó a una caja de 50 mL cerrada con tapón perforado (Greiner; Bio-One, Longwood, NJ, EEUU) con 20 mL de medio BG11-50%.

### II.2.3.2. Cálculo de la tasa de crecimiento de los cultivos

La tasa de crecimiento ( $m$ ) de los cultivos celulares se calculó de acuerdo con Crow y Kimura, 1970 (ecuación 6):

$$m = \log_e (N_t / N_0) / \Delta t \quad \text{[ecuación 6]}$$

donde  $N_t$  y  $N_0$  representan el número de células al final y al comienzo de un ensayo de duración  $t$ , respectivamente. Esta expresión se utilizó en el caso de las cepas de *M. aeruginosa* que, en las condiciones de cultivo ensayadas, crecieron como células individuales y no produjeron colonias, como ocurre en la naturaleza. El número de células se estimó a través de la absorbancia a 750 nm (ver apartado II.2.3.3.) o por recuento en una cámara de Neubauer (BLAUBRAND<sup>®</sup>, Alemania), cuando se consideró necesario. No obstante, debido a la naturaleza filamentosa de las cepas de *Oscillatoria*, la



biomasa presente en los cultivos se estimó a través del contenido de Chl *a*, de acuerdo con Wellburn (1994), usando N, N-dimetilformamida (DMF) como disolvente (ver apartado II.2.5.2.4.). Así,  $N_t$  y  $N_0$  se sustituyeron en la ecuación por la cantidad, en  $\mu\text{g}$ , de Chl  $a_t$  y Chl  $a_0$ , respectivamente.

Para facilitar, en los ensayos, la inoculación de *Oscillatoria* a una concentración de Chl *a* determinada e igual entre réplicas, se estableció una relación entre el peso fresco (*PF*, mg) de la muestra y la cantidad de Chl *a* ( $\mu\text{g}$ ) (ecuación 7):

$$\text{Chl } a \text{ } (\mu\text{g}) = 0,1876 \times \text{PF} \text{ (mg)} + 1 \text{ (} R^2 = 1, n = 30 \text{)} \quad \text{[ecuación 7]}$$

Para la estimación del *PF*, los cultivos se centrifugaron a 6850g durante 8 minutos, para poder separar y pesar el “pellet”.

### II.2.3.3. Rectas patrón para la determinación de la concentración celular de *M. aeruginosa*

Para determinar la densidad celular de manera más rápida, se usó la medida de la absorbancia a  $\lambda = 750 \text{ nm}$  ( $A_{750}$ ) de los cultivos como estimador de la misma. Así, mediante diluciones sucesivas, se fundaron 18 cultivos celulares (con densidades desde  $5 \times 10^5$  a  $5,75 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) y se determinó la absorbancia a 750 nm con un espectrofotómetro (Selecta UV-2005, España). Este ensayo se realizó con las tres cepas de *M. aeruginosa* (Ma1Vc, Ma5Vc y MaAVc), y no se detectaron diferencias significativas entre los resultados obtenidos ( $P < 0,001$ ). La concentración celular (CC; unidades en  $10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) se determinó usando una cámara de Neubauer. La relación lineal que se obtuvo fue (ecuación 8):

$$\text{CC} = 1,1 \times 10^7 \times A_{750} \text{ (} R^2 = 0,98, n = 18 \text{)} \quad \text{[ecuación 8]}$$

### II.2.3.4. Tasa de crecimiento en función de la irradiancia

Con el objetivo de conocer la irradiancia óptima (PAR, 400-700 nm) de crecimiento de cada cepa, se calcularon las tasas de crecimiento desde 5 hasta  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Para

tal fin, se dispusieron las réplicas ( $n = 3$ ) en cajas de cultivo celular de 50 mL con 20 mL de medio de cultivo BG11-50% (pH 7,2) dentro de la cámara de cultivo a 20 °C a distinta distancia de la fuente de luz (Sylvania GRO-LUX, F36W/GRO, Feilo Sylvania, España). La irradiancia incidente se midió con un radiómetro (LICOR® LI-250A, Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE, EEUU) al que se le acopló un sensor cuántico plano LI-190/R de la misma marca comercial.

Los cultivos, en el caso de las cepas de *M. aeruginosa*, se inocularon inicialmente con  $5 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup>, y la concentración final se estimó a través de su absorbancia a 750 nm (ver apartado II.2.3.3.). En el caso de *Oscillatoria*, se inoculó cada réplica con 5 mg de *PF*, que se determinó centrifugando cada uno de los cultivos a 6850g durante 8 minutos, y pesando el “pellet”. Las tasas de crecimiento, a diferentes irradiancias, se calcularon como se indica en el apartado II.2.3.2.

#### II.2.4. Prueba de toxicidad: efecto del sulfuro en la tasa de crecimiento de las cepas silvestres de *M. aeruginosa* y *Oscillatoria*

Con el objetivo de analizar la tolerancia al sulfuro mostrada por las cepas de *M. aeruginosa* y *Oscillatoria*, se determinó su efecto sobre la tasa de crecimiento. Con tal fin, se incubaron muestras de ambas especies durante cinco días bajo concentraciones crecientes de sulfuro, determinando la densidad celular antes y después de la incubación. Para ambas especies, se usaron cultivos en la fase exponencial de crecimiento. En el caso de *M. aeruginosa*, las réplicas ( $n = 5$ ) se inocularon con una densidad celular inicial de  $2,5 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup> en 4 mL de BG11-50% tamponado con 20 mM HEPES (pH 7,2), usando tubos de 15 mL cerrados. A dicho medio se añadieron concentraciones crecientes de sulfuro (0, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, y 0,35 mM) a partir de una solución madre de sulfuro con concentración entre 21 - 24 mM (pH ~ 13). Como se indicó anteriormente, se realizaron adiciones diarias de sulfuro para mantener su concentración lo más estable posible ( $t_{1/2}$  alrededor de 1 h cuando la concentración inicial fue de 0,35 mM). Además, se añadieron al menos dos testigos para monitorizar el pH, confirmando que no se viera afectado significativamente. Tanto al principio como al final del experimento, la CC se determinó usando una cámara de recuento celular Neubauer. Como los cultivos tratados

con sulfuro en torno a concentraciones 0,4 mM se enturbian debido a la precipitación de  $S^0$ , la absorbancia no resultó un buen estimador para la CC en estos cultivos.

Para este ensayo, las muestras de *Oscillatoria* se prepararon en tubos de 50 mL cerrados, con 20 mL de BG11-50% tamponado con HEPES 20 mM (pH 7,2) y con concentraciones crecientes de sulfuro (0, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,35, 0,5, 0,7, 0,9, 1,2, y 1,5 mM). La concentración de biomasa inicial en cada réplica fue de 0,05 mg  $PF\ mL^{-1}$  ( $n = 4$ ). Este valor se eligió porque la concentración de Chl *a* por réplica conseguida era similar a la de las muestras de *M. aeruginosa*. Tras la incubación, las muestras se centrifugaron a 6850g durante 8 minutos, y el sedimento se pesó y se congeló para determinar la Chl *a*. El sulfuro se añadió al medio todos los días a partir de una solución madre de sulfuro con una concentración entre 210 - 240 mM (pH ~ 13), como se indicó anteriormente. Sin embargo, se detectó un ligero aumento en el pH en los últimos días de incubación a las concentraciones más altas de sulfuro, lo que podría reducir parcialmente la toxicidad del sulfuro debido a la disminución de la forma de  $H_2S$  (Howsley y Pearson, 1979). Sin embargo, y como se ha indicado anteriormente, se ha descrito el efecto tóxico que ejerce la forma  $HS^-$ , que si bien no difunde pasivamente a través de la membrana, genera daños celulares: las formas ionizadas son químicamente más reactivas (Olson y Straub, 2016).

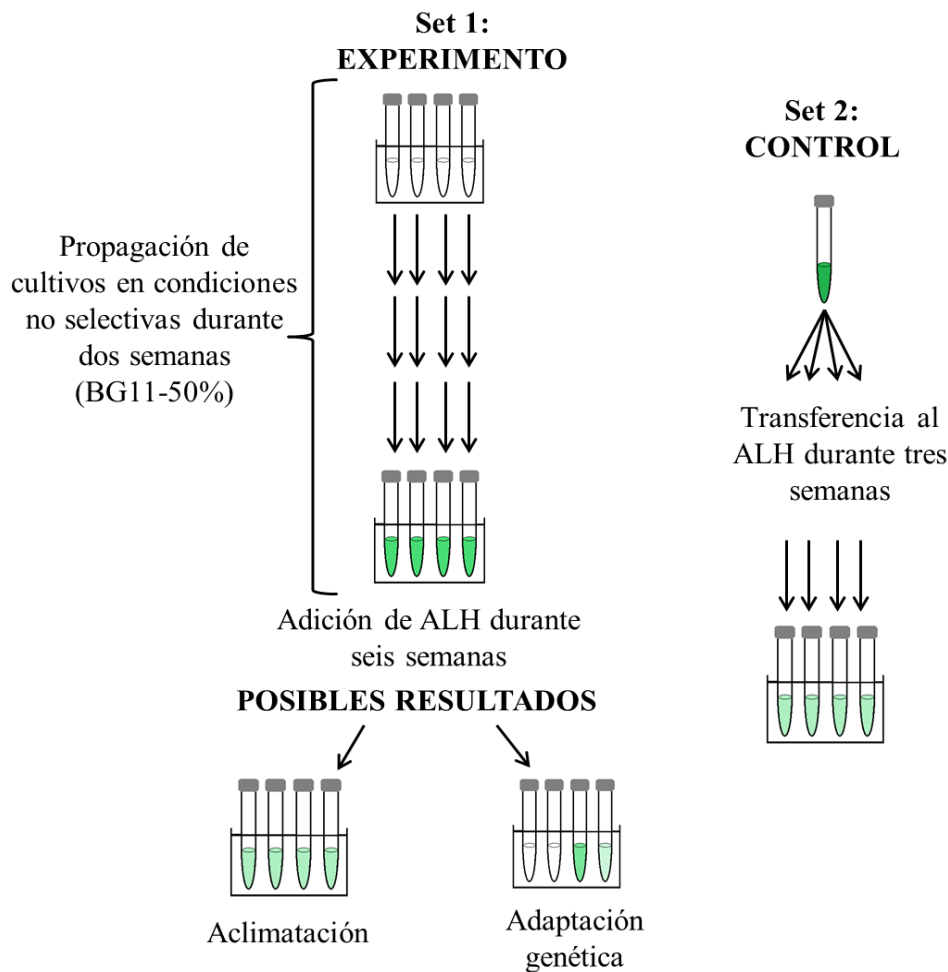
El tiempo de incubación fue de  $\Delta t = 5$  d para todas las cepas, y se realizó en una cámara de cultivo a una irradiancia de 50  $\mu\text{mol de fotones m}^{-2}\text{ s}^{-1}$  y a una temperatura de 20° C. La tasa de crecimiento se estimó según la ecuación 6, utilizando el número de células en el caso de *M. aeruginosa* ( $N_t$  y  $N_0$ , número de células al final y al comienzo del experimento) y la cantidad de Chl *a* (Chl  $a_t$  y Chl  $a_0$ ), en el caso de *Oscillatoria*.

## II.2.5. Diseño experimental

### II.2.5.1. Estudio de los aspectos evolutivos de la aparición de la tolerancia al sulfuro

#### II.2.5.1.1. Análisis de fluctuación de la transformación de la sensibilidad a la resistencia a las aguas sulfurosas de La Hedionda en *M. aeruginosa*

Para distinguir entre adaptación (mutaciones espontáneas preselectivas) y aclimatación al agente selectivo aguas sulfurosas de La Hedionda (ALH), se realizó un análisis de fluctuación (Luria y Delbrück, 1943), modificado para trabajar con cultivos líquidos (López-Rodas et al., 2001; Costas et al., 2001; Fernández-Arjona et al., 2014). Para realizar este ensayo, se decidió usar la cepa Ma1Vc, ya que resultó ser la más sensible al sulfuro de las tres cepas analizadas tras realizar la prueba de toxicidad (ver apartado II.3.2.2.). Se prepararon dos sets de cultivos experimentales (Fig. II.5) a partir de un mismo cultivo parental genéticamente homogéneo. El set 1 consistió en 90 cultivos independientes inoculados con  $N_0 = 10^3$  células (un número lo suficientemente pequeño como para que fuese altamente improbable la presencia de mutantes resistentes). Los cultivos se prepararon en tubos de centrífuga de 13 mL (Sardstedt AG & Co, Nümbrecht, Alemania). Las células se cultivaron en 2 mL de BG11-50% (condiciones no selectivas) durante dos semanas, hasta que se llegó a  $N_t = 10^6$  células (periodo de propagación). Tras ello, los cultivos se centrifugaron, el medio se descartó y se añadió 2 mL de ALH a las células del “pellet” (condiciones selectivas). Estos cultivos se mantuvieron durante 6 semanas en condiciones selectivas, asegurando, así, que al menos una célula mutante resistente a ALH pudiera generar la suficiente progenie como para que la población pudiera ser detectada. El set 2 consistió en 40 alícuotas de  $3 \times 10^6$  células de la población parental, cultivadas directamente en 2 mL de ALH durante 3 semanas. De acuerdo con la tasa diaria de pérdida de sulfuro (que desaparecía tras 24h), el ALH en los cultivos se reemplazó cada tres días para mantener su toxicidad en lo posible durante toda la duración del experimento. Con este propósito, se recolectaron muestras de ALH cada semana y se filtraron antes de su uso con un filtro de éster de celulosa mixto de 0,22  $\mu\text{m}$  (Merck Millipore Ltd., Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).



**Fig. II.5** Diagrama del experimento de análisis de fluctuación y posibles resultados. En el set 1, se propagaron diferentes cultivos de *Microcystis aeruginosa* (a partir de un pequeño inóculo) en condiciones no selectivas (medio BG11-50%) hasta alcanzar una densidad celular alta, y luego se transfirieron al agente selectivo (agua de La Hedionda, ALH). Si surgieran células resistentes durante la exposición a ALH por aclimatación, el número de células resistentes en todos los cultivos sería similar. Si las células resistentes aparecieran por mutaciones ocurridas durante la propagación del cultivo antes de la exposición a las aguas sulfuradas (es decir, adaptación genética), el número de células resistentes en todos los cultivos sería diferente. El diagrama también muestra la posibilidad de que no ocurrieran mutaciones en los cultivos durante la fase de propagación (cultivos claros); o que las mutaciones pudieran aparecer temprano (alta densidad celular, verde oscuro) o tarde (baja densidad celular, verde claro) durante dicha fase. Las réplicas del set 2 se fundaron a partir del mismo cultivo parental, por lo que la variación de la población parental se utiliza como control experimental. En este caso, el número de células resistentes en todos los cultivos debe ser similar.

Al realizar un análisis de fluctuación, se pueden obtener dos resultados posibles en el set 1, cada uno de ellos interpretable como la consecuencia independiente de dos fenómenos de resistencia diferentes (Fig. II.5). Si surgieran células resistentes después de

la exposición al agente selectivo (ALH) por aclimatación, la varianza del número de células por cultivo sería baja (Fig. II.5) porque todas las réplicas tienen la misma probabilidad de desarrollar resistencia al ALH. Por lo tanto, el valor del CV ( $SD \times 100/\text{media}$ ) del número de células resistentes por réplica debería ser relativamente bajo. Por el contrario, si las células resistentes aparecieran debido a mutaciones existentes antes de la exposición al agente selectivo, se encontraría una elevada varianza en el número de células resistentes entre cultivos (Fig. II.5) y, en consecuencia, el CV debería ser relativamente alto. Además, también se puede dar otro resultado: que no haya células resistentes en los cultivos, lo que indicaría que no tuvo lugar ni la selección de mutaciones espontáneas ocurridas antes de la exposición a ALH, ni la aclimatación durante la exposición a ALH.

El set 2 (Fig. II.5) es el control experimental del análisis de fluctuación, basado en alícuotas de un cultivo inicial muy denso (con tres veces más células que en el cultivo del set 1 al final del período de propagación). La varianza que se encuentre en el set 2 permite estimar todas las fuentes de varianza asociadas al procedimiento experimental. Por lo tanto, el número de células resistentes existente entre réplicas debería ser similar y bajo si el error experimental es pequeño. Aún más, si se encuentra un valor CV similar en los sets 1 y 2, se confirma que las células resistentes aparecieron por aclimatación (es decir, después de la exposición a ALH). Por el contrario, si el CV del set 1 es significativamente mayor que el CV del set 2, se puede inferir que las células resistentes surgieron por mutaciones espontáneas antes de la exposición a ALH.

Si la resistencia es fruto de la adaptación genética, los datos brutos del análisis de fluctuación permiten estimar la tasa de mutación ( $\mu$ ). Existen diferentes enfoques para obtener esta estimación (Rosche y Foster, 2000), pero se seleccionó el método  $P_0$  (es decir, el primer término de la distribución de Poisson) porque es el método más simple para calcular  $\mu$  y es el descrito originalmente por Luria y Delbrück (1943). El parámetro  $P_0$  se calculó como la proporción de cultivos del set 1 que no mostraron resistencia al ALH, y  $\mu$  se calculó como (ecuación 9):

$$\mu = -\log_e P_0 / (N_t - N_0) \quad [\text{ecuación 9}]$$

donde  $N_t$  y  $N_0$  son el número de células al inicio y al final del período de propagación (es decir, antes de la adición de ALH), respectivamente (Fig. II.5). El recuento celular se



realizó utilizando una cámara Neubauer, ya que la presencia de restos celulares interfirió en la estimación de la densidad celular por absorbancia.

Si la mutación del alelo silvestre (sensible a ALH) al alelo resistente al ALH tiene lugar con una frecuencia recurrente, surgirán nuevos mutantes en cada generación de manera espontánea. No obstante, las mutaciones suelen tener un coste fisiológico que se traduce en una menor eficacia biológica (que se puede estimar por la tasa de crecimiento). Por lo tanto, en ausencia de ALH (esto es, en condiciones no selectivas), la mayoría de las células portadoras de estas mutaciones se eliminarán tarde o temprano por selección natural o por azar (Crow y Kimura, 1970; Spiess y Spiess, 1989). El número promedio de tales mutantes en poblaciones naturales no expuestas a condiciones selectivas, en un instante dado, estará determinado por el equilibrio entre  $\mu$  y la tasa de eliminación selectiva (Kimura y Maruyama, 1966) (ecuación 10):

$$q = \mu / (\mu + s) \quad \text{[ecuación 10]}$$

donde  $q$  es la frecuencia del alelo resistente al AHW,  $\mu$  es la tasa de mutación y  $s$  es el coeficiente de selección contra este alelo resistente, calculado de la siguiente manera (ecuación 11):

$$s = 1 - (m^r / m^s) \quad \text{[ecuación 11]}$$

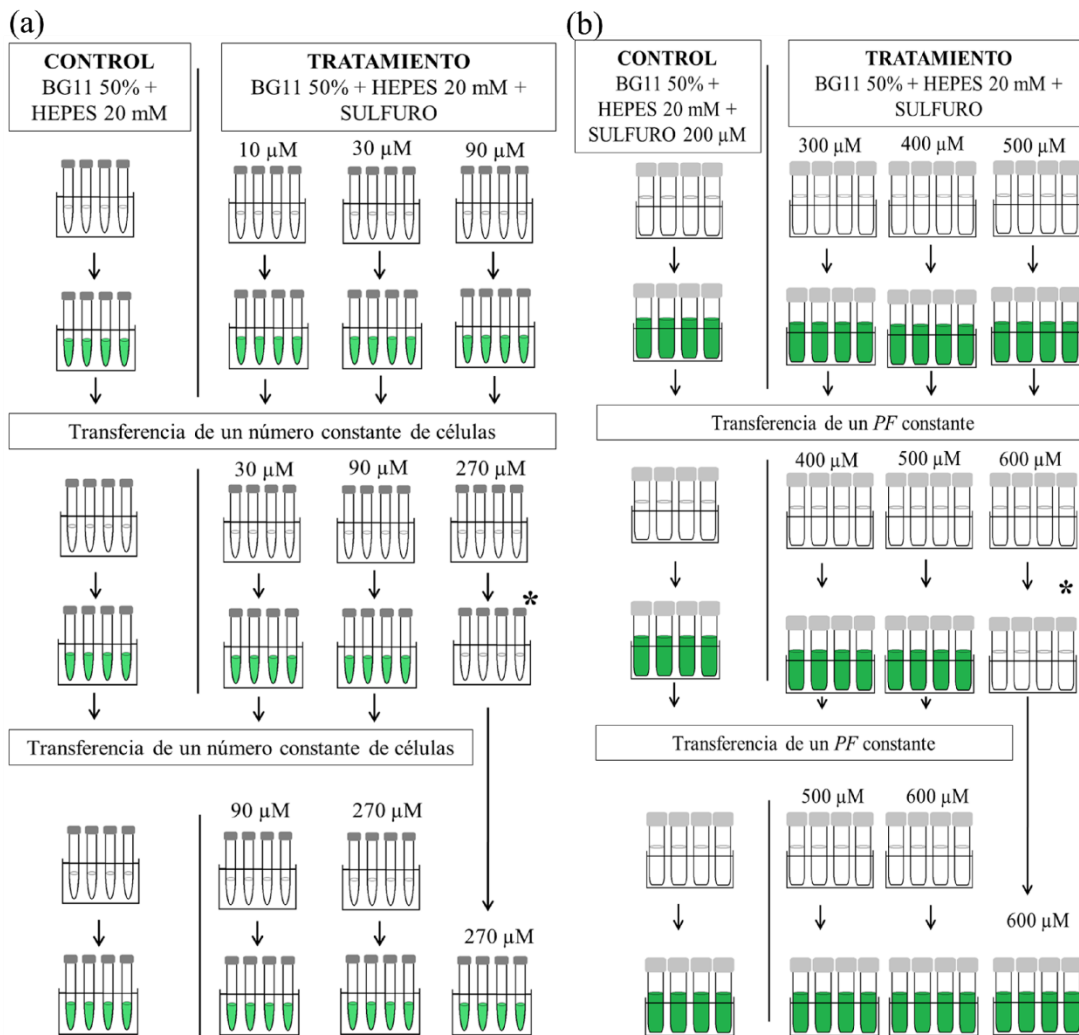
donde  $m^r$  y  $m^s$  son las tasas de crecimiento de las células resistentes y sensibles al ALH, respectivamente, en condiciones no selectivas (es decir, en medio de cultivo BG11-50%). Se utilizaron cuatro réplicas independientes de cepas resistentes y sensibles a ALH para calcular los valores de  $m^r$  y  $m^s$ , de acuerdo con la ecuación 6. Las réplicas de las células de *M. aeruginosa* sensibles al ALH se fundaron a partir de la cepa original Ma1Vc. Por otro lado, después de realizar el análisis de fluctuación, se aisló un cultivo seleccionado al azar del set 1, resistente al ALH para la determinación de  $m^r$ .

### II.2.5.1.2. Estimación de la máxima resistencia al sulfuro de *M. aeruginosa* y *Oscillatoria sp.*

Para determinar la máxima resistencia de las cepas de *M. aeruginosa* y *Oscillatoria* al sulfuro, se llevó a cabo un experimento de trinquete (Huertas et al., 2010; Rouco et al., 2014; Baselga Cervera et al., 2016; Melero-Jiménez et al. 2019; Martín-Clemente et al., 2019). Un requisito indispensable en este diseño experimental es equilibrar una fuerte presión selectiva y un tamaño de población lo suficientemente grande que asegure la aparición de nuevas mutaciones que confieran resistencia al agente selectivo. Con este objetivo, los cultivos experimentales se inocularon con una densidad celular elevada, y se expusieron a tres niveles de selección diferentes (es decir, tres concentraciones de sulfuro) en cada ciclo de trinquete (Fig. II.6).

Se prepararon cuatro réplicas para cada una de las dosis de sulfuro probadas. Hay que tener en cuenta que cada réplica es una población independiente, y que podrían pasar al siguiente ciclo en diferentes momentos una vez alcancen la densidad celular deseada. La elección de la dosis inicial y el aumento de las concentraciones de sulfuro para cada ciclo de trinquete fueron diferentes para cada especie, debido a la diferencia en su tolerancia al sulfuro, tal y como se detalla a continuación.

El experimento de trinquete para detectar la resistencia máxima a sulfuro de las tres cepas de *M. aeruginosa* (Ma1Vc, Ma5Vc y MaAVc) comenzó con cuatro poblaciones independientes (Fig. II. 6a) para cada una de las tres dosis iniciales de sulfuro (10, 30 y 90  $\mu\text{M}$  de sulfuro), así como cuatro controles sin sulfuro. Cada población (réplica) se fundó con  $6 \times 10^5$  células, que se incubaron en tubos de 15 mL con 4 mL de medio de cultivo BG11-50% tamponado con HEPES 20 mM (pH 7,2), agregando la concentración de sulfuro correspondiente. Los tubos se cerraron y se mantuvieron bajo una irradiancia de  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y a  $20^\circ \text{C}$ . Cada ciclo de trinquete implicó un aumento de concentración de sulfuro por un factor de 3 al comienzo del experimento y, más tarde, por un factor de 1,5. Los incrementos de concentración en cada ciclo de trinquete fueron los siguientes: de 10 a 30, de 30 a 90, de 90 a 270, de 270 a 405 y de 405 a 607  $\mu\text{M}$  sulfuro. Los cultivos se mantuvieron durante al menos 7 días en cada dosis de sulfuro.



**Fig. II.6** Esquema del protocolo de trinquete. Durante la fase inicial, se prepararon 4 réplicas de cultivos en medio de cultivo BG11-50%, HEPES 20 mM, pH 7,2 (control) y 4 réplicas de tres tratamientos a concentraciones crecientes de sulfuro. Todos los cultivos comenzaron con la misma densidad celular y se mantuvieron 7 días en cada tratamiento. Los cultivos que mostraron la misma concentración celular final que los controles se transfirieron al siguiente nivel de sulfuro; sin embargo, los cultivos que no alcanzaron una biomasa similar a la encontrada en los cultivos de control no se transfirieron (\*) y se mantuvieron en la misma concentración de sulfuro hasta que alcanzaron la biomasa de control. La transferencia al siguiente nivel de sulfuro (o ciclo de ratchet) no se muestra en la figura. Se muestran los esquemas usados en (a) las tres cepas silvestres de *Microcystis aeruginosa*, que comenzaron con concentraciones de 10, 30 y 90 μM de sulfuro y (b) la cepa de *Oscillatoria*, que comenzó con 200 μM de sulfuro como control, siendo los tratamientos a 300, 400 y 500 μM de sulfuro. Cada nivel de sulfuro subió 100 μM con respecto al nivel anterior.

Transcurrido este tiempo, se compararon las concentraciones celulares de cultivos con sulfuro con las de los controles. En el caso de que los cultivos con sulfuro mostraran una concentración similar a la observada en los controles, se transferían al siguiente ciclo de trinquete, usando siempre la misma biomasa inicial ( $6 \times 10^5$  céls mL<sup>-1</sup>). Los cultivos con una biomasa más baja que los cultivos control no se transfirieron hasta que alcanzaron una biomasa similar a la obtenida en el control (Fig. II.6a).

Para mantener las concentraciones de sulfuro al nivel lo más próximo al deseado, se añadió sulfuro todos los días al medio de cultivo a partir de una solución madre con una concentración entre 21 - 24 mM sulfuro (pH ~ 13). El pH de los cultivos se controló durante todo el experimento midiendo el pH en tubos testigos con un pH - metro (CRISON Basic 20+, Barcelona, España). Los cultivos se centrifugaron todas las semanas, para reemplazar el medio por medio fresco y mantener así el pH lo más constante posible.

En el experimento con *Oscillatoria* se inició el primer ciclo de trinquete con cuatro poblaciones para cada una de las tres dosis iniciales de sulfuro (0,3, 0,4 y 0,5 mM) más el control, inoculado con 0,2 mM sulfuro (Fig. II.6b). La concentración de sulfuro de los tubos control fue la misma a la utilizada para el cultivo de la cepa O1LH en el cepario, y el aumento de concentración en cada ciclo de trinquete fue de 0,1 mM. Se usaron tubos de 50 mL, que se inocularon inicialmente con 5 mg de *PF* en 20 mL de BG11-50%, tamponado con HEPES 20 mM (pH 7,2), a los que se le añadió la concentración de sulfuro correspondiente, manteniéndolos en dichas condiciones al menos 7 días. Los cultivos que consiguieron alcanzar una biomasa similar a los controles se transfirieron al siguiente ciclo de trinquete usando la misma biomasa inicial (5 mg *PF*). Las adiciones de sulfuro y la renovación del medio de cultivo se realizaron como se indicó para el experimento de trinquete descrito para las cepas de *M. aeruginosa*. Ahora bien, a concentraciones de sulfuro superiores a 0,4 mM, se comienza a detectar precipitación de S<sup>0</sup>. Este efecto se agrava a concentraciones por encima de 1 mM, a partir de las cuales la turbidez del medio se incrementa ostensiblemente. Además, a concentraciones por encima de 1,5 mM, el pH del medio aumentó entre 0,5 y 0,8 unidades tras los 7 días de incubación, aunque el pH se restauraba al valor de 7,2 con la renovación del medio. Este efecto podía enmascarar parcialmente el efecto tóxico del sulfuro, por lo que no se realizaron ensayos con concentraciones de sulfuro por encima de 2 mM.

En ambos experimentos, se consideró que una población había alcanzado el límite máximo de resistencia cuando no se observó crecimiento celular tras 90 d de exposición al sulfuro. Los resultados se expresaron en función de los días que tardó cada réplica para alcanzar la misma biomasa que el control.

Una vez finalizado el experimento de trinquete, se seleccionó al azar un cultivo resistente a la concentración de sulfuro más alta alcanzada de cada una de las cepas de las dos especies. Las cepas elegidas de *M. aeruginosa*, a partir de Ma1Vc, Ma5Vc y MaAVc, se denominaron Ma1R, Ma5R y MaAR, respectivamente. El cultivo de *Oscillatoria* aislado a partir de la cepa O1LH se denominó O1R.

### II.2.5.1.3. Aclimatación vs. adaptación como mecanismo de tolerancia

El protocolo de trinquete no está diseñado para dilucidar el mecanismo (aclimatación vs. adaptación) que permite alcanzar la máxima capacidad de resistencia al sulfuro. Por ello, se realizó un experimento adicional con ambas especies, usando un cultivo aleatorio de los que resistieron a la concentración más alta de sulfuro en el experimento de trinquete (Rouco et al. 2014; Melero-Jiménez et al., 2019). Este protocolo se basa en el hecho de que el proceso de aclimatación, al menos en bacterias, puede extenderse como mucho entre 2 - 3 generaciones (Bennett y Lenski, 1997). De cada una de las cepas resistentes obtenidas en el experimento de trinquete (ver apartado II.2.5.1.2.), se prepararon cinco réplicas. En el caso de las cepas de *M. aeruginosa*, las réplicas se inocularon con  $6 \times 10^5$  células; para *Oscillatoria* se usaron 5 mg PF por réplica. Las muestras se cultivaron en 20 mL de BG11-50% tamponado con HEPES 20 mM en cajas de 50 mL cerradas y con tapón perforado.

En la primera etapa, se cultivaron todas las cepas resistentes de *M. aeruginosa* durante una semana en ausencia del agente selectivo, esto es, sin sulfuro; la cepa de *Oscillatoria* resistente se cultivó en las condiciones estándar de la cepa silvestre, es decir, a 0,2 mM sulfuro. Tras 7 d, se midió la tasa de crecimiento que presentó cada cultivo ( $m_1$ ; ver apartado II.2.3.2.) y, de esos mismos cultivos, se tomaron  $6 \times 10^5$  células de *M. aeruginosa* y 5 mg PF de *Oscillatoria* para fundar nuevas réplicas. Estos nuevos cultivos, en la segunda etapa, se mantuvieron durante 7 d en presencia de la máxima concentración de sulfuro alcanzada en el experimento de trinquete, tras lo que se volvió a estimar la tasa

de crecimiento ( $m_2$ ). De la comparación de  $m_1$  y  $m_2$  se puede inferir si la máxima resistencia es fruto de la aclimatación o de la adaptación. Si  $m_1 \sim m_2$ , se deduce que la resistencia se debe a la ocurrencia de mutaciones espontáneas previas a la adición del agente selectivo. Sin embargo, un valor de  $m_1 > m_2$  sugiere que el mecanismo que haya permitido la supervivencia sea la aclimatación posterior a la presencia del agente selectivo (Rouco et al., 2014; Melero-Jiménez et al., 2019).

#### II.2.5.1.4. Rescate evolutivo bajo selección por sulfuro en *M. aeruginosa*: efecto de la dispersión y de la tasa de deterioro

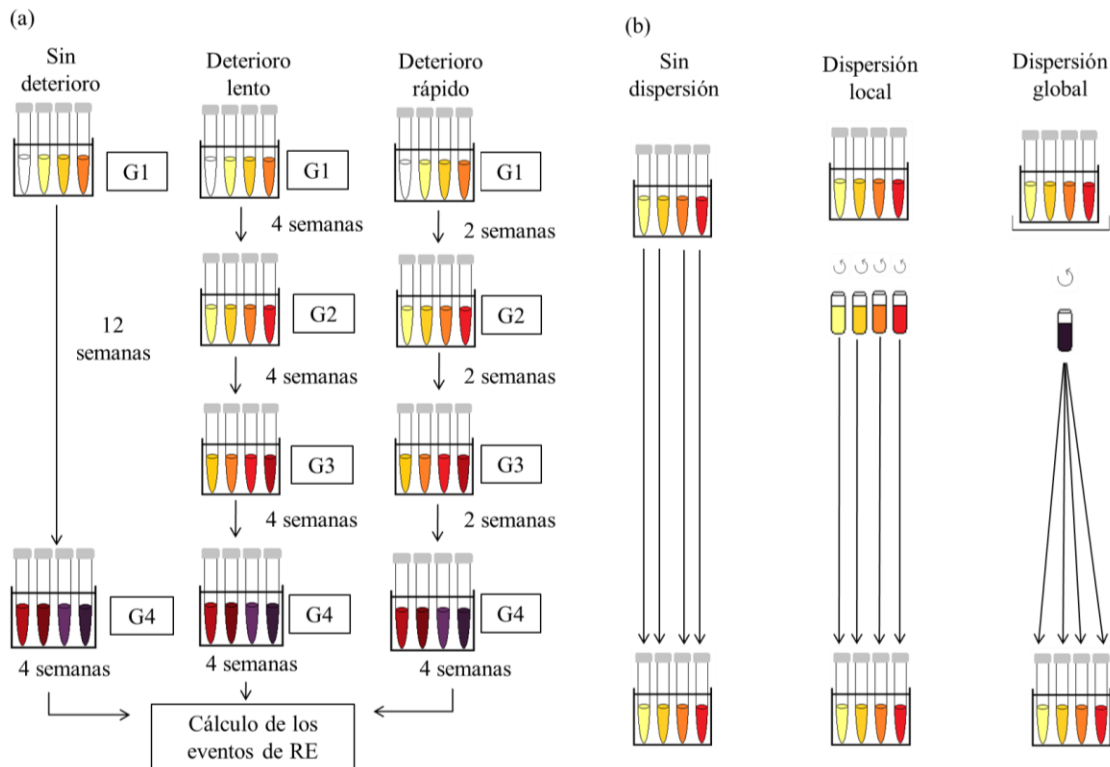
Para estudiar los efectos del deterioro ambiental y el modo de dispersión en la dinámica de RE bajo selección por sulfuro, se realizó un experimento con la cepa silvestre de *M. aeruginosa* Ma1Vc (Fig. II.7) basado en el diseño de Bell y Gonzalez (2011). Se usó la cepa Ma1Vc por ser la cepa más sensible al sulfuro. Además, fue la cepa usada en el experimento de análisis de fluctuación, y la que consiguió un aumento mayor de tolerancia al sulfuro en el experimento de trinquete.

Se impusieron nueve condiciones diferentes: la combinación de tres velocidades de deterioro ambiental (control -sin deterioro-, deterioro lento y rápido, Fig. II.7a) y de tres modos de dispersión (control -sin dispersión-, dispersión local y global; Fig. II.7b). Los cultivos bajo cada tratamiento se sometieron a cuatro gradientes de estrés de sulfuro (G), que incluyeron cuatro niveles por gradiente, aumentando 30  $\mu\text{M}$  en cada paso: G1 (0, 30, 60 y 90  $\mu\text{M}$ ), G2 (30, 60, 90 y 120  $\mu\text{M}$ ), G3 (60, 90, 120 y 150  $\mu\text{M}$ ) y G4 (150, 180, 210 y 240  $\mu\text{M}$ ) (Fig. II.7a). En G4, todas las concentraciones utilizadas eran letales para esta cepa, lo cual es necesario para observar eventos de RE. Se prepararon tres cultivos independientes para cada concentración de sulfuro en cada gradiente; en total, el experimento comprendió 108 poblaciones comenzando en el nivel más bajo de sulfuro (gradiente G1). Cada población de *M. aeruginosa* se estableció con una densidad celular de  $1,5 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$  y se cultivó en tubos de 15 mL en 4 mL de BG11-50% tamponado con HEPES 20 mM, pH 7,2, con la correspondiente concentración de sulfuro.

Para simular los tres modos diferentes de deterioro ambiental, los cultivos se transfirieron al siguiente gradiente a diferentes velocidades. En los tratamientos de deterioro ambiental lento y rápido, las poblaciones se transfirieron al siguiente nivel cada



cuatro o cada dos semanas, respectivamente (Fig. II.7a). En el tratamiento sin deterioro, los cultivos permanecieron en el nivel G1 durante 12 semanas antes de la transferencia al nivel G4. En todos los tratamientos, los cultivos se mantuvieron en el nivel G4 durante 4 semanas, tiempo tras el cual se calculó el número de eventos de RE (Fig. II.7a).



**Fig. II.7** Diagrama del experimento de rescate evolutivo en *M. aeruginosa*. (a) Cada gradiente de sulfuro (de G1 a G4) comprendió cuatro concentraciones crecientes (representadas por diferentes colores) y estas concentraciones se incrementaron en cada nuevo nivel de sulfuro: G1 (0, 30, 60 y 90  $\mu\text{M}$ ), G2 (30, 60, 90 y 120  $\mu\text{M}$ ), G3 (60, 90, 120 y 150  $\mu\text{M}$ ) y G4 (150, 180, 210 y 240  $\mu\text{M}$ ). Cada concentración se analizó en tres poblaciones diferentes (no mostradas). En el tratamiento sin deterioro, las poblaciones permanecieron en el gradiente de sulfuro inicial durante 12 semanas, hasta la transferencia al gradiente G4 (donde se supone que todas las concentraciones de sulfuro analizadas son letales). Los tratamientos de deterioro lento y rápido pasaron por G2 y G3, pero la transferencia al siguiente gradiente se realizó después de 4 o 2 semanas, en los tratamientos de deterioro lento o rápido, respectivamente. Las poblaciones permanecieron 4 semanas en G4 en todos los tratamientos. (b) Todos los cultivos de las tres condiciones de deterioro se transfirieron cada semana a un medio fresco de una manera diferente dependiendo de la condición de dispersión aplicada. En la condición sin dispersión, las transferencias se hicieron directamente. En la condición de dispersión local, las 3 poblaciones o réplicas a la misma concentración de sulfuro se mezclaron, y se inocularon 3 nuevas poblaciones con el cultivo mixto. En la dispersión global, todos los tubos de las 4 concentraciones diferentes, 12 tubos en total, se mezclaron, y se inocularon 12 nuevas poblaciones (4 concentraciones con 3 réplicas cada una) con este cultivo mixto.

Para llevar a cabo los tres modos de dispersión, todos los cultivos (de todos los modos de deterioro) se transfirieron cada semana a medio fresco de tres maneras diferentes (Fig. II.7b). El tratamiento control (sin dispersión) se logró transfiriendo una parte alícuota de la población (50  $\mu$ L) a nuevo medio fresco (Fig. II.7b). La dispersión local se logró mezclando los tres cultivos celulares (tres poblaciones) sometidos a la misma concentración de sulfuro (Fig. II.7b). Para este propósito, se colocaron 75  $\mu$ L de cada población en un tubo Eppendorf y se mezclaron. De esta mezcla, se transfirieron tres alícuotas de 50  $\mu$ L a tres tubos nuevos con medio fresco. Para la simulación de dispersión global, se mezclaron las doce poblaciones del mismo gradiente de sulfuro (Fig. II.7b) como se indicó anteriormente, y se transfirieron doce alícuotas de 50  $\mu$ L a los medios nuevos correspondientes. Se siguió el mismo procedimiento cuando hubo un cambio en el nivel de sulfuro, como se indica a continuación. Tras dos (deterioro rápido) o cuatro (deterioro lento) semanas al mismo nivel de sulfuro, las poblaciones se transfirieron al siguiente nivel. Dicha transferencia se realizó de manera diferente dependiendo del modo de dispersión, como se explicó anteriormente: sin mezclar (sin dispersión), con mezcla entre tubos de la misma concentración de sulfuro (dispersión local) o con la mezcla de todos los tubos del mismo nivel de sulfuro (dispersión global).

El aumento en la concentración de sulfuro del nivel de G1 a G2 fue de 0 a 30  $\mu$ M, de 30 a 60  $\mu$ M, de 60 a 90  $\mu$ M y de 90 a 120  $\mu$ M sulfuro. Se siguió un procedimiento similar al cambiar de G2 a G3 y de G3 a G4.

Para mantener la concentración de sulfuro y el pH lo más constante posible durante las incubaciones, todos los tubos se mantuvieron cerrados, se añadió sulfuro diariamente y el medio se renovó semanalmente en cada transferencia, como se indicó anteriormente. Para controlar las tasas de crecimiento a lo largo del experimento, se midió  $A_{750}$  cada semana en cada población para estimar la densidad celular.

Una vez finalizada la incubación en el nivel G4, se determinó que se había producido un evento de RE si la tasa de crecimiento después de las cuatro semanas en este nivel fue igual o superior a la tasa de crecimiento observada justo antes del tratamiento G4 (es decir, se detectó un aumento absoluto en el valor de  $m$ ). Esta definición de RE es muy restrictiva, ya que se pueden dar eventos de RE (disminución y recuperación del valor de  $m$ ) sin que se exceda la densidad inicial previa al estrés, pero asegura que los eventos que se contemplen permitan la proliferación futura de las poblaciones. El experimento completo fue realizado tres veces.



### II.2.5.2. Estudio del coste de la resistencia al sulfuro de las cepas resistentes en términos de crecimiento, fotosintéticos y morfológicos

#### II.2.5.2.1. Condiciones de cultivo de las cepas resistentes a sulfuro

Mediante el protocolo expuesto en la sección II.2.5.1.2. (experimento de trinquete) se obtuvieron tres cepas resistentes a sulfuro de *M. aeruginosa*: Ma1R a partir de Ma1Vc, Ma5R a partir de Ma5Vc, y MaAR a partir de MaAVc; además, una cepa con una tolerancia a sulfuro aumentada, O1R, a partir de la cepa silvestre O1LH de *Oscillatoria*. Estas cepas se mantuvieron en el cepario, en las mismas condiciones de luz y temperatura que las cepas silvestres. Para su cultivo, se usaron cajas de cultivo con tapón perforado. El medio de cultivo de las cepas resistentes se enriqueció con sulfuro en función de su tolerancia (que se mostrará en la sección II.3.3.2.): 0,4 mM para las cepas Ma1R y Ma5R, 0,27 mM para MaAR, y 1 mM para la cepa O1R. La concentración de HEPES usada fue de 5 mM para las cepas Ma1R, Ma5R y MaAR, y 20 mM para la cepa O1R. El sulfuro se añadió diariamente, en la forma  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ , a partir de una solución madre de sulfuro con una concentración entre 210 - 240 mM (pH ~ 13).

Para el estudio del coste de la resistencia, que se detalla en los apartados siguientes, se eligieron dos de las tres las cepas resistentes de *M. aeruginosa* (Ma1R y Ma5R), por presentar un máximo de tolerancia mayor tras la realización del experimento de trinquete (apartado II.3.3.2.).

#### II.2.5.2.2. Crecimiento de las cepas resistentes en condiciones no selectivas y en presencia de sulfuro

La comparación de los datos de crecimiento obtenidos en ausencia de sulfuro por las cepas resistente y su comparación con el valor de  $m$  obtenido por las cepas silvestres correspondientes, permite evaluar el coste de la resistencia en términos de crecimiento. Por otra parte, se analizó el efecto del sulfuro en la tasa de crecimiento de estas cepas resistentes para determinar con más precisión el grado de tolerancia alcanzado por las mismas.

El efecto del sulfuro en el valor de  $m$  de las cepas resistentes se cuantificó con el mismo protocolo que el usado para las cepas silvestres de cada una de las especies (ver apartado II.2.3.2.). En el caso de las cepas resistentes de *M. aeruginosa*, el efecto del sulfuro se midió a concentraciones crecientes del mismo (0, 0,05, 0,1, 0,2, 0,4, 0,6 y 0,8 mM), inoculado a partir de una solución madre 21 - 24 mM sulfuro (pH ~ 13). Las réplicas ( $n = 5$ ) se inocularon con una densidad celular inicial de  $2,5 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup> en 4 mL de BG11-50%, 20 mM HEPES (pH 7,2). El sulfuro se añadió diariamente para mantener su concentración lo más estable posible, y debido a la presencia del tampón HEPES, el pH no se vio afectado de manera significativa.

La densidad celular final de las cepas de *M. aeruginosa* se estimó utilizando una cámara Neubauer. En este caso no se pudo usar la medida de  $A_{750}$  como estimador de la densidad celular pues, como se comentó anteriormente, la adición de sulfuro provocó la precipitación de azufre, lo que provocó turbidez, interfiriendo en la medida de absorbancia. En el caso de la cepa resistente de *Oscillatoria* se usaron concentraciones de sulfuro de 0, 0,05, 0,1, 0,2, 0,35, 0,5, 0,7, 0,9, 1,2, 1,4, 1,6, 1,8 y 2 mM. Asimismo, no se pudieron ensayar concentraciones mayores debido a la precipitación de azufre y a la alcalinización del medio (el pH no pudo mantenerse estable a pesar de que el medio se tamponara). El crecimiento se estimó mediante la cuantificación de la biomasa, usando la cantidad de Chl *a* como estimador (apartado II.2.5.2.4.).

### II.2.5.2.3. Tasa de fotosíntesis de las cepas silvestres y resistentes en ausencia de sulfuro. Medida de la producción de oxígeno

Para medir la tasa de fotosíntesis en condiciones no selectivas (ausencia de sulfuro) y evaluar de esta manera el coste de la resistencia en términos fotosintéticos, se usaron dos electrodos de oxígeno Oxygraph de fase líquida DW1/AD (Hansatech Instruments Ltd, Reino Unido) conectados en serie, y cuya señal fue registrada en continuo con el software Oxyview. Las medidas se realizaron a una temperatura controlada de 20 °C, mediante la recirculación de agua procedente de un baño termostatzado y a través de una camisa externa a las cámaras de incubación. Para las medidas se añadió 2 mL de BG11-50%, HEPES 20 mM (pH 7,2) en la cámara de incubación, con una densidad celular de  $2,5 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup> para las medidas con las cepas Ma1Vc y Ma1R de *M. aeruginosa*,



o bien 20 mg de *PF* en el caso de las cepas O1LH y O1R de *Oscillatoria*. La agitación de los cultivos se llevó a cabo mediante un agitador magnético situado en la base de la cámara. Las muestras (seis por cepa) se incubaron durante 15 minutos en oscuridad para determinar la tasa de respiración (TR), cubriendo cuidadosamente las cámaras con un plástico negro. Posteriormente, se expusieron a ocho niveles de irradiancia (0, 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200 y 300  $\mu\text{mol de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) durante 5 min. Se usaron dos lámparas fluorescentes (OSRAM L 18W/865) como fuente de luz, cuya posición se ajustó en función de la intensidad de luz deseada. La irradiancia se midió con un sensor cuántico esférico (US-SQS/L, Walz, Alemania), conectado a un radiómetro (LI-COR®LI-250A, Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE, EEUU).

Los datos de fotosíntesis se expresaron como tasa de fotosíntesis neta (TFN), en  $\text{nmol O}_2 \mu\text{g Chl } a^{-1} \text{ h}^{-1}$  y  $\text{nmol O}_2 \mu\text{g } 10^6 \text{ cél}^{-1} \text{ h}^{-1}$  para las cepas de *M. aeruginosa*, y en  $\text{nmol O}_2 \mu\text{g Chl } a^{-1} \text{ h}^{-1}$  para las cepas de *Oscillatoria*. Los datos se ajustaron a la ecuación de Edwards y Walker (1983) utilizando el software GraphPad Prism versión 7.00 para Windows (ecuación 12):

$$\text{TFN} = \text{TFN}_{\text{max}} \times (I - I_c) / (I + I_{0,5}) \quad [\text{ecuación 12}]$$

donde  $\text{TFN}_{\text{max}}$  es la tasa de fotosíntesis neta máxima,  $I$  es la irradiancia incidente,  $I_c$  es el punto de compensación para la irradiancia, e  $I_{0,5}$  es la irradiancia de semisaturación.

La eficiencia fotosintética ( $\alpha^{\text{TFN}}$ ) se estimó como la pendiente de la regresión lineal obtenida al ajustar los cuatro primeros valores de la relación TFN vs.  $I$ .

### II.2.5.2.4. Composición pigmentaria de las cepas silvestres y resistentes. Cuantificación de pigmentos fotosintéticos

Con el objetivo de realizar una comparación en la composición pigmentaria entre cepas sensibles y resistentes al sulfuro, se cuantificó la concentración tanto de los pigmentos liposolubles (Chl  $a$  y carotenoides totales, CT) como de los hidrosolubles (ficobiliproteínas: ficocianina -FC- y ficoeritrina -FE-). Por otra parte, y siguiendo el mismo protocolo que se indica aquí para la Chl  $a$ , dicho contenido se midió, en el caso de *Oscillatoria*, siempre y cuando fue necesario cuantificar su biomasa para determinar la

tasa de crecimiento; además, para ambas especies, cuando se hicieron medidas relacionadas con sus características fotosintéticas.

La extracción de pigmentos se llevó a cabo en oscuridad y en frío. Para ello, se centrifugó un volumen de 2 mL de los cultivos en tubos Eppendorf de 2 mL, a 6850g durante 8 minutos a 4 °C usando una centrífuga (MPW 350R), y el “pellet” se congeló a -18° C durante, al menos, 24 h. La congelación, además, ayudó a la ruptura de las células. La extracción de los pigmentos liposolubles se realizó usando 2 mL de N,N-dimetilformamida (DMF) como disolvente. Adicionalmente, en las muestras de *Oscillatoria* se utilizó un disruptor (Pobel, Madrid, España) para facilitar la disgregación del “pellet”. Por otro lado, la extracción de pigmentos hidrosolubles se realizó mediante la adición de 2 mL de tampón fosfato (0,1 M, pH 6,5) al “pellet” congelado. Para asegurar la lisis celular se usó un sonicador (Vibra-Cell™), para lo cual las muestras se sometieron a tres pulsos de 10 s a 50 W a intervalos de 40 s, y a 4 °C. Los tubos Eppendorf con las muestras se mantuvieron, en todo momento, inmersos en hielo picado. Tras la adición del disolvente, tanto en pigmentos hidrosolubles como liposolubles, y después de 24 h de incubación en frío (4 °C) y oscuridad, las muestras se centrifugaron nuevamente a 20900g durante 15 min, retirando el sobrenadante para medir la absorbancia.

La cuantificación de pigmentos liposolubles se realizó siguiendo a Wellburn (1994). La absorbancia a 750 nm se usó como un estimador de la turbidez de la muestra; si esta absorbancia era mayor de 0,015, se volvió a repetir la fase de centrifugado a 20900g durante 15 min. A todas las medidas de absorbancia se les restó la medida a 750 nm. Las ecuaciones utilizadas fueron las siguientes:

$$\text{Chl } a \text{ (}\mu\text{g mL}^{-1}\text{)} = 12 A_{663,8} - 3,11 A_{646,8} \quad \text{[ecuación 13]}$$

$$\text{CT (}\mu\text{g mL}^{-1}\text{)} = (1000 A_{480} - 1,12 \text{ Chl } a) / 245 \quad \text{[ecuación 14]}$$

Para estimar los pigmentos hidrosolubles, se siguieron las ecuaciones propuestas por Beer y Eshel (1985):

$$\text{FC (mg mL}^{-1}\text{)} = [(A_{618} - A_{645}) \times 0,15] \times 0,15 \quad \text{[ecuación 15]}$$

$$\text{FE (mg mL}^{-1}\text{)} = [(A_{564} - A_{592}) - (A_{455} - A_{592}) \times 0,20] \times 0,12 \quad \text{[ecuación 16]}$$



En el caso de *Oscillatoria*, en vez de usar la densidad de cultivos, la cantidad de pigmentos se refirió por unidad de *PF*.

### II.2.5.2.5. Contenido de carbono y nitrógeno total en las cepas silvestres y resistentes

Para la medición del contenido en C y N elemental de las cepas silvestres y resistentes de *M. aeruginosa* y *Oscillatoria*, se prepararon 5 muestras por cepa con un peso de, al menos, 5 mg por réplica. Para ello, se centrifugaron cultivos en fase de crecimiento exponencial a 20 °C y a 6850g durante 8 min. El “pellet” se congeló a -18 °C durante 24h. Las medidas se realizaron en los SCAI de la Universidad de Málaga, usando un autoanalizador elemental CHN (Modelo 2400C; Perkin Elmer Analytical Instruments, Waltham, Massachusetts, EEUU) a través del método DOI (Kristensen y Andersen, 1987).

### II.2.5.2.6. Biovolumen celular de *M. aeruginosa* y distribución de tamaños de los agregados de *Oscillatoria sp.*

Para determinar la posible existencia de cambios morfológicos en las cepas resistentes frente a las sensibles, se midió el volumen celular de las células pertenecientes a las cepas silvestre y resistente, Ma1Vc y Ma1R de *M. aeruginosa*. Se midieron 200 células por cepa, al azar, midiendo los dos ejes principales celulares (largo y ancho). Las imágenes se procesaron utilizando un software público específico (Fot-O-Matón II) desarrollado por el Dr. J. M. Blanco, del Grupo de Investigación de Ecología y Limnología Marina (GEML RNM-192) en la Universidad de Málaga. El biovolumen se estimó, finalmente, mediante el procesamiento manual de los datos.

La naturaleza filamentosa de las cepas O1LH y O1R de *Oscillatoria* no permitió la cuantificación del tamaño celular. En su lugar, se midió la distribución de tamaños de los agregados que forman los filamentos. Se analizaron tres réplicas de 5 mg *PF* a través de un sistema FlowCAM equipado con una celda de flujo de 100 µm y objetivo 10×. El análisis se realizó en modo de autoimagen, donde se toman imágenes individuales de

cada partícula en el campo de visión, elaborando la estructura de tamaños de acuerdo a Reul et al. (2014).

II.2.5.3. Estudio de las características fotosintéticas de las cepas silvestres y resistentes en presencia de sulfuro

*II.2.5.3.1. Rendimiento cuántico máximo del PSII y tasa de transporte de electrones*

Como se puntualizó en el apartado II.2.2., el H<sub>2</sub>S en soluciones acuosas reacciona con el oxígeno. Por ello, el efecto del sulfuro en la fotosíntesis no se puede evaluar correctamente determinando la producción de O<sub>2</sub>. No obstante, las medidas de fluorescencia sí permiten determinar el efecto del sulfuro a través del cambio en el rendimiento cuántico máximo del PSII y la consecuente afección en la tasa de transporte de electrones (ETR).

Para la medida del rendimiento cuántico máximo del PSII se necesita determinar dos niveles de fluorescencia,  $F_0$  y  $F_m$ , que, sin embargo, no se miden tan fácilmente en cianobacterias como en plantas y algas (Stirbet et al., 2019). El primero de ellos representa la fluorescencia mínima,  $F_0$ , que se espera que refleje el estado en el que todos los centros de reacción del PSII están abiertos (es decir, con el “pool” de quinonas en estado oxidado).  $F_m$ , por su parte, representa la fluorescencia máxima, que refleja el estado en el que todos los centros de reacción del PSII están cerrados (es decir, con el “pool” de quinonas en estado reducido). Para obtener ambas medidas de fluorescencia las muestras han de preincubarse en oscuridad. La diferencia entre  $F_m$  y  $F_0$  representa la fluorescencia variable ( $F_v$ ), que indica la capacidad del PSII para llevar a cabo reacciones fotoquímicas, es decir, reducir el “pool” de quinonas. De este modo, la relación  $F_v/F_m$  estima el rendimiento cuántico máximo del PSII, es decir la máxima eficiencia con la que la energía de los fotones se disipa por la vía fotoquímica, es decir, hacia la formación de ATP y NADPH (Baker, 2008).

Para las medidas de fluorescencia se utilizó un fluorímetro WATER-PAM (Walz, Effeltrich, Alemania) que permite realizar medidas ultrasensibles de fluorescencia a concentraciones muy bajas de Chl *a*; se suele usar, en particular, para la evaluación de fitoplancton en aguas superficiales naturales. Posee una cubeta de vidrio de cuarzo de 15

mm de diámetro, rodeada de diodos emisores de luz (LED) que suministran luz de medición e iluminación actínica a la muestra. La incubación de las muestras y las medidas posteriores con el WATER-PAM se realizaron a 20 °C. Las muestras, tres por concentración de sulfuro, se prepararon en tubos Falcon de 15 mL, con 0,1 µg de Chl *a* mL<sup>-1</sup> en 3 mL de BG11-50%, HEPES 20 mM con concentraciones crecientes de sulfuro (0, 0,025, 0,05, 0,1, 0,2, 0,4 y 0,8 mM de sulfuro). Las muestras se incubaron por un total de 60 min: 45 min en luz a 50 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, y 15 min en oscuridad. Al preincubar los cultivos en oscuridad, se consigue oxidar la cadena transportadora de electrones. Una vez acabada la incubación en oscuridad se procedió a la medida del rendimiento cuántico máximo del PSII y la ETR.

Tras introducir las muestras en la cámara de medida del WATER-PAM, se midió  $F_0$ , y se indujo un pulso de luz saturante, estimando  $F_m$ . Con ello, se obtiene el rendimiento cuántico máximo ( $F_v/F_m$ ), de acuerdo con Genty et al. (1989) (ecuación 17):

$$F_v/F_m = (F_m - F_0) / F_m \quad \text{[ecuación 17]}$$

Este índice es adimensional y oscila entre 0 y 1, siendo independiente de la concentración de Chl *a* de la muestra. Sin embargo, todas las medidas se realizaron ajustando la misma concentración de Chl *a* a 0,1 µg mL<sup>-1</sup>.

Aunque en plantas el valor de  $F_v/F_m$  es un índice de la eficiencia fotoquímica máxima del PSII (Björkman y Demmig, 1987; Campbell et al., 1998), esto no es estrictamente cierto en cianobacterias, ya que existe una dificultad obvia para obtener  $F_0$  debido a que la contribución de la fluorescencia del PSI es muy alta a temperatura ambiente (generalmente la ratio PSI:PSII en cianobacterias está entre 3 - 5:1, Stirbet et al., 2019). No obstante,  $F_v/F_m$  sigue siendo un parámetro útil si se usa para comparar entre cepas de cianobacterias, particularmente si la misma muestra se controla repetidamente a lo largo del tiempo y si el contenido de pigmentos fotosintéticos es constante (Campbell et al., 1998), condiciones que se siguieron cuidadosamente.

Una vez determinado el valor de  $F_v/F_m$  se procedió a realizar una curva ETR-*I* siguiendo el protocolo “light curve” del software de control del WATER-PAM (Wincontrol - 3.29), usándose las irradiancias 0, 13, 24, 36, 57, 90, 136, 195, 271 µmol fotones s<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup>. El valor de ETR se calculó usando la eficiencia fotoquímica de PSII ( $Y(II)$ ) a diferentes irradiancias siguiendo a Genty et al. (1989) (ecuación 18):

$$ETR = I \times Y(II) \times 0,36 \times a^* \quad \text{[ecuación 18]}$$

donde 0,36 es un factor de corrección debido a que la intervención de los dos fotosistemas es desigual en cianobacterias (se asume que sólo el 36% de los fotones que llegan al cultivo son absorbidos por el PSII; Johnsen & Sakshaug, 1993) y  $a^*$  es la absorptancia del cultivo, que se define como la proporción de irradiancia absorbida por la muestra. El valor de  $a^*$  se calculó como la diferencia entre la irradiancia incidente y la que deja pasar un cultivo, siendo la absorptancia aquella irradiancia que la muestra absorbe de manera efectiva (ecuación 19):

$$a^* = 1 - t \quad \text{[ecuación 19]}$$

siendo  $t$  la transmitancia, calculada como el cociente entre la irradiancia incidente y la irradiancia que el cultivo deja pasar. Se trata de una medida adimensional que oscila entre 0 y 1. Las medidas de  $a^*$  se realizaron a 20 °C y en cubetas de vidrio ( $n = 3$ ). Las muestras, que contenían una concentración de 0,1 µg de Chl *a* mL<sup>-1</sup> en 3 mL de BG11-50%, HEPES 20 mM, se sometieron a una irradiancia incidente de 50 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, usando dos lámparas fluorescentes. La irradiancia incidente y la que dejó pasar el cultivo se midió con un el mismo sensor cuántico esférico conectado a un radiómetro descrito más arriba. Las curvas ETR-*I* se ajustaron según la ecuación de Michaelis-Menten (1913).

#### II.2.5.3.2. Fotoincorporación de NaH<sup>14</sup>CO<sub>3</sub>

Con el objetivo de analizar la capacidad de las cepas silvestres y resistentes de *M. aeruginosa*, Ma1Vc y Ma1R, y *Oscillatoria*, O1LH y O1R, para realizar fotosíntesis en presencia de sulfuro, bajo la consideración, además, de que las cepas resistentes pudieran presentar fotosíntesis anoxigénica dependiente de sulfuro, se realizó un experimento de fotoincorporación de carbono marcado en la forma NaHCO<sub>3</sub> [<sup>14</sup>C]. El estudio se realizó en los SCAI de la Universidad de Málaga. La incorporación de <sup>14</sup>C se analizó siguiendo el protocolo de Myers y Richardson (2009), para lo cual se usaron cinco condiciones diferentes: (i) en luz, aerobiosis, sin sulfuro (para la medida de la fotosíntesis oxigénica); (ii) en luz, anaerobiosis y con la adición de 0,5 mM de sulfuro (fotosíntesis oxigénica



resistente al sulfuro); (iii) en luz, anaerobiosis y con la adición de sulfuro 0,5 mM y 10  $\mu\text{M}$  3-(3',4'-diclorofenil)-1-1-dimetilurea (DCMU), para detectar la fotosíntesis anoxigénica; (iv) en luz, aerobiosis y con la adición de 10  $\mu\text{M}$  DCMU (primer control); y (v) en oscuridad y aerobiosis (segundo control). Las réplicas ( $n = 3$ ) se inocularon, en el caso de *M. aeruginosa*, con  $8 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$  a partir de cultivos en fase de crecimiento exponencial, y 5 mg *PF* por réplica para las cepas de *Oscillatoria*. Los cultivos se incubaron en oscuridad durante la noche anterior en total oscuridad para evitar la acumulación de oxígeno.

Para el experimento se usó medio de cultivo BG11-50%, HEPES 5 mM ( $\text{pH} = 7,2$ ) en viales con septum de 8 mL. Para los tratamientos en anaerobiosis (ii y iii), y con el objetivo de evitar la oxidación abiótica del sulfuro, tanto el medio como los viales se purgaron con  $\text{N}_2$  durante 45 min a través del septum, con una aguja de entrada y otra de salida, antes de la adición de sulfuro. A pesar de que el burbujeo de  $\text{N}_2$  puede modificar la alcalinidad del medio, se observó que el carbono inorgánico disuelto (DIC) no varió gracias a la capacidad tamponante del HEPES.

Se inyectaron 5 mL de medio en los todos los viales (sin burbujear en los viales para aerobiosis, y burbujeado en los viales destinados a anaerobiosis). A continuación, se añadieron 30  $\mu\text{L}$  de una solución 0,1 M de sulfuro ( $\text{pH} \sim 13$ ) para conseguir una concentración de 0,5 mM asumiendo un volumen final de 6 mL en los viales de los tratamientos (iii) y (iv). Posteriormente, se añadieron 12  $\mu\text{L}$  de un stock 5 mM de DCMU disuelto en etanol en los viales (iii) y (iv) para obtener una concentración final de 10  $\mu\text{M}$ . El DCMU bloquea el transporte de los electrones del PSII al PSI; así, la fotosíntesis oxigénica se desactiva. En la hipótesis de que las cepas resistentes al sulfuro pudieran realizar la fotosíntesis anoxigénica, usarían el  $\text{H}_2\text{S}$  como donante de electrones al PSI a través de la enzima SQR. Seguidamente, se añadió a todos los viales 30  $\mu\text{L}$  de una solución de  $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$  0,1 mCi  $\text{mL}^{-1}$  (3  $\mu\text{Ci}$  por vial) y, como paso final, 1 mL del cultivo correspondiente.

Una vez añadidas las células, los viales se incubaron durante 2 h a irradiancia saturante de la fotosíntesis ( $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), con agitación y a una temperatura de 20 °C. Las muestras destinadas a las medidas en oscuridad se cubrieron con plástico negro.

En paralelo, se preparó una batería de viales de centelleo de 7 mL con 300  $\mu\text{L}$  de ácido fórmico 10 N. Una vez pasadas las 2 h de incubación, se sacaron las muestras para medir la incorporación de  $^{14}\text{C}$ . Para ello, se añadió 1 mL de cada muestra a cada vial de

centelleo. El resto del cultivo se eliminó en el bidón de residuos líquidos de  $^{14}\text{C}$ . Estas muestras se dejaron durante 24 h en un horno a  $90\text{ }^\circ\text{C}$ , con el objetivo de evaporar el medio, hasta obtener un “pellet” seco en el fondo del vial. Tras ello, el “pellet” se resuspendió en 1 mL de agua MilliQ, y se agregaron 4 mL de líquido de centelleo (Ultima Gold), homogeneizando rápidamente. Además, se realizó un control de actividad específica del stock de  $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ , añadiendo 5  $\mu\text{L}$  del stock de  $^{14}\text{C}$  a 995  $\mu\text{L}$  de NaOH 0,5 N, además de 4 mL de líquido de centelleo. Finalmente, todos los viales se colocaron en un contador de centelleo (Beckman LS 6500). La tasa de fijación de  $^{14}\text{C}$  se expresó en función de la concentración de Chl *a* por réplica (ecuación 20).

$$\text{Tasa de fijación de } ^{14}\text{C} \text{ (nmol C } \mu\text{g Chl } a^{-1} \text{ h}^{-1}\text{)} = \frac{^{14}\text{C fijado}}{\frac{\text{Actividad total específica}}{\text{DIC} \times V \times \text{Chl} a \times \frac{n^{\circ} \text{ horas}}{60} \times 1000}} \quad [\text{ecuación 20}]$$

siendo el  $^{14}\text{C}$  fijado, el valor arrojado por el contador de centelleo (en desintegraciones por min, dpm); la actividad total específica, la del stock de  $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ ; el Carbono Inorgánico Disuelto (DIC), calculado a partir de la medida de alcalinidad y el pH usando el programa CO2SYS; *V*, el volumen de la muestra (mL); y la concentración de Chl *a*, en  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

## 2.6. Análisis estadístico

La comparación de la tasa de crecimiento de las tres cepas de *M. aeruginosa* se realizó a través de un test ANOVA modelo I de una vía. En el análisis de fluctuación, la hipótesis nula de valores similares de CV para el número de células resistentes por tubo, calculada en los sets 1 y 2 se determinó utilizando una prueba Z de una cola. La comparación de los valores medios globales de *m* de las células de *M. aeruginosa* sensibles a LHW y resistentes a LHW calculadas para el equilibrio de selección de mutación, se realizó usando una prueba *t*-Student de una cola. Los datos del número de eventos de RE se analizaron utilizando un ANOVA modelo I de dos vías, y una prueba post hoc de Student-Newman-Keuls (SNK) calculada para un nivel de confianza del 95%. La homogeneidad de las varianzas tanto en el test *t*-Student como en el ANOVA se verificó previamente con la prueba de Bartlett. Todas las pruebas se realizaron de acuerdo con Zar (1999), utilizando R Core Team (2013).

Las diferencias entre las tasas de crecimiento, concentración de pigmentos fotosintéticos, parámetros fotosintéticos, tasa de fijación de carbono (derivada del consumo de  $^{14}\text{C}$ ) y volumen celular se compararon mediante el test estadístico *t*-Student usando el software libre PAST versión 2.17 (Hammer et al., 2001).

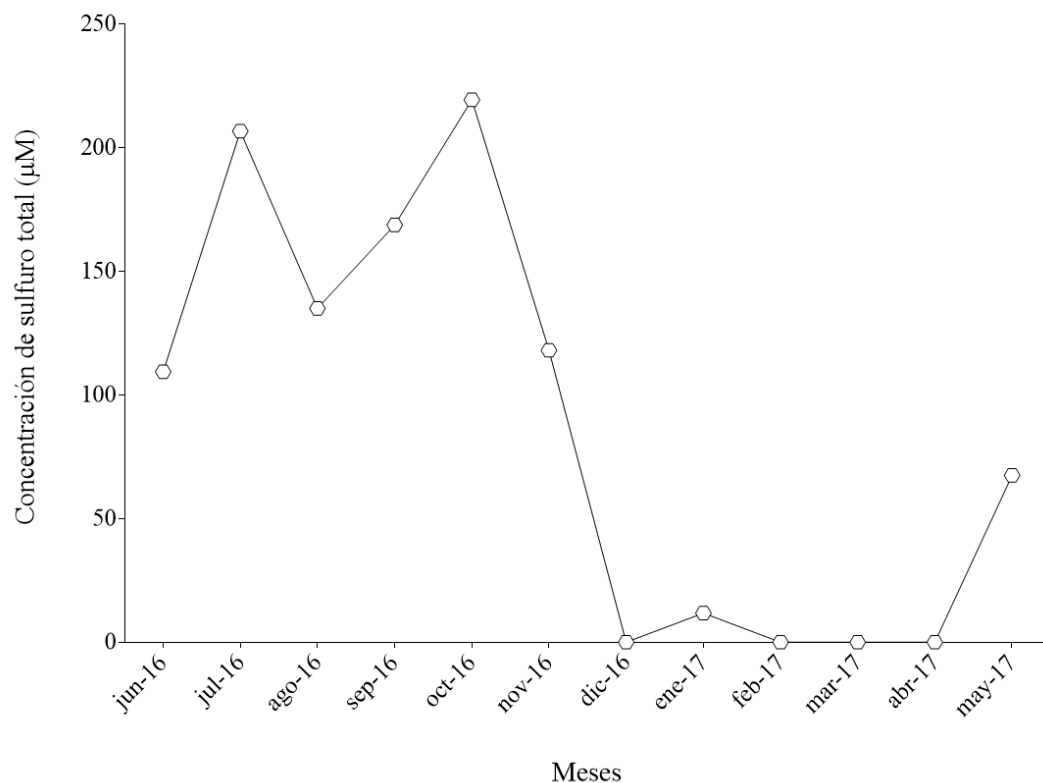
Los ajustes de las curvas TFN-*I* a la ecuación propuesta por Edwards y Walker (1984) se realizó usando el software GraphPad Prism versión 7.00 para Windows, que se ha usado, además, para la representación de todas las figuras. Se ha de resaltar que este software sólo permite el uso de puntos, en lugar de comas, como separador decimal, por lo que así se han representado los ejes de figuras de toda la Tesis Doctoral.

## II.3. RESULTADOS

### II.3.1. Caracterización del manantial de La Hedionda

#### II.3.1.1. Concentración de sulfuro total, iones y principales nutrientes

Los niveles de sulfuro de La Hedionda, medidos durante el ciclo anual (junio de 2016 - mayo de 2017), fluctuaron entre 110 y 220  $\mu\text{M}$  de junio a noviembre de 2016 (Fig. II.8). Posteriormente, entre diciembre de 2016 y abril de 2017, el nivel de sulfuro fue no detectable o muy bajo, pero aumentó hasta 68  $\mu\text{M}$  en mayo, un valor próximo al medido en junio del año anterior (Fig. II.8). La concentración de sulfuro total, a lo largo de un ciclo de 24 h realizado en julio 2017, mostró una baja oscilación: entre 76 y 101  $\mu\text{M}$ , con un valor medio de  $93 \pm 7 \mu\text{M}$  ( $n = 13$ ; datos no mostrados).



**Fig. II.8** Concentración de sulfuro total en ALH a lo largo de un año, desde junio 2016 hasta mayo 2017.

**Tabla II.1.** Concentración de iones (mM) presentes en el manantial de La Hedionda. Los datos completan un ciclo anual (junio de 2016 – junio de 2017).

Mes-año	Concentración [mM]					
	Cl <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>
jun-16	8,85	1,33	8,05	0,11	1,21	1,67
jul-16	31,00	14,99	47,36	1,09	5,46	1,75
ago-16	17,83	7,09	23,61	0,49	2,73	1,69
sep-16	8,48	1,46	7,78	0,10	1,20	1,90
oct-16	5,64	1,26	5,20	0,06	0,78	1,59
nov-16	4,08	1,03	3,80	0,05	0,59	1,35
dic-16	5,27	1,19	4,71	0,08	1,05	1,60
ene-17	8,47	1,38	7,52	0,10	1,25	1,80
feb-17	3,10	1,04	2,87	0,06	0,82	1,68
mar-17	4,62	1,16	4,18	0,07	0,96	1,93
abr-17	7,87	1,29	7,02	0,10	1,18	1,67
may-17	8,68	1,34	7,79	0,11	1,31	1,72
jun-17	7,08	1,12	6,43	0,09	0,97	1,51

**Tabla II.2.** Concentración de nitrógeno y fósforo inorgánico (µM) en el manantial de La Hedionda. Los datos completan un ciclo anual (junio de 2016 – junio de 2017).

Mes-año	Concentración [µM]		
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
jun-16	16,79	20,05	0,00
jul-16	15,71	2,26	0,59
ago-16	15,50	10,00	0,22
sep-16	8,19	17,26	0,08
oct-16	7,97	21,99	0,16
nov-16	7,98	12,04	0,11
dic-16	41,48	1,40	0,00
ene-17	8,45	18,01	0,08
feb-17	36,16	0,00	0,08
mar-17	23,84	0,00	0,08
abr-17	8,52	8,82	0,07
may-17	8,48	12,37	0,08
jun-17	7,89	14,95	0,08

La variación de la concentración de iones a lo largo de este mismo ciclo anual se presenta por separado, mostrándose, con la excepción de nitrógeno y fósforo inorgánico, en la Tabla II.1. La concentración de iones y cationes sigue un patrón homogéneo en casi todos ellos (Tabla II.1), detectándose una mayor concentración de iones en los meses de verano (en julio y agosto de 2016), probablemente debido a la ausencia de precipitaciones en esta época del año (Reul et al., 2020).

En cuanto al contenido en nitrógeno inorgánico (Tabla II.2), se observó que la concentración de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$  osciló entre 8 y 42  $\mu\text{M}$  y 0 y 20  $\mu\text{M}$ , respectivamente; el nivel de  $\text{PO}_4^{2-}$  fue de 1 a 2 órdenes de magnitud más bajo que el nivel registrado para nitrógeno inorgánico, que varió de 0 a 0,6  $\mu\text{M}$ . Curiosamente, se observa un máximo en la concentración de los iones  $\text{PO}_4^{3-}$  y  $\text{NH}_4^+$  durante el mes de julio, que podrían explicarse, en parte, por la afluencia de bañistas a la zona.

La relación N / P ( $(\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+) / \text{PO}_4^{3-}$ ) estuvo siempre muy por encima de 16, lo que sugiere una limitación relativa del crecimiento de los organismos fotosintéticos del manantial por fosfato con respecto a nitrato (Koerselman y Meuleman, 1996).

### II.3.1.2. Microorganismos fotosintéticos y abundancia de *Oscillatoria* sp.

La comunidad de cianobacterias y microalgas del manantial de La Hedionda se determinó en dos zonas diferenciadas. En primer lugar, se determinó la composición del tapete microbiano que crece en las paredes del interior de los baños siguiendo a Komárek y Anagnostidis (2005). La flora del tapete microbiano era poco diversa (Fig. II.9), observándose especies del género *Spirogyra* (Chlorophyta), *Oscillatoria* (Cyanobacteria), y diatomeas de los géneros *Navicula*, *Nitzschia*, *Achnanthes* y *Stauroneis* (Fig. II.10). Además, no se encontraron diferencias en las especies presentes tanto en la zona interior de los Baños como en el exterior. El taxón más abundante encontrado en el tapete fue *Oscillatoria*, una cianobacteria filamentosa cuya resistencia al sulfuro está ampliamente descrita en la literatura (Oren, 1978; Miller y Bebout, 2004; Myers y Richardson, 2009; Grim y Dick, 2016; Belkin y Padan, 1983). *Oscillatoria* se encontró principalmente en la capa inferior del tapete; no obstante, también estuvo presente (aunque en menor cantidad) en la parte superior (Fig. II.9).

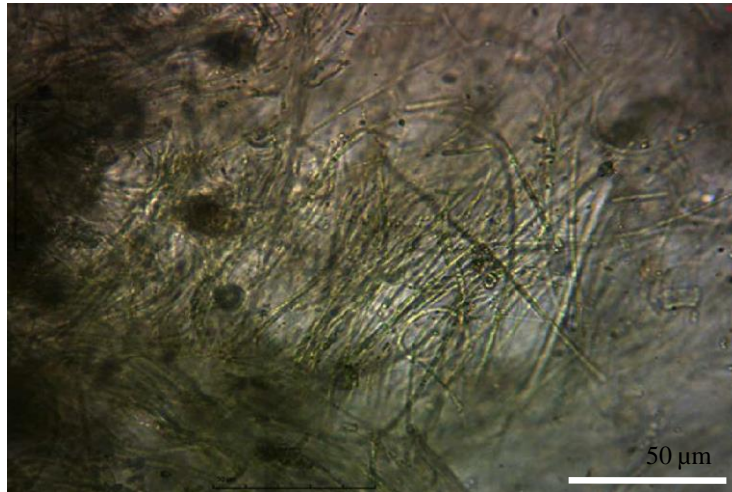


Fig. II.9 *Oscillatoria* sp. presente en el tapete microbiano de La Hedionda.

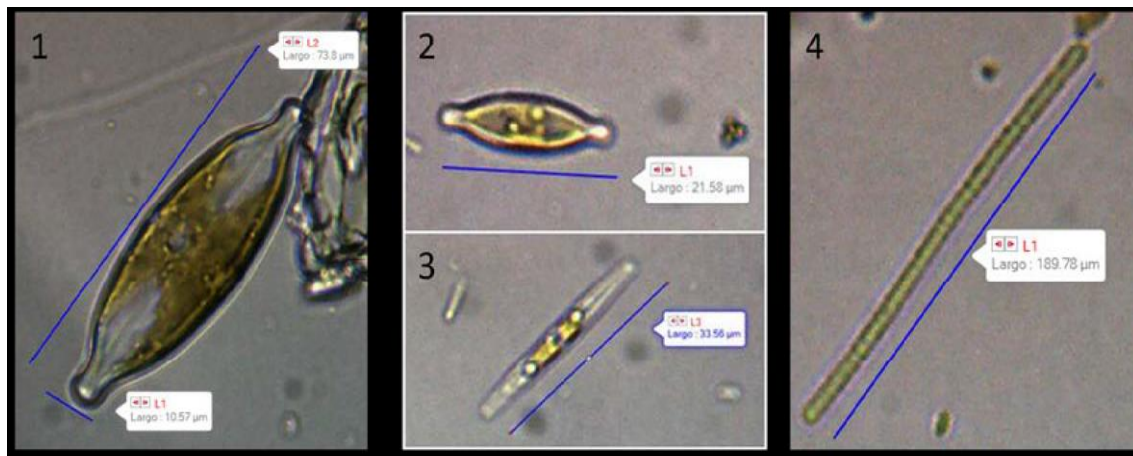
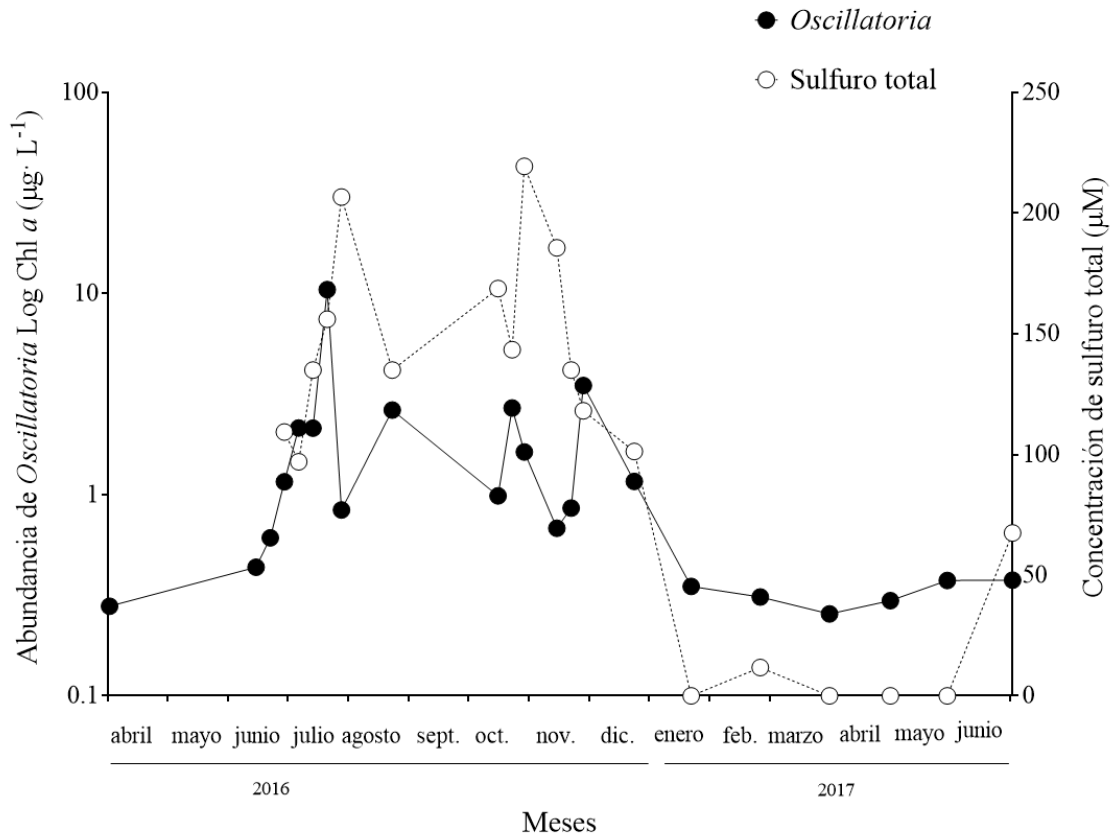


Fig. II.10 Algunos géneros de cianobacterias y diatomeas observados en los baños de La Hedionda; 1. *Stauroneis* sp. 2. *Stauroneis* sp. 3. *Nitzschia* sp. 4. *Oscillatoria* sp. Las líneas azules corresponden a las dimensiones medidas en las células.

La abundancia de *Oscillatoria* en La Hedionda fluctuó a lo largo del año siguiendo un patrón de variación coincidente con el de la concentración de sulfuro. Esto es, las mayores abundancias (aproximadamente de junio a diciembre de 2016), corresponden a momentos del año con los niveles más elevados de sulfuro en el medio (Fig. II.11). La mediana de las concentraciones de *Oscillatoria* fue significativamente mayor ( $P < 0,005$ , test de Mann–Whitney) durante la segunda mitad del año (de junio a diciembre de 2016,  $1,6 \mu\text{g Chl } a \text{ L}^{-1}$ ) que en la primera mitad (de enero a mayo de 2017,  $0,4 \mu\text{g Chl } a \text{ L}^{-1}$ ). Así, la mediana de las concentraciones de Chl *a* de los meses de verano coincide con una

concentración de sulfuro más alta ( $> 100 \mu\text{M}$ ) que en el período de baja concentración de sulfuro ( $< 100 \mu\text{M}$ ). De hecho, la mayor abundancia de *Oscillatoria* se observó a concentraciones de sulfuro de entre 100 y 200  $\mu\text{M}$ . La concentración más alta de *Oscillatoria* se observó a fines de julio de 2016 (Figura II.11).



**Fig. II.11** Ciclo anual de la abundancia de *Oscillatoria* en los baños de La Hedionda. La abundancia de *Oscillatoria* se estimó mediante el contenido de clorofila y se muestra en escala logarítmica. Se representa también la variación de sulfuro total, ya mostrada en la Figura II.8.

### II.3.2. Caracterización de las cepas silvestres de *M. aeruginosa* y *Oscillatoria* sp.

#### II.3.2.1. Tasa de crecimiento en función de la irradiancia

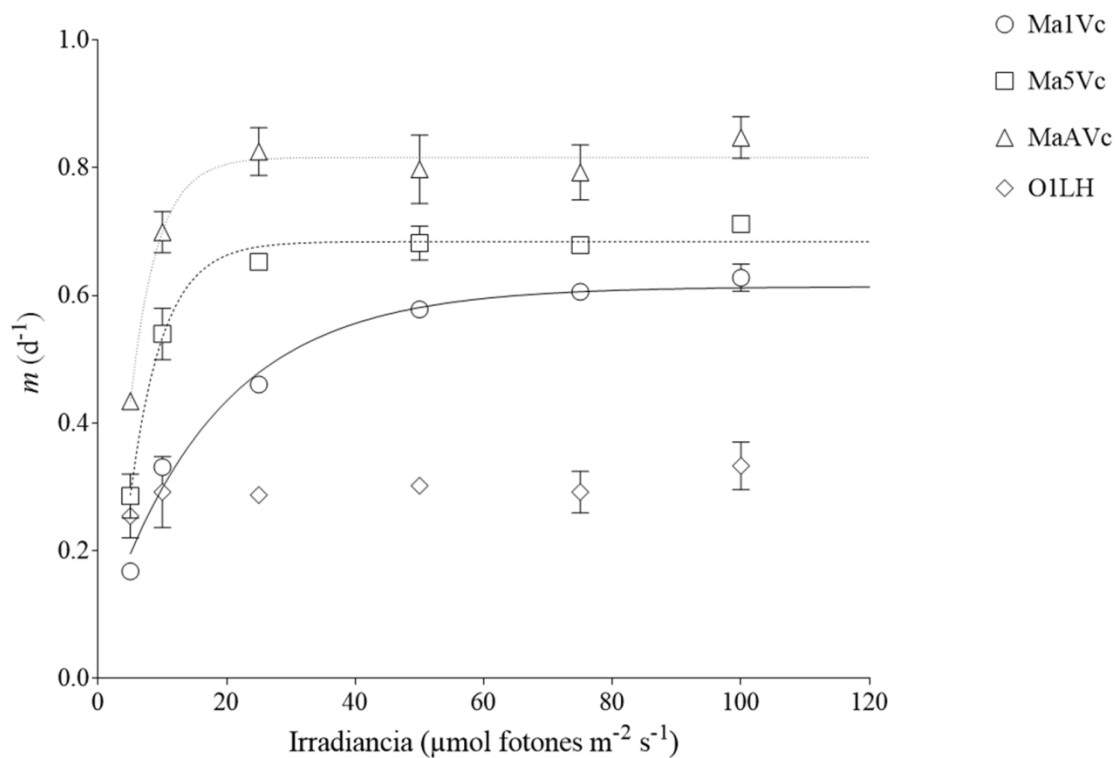
La tasa de crecimiento ( $m$ ) mostró un aumento lineal a niveles de irradiancia ( $I$ ) bajos, saturándose en torno a  $50 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$  en las tres cepas silvestres de *M. aeruginosa*. La cepa Ma1Vc creció a tasas menores que las otras dos a todas las irradiancias, siendo la cepa MaAVc la que presentó valores de  $m$  más elevados. Las



curvas de estas tres cepas se ajustaron a la ecuación de von Bertalanffy (1957; Fig. II.12), siendo (i)  $m = 0,61 \times (1 - 0,9 \times e^{-0,06I})$  para la cepa Ma1Vc; (ii)  $m = 0,68 \times (1 - 1,54 \times e^{-0,19I})$  para la cepa Ma5Vc; y (iii)  $m = 0,82 \times (1 - 1,5 \times e^{-0,24I})$  para la cepa MaAVc.

El valor de  $m$  de la cepa O1LH de *Oscillatoria* fue constante entre 5 y 100  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , mostrando un valor medio de  $0,29 \pm 0,04 \text{ d}^{-1}$  (Fig. II.12). Probablemente, la respuesta lineal del crecimiento de la cepa O1LH en función de la  $I$  se produzca a intensidades menores a 5  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , pero esas condiciones no se pudieron reproducir en el laboratorio.

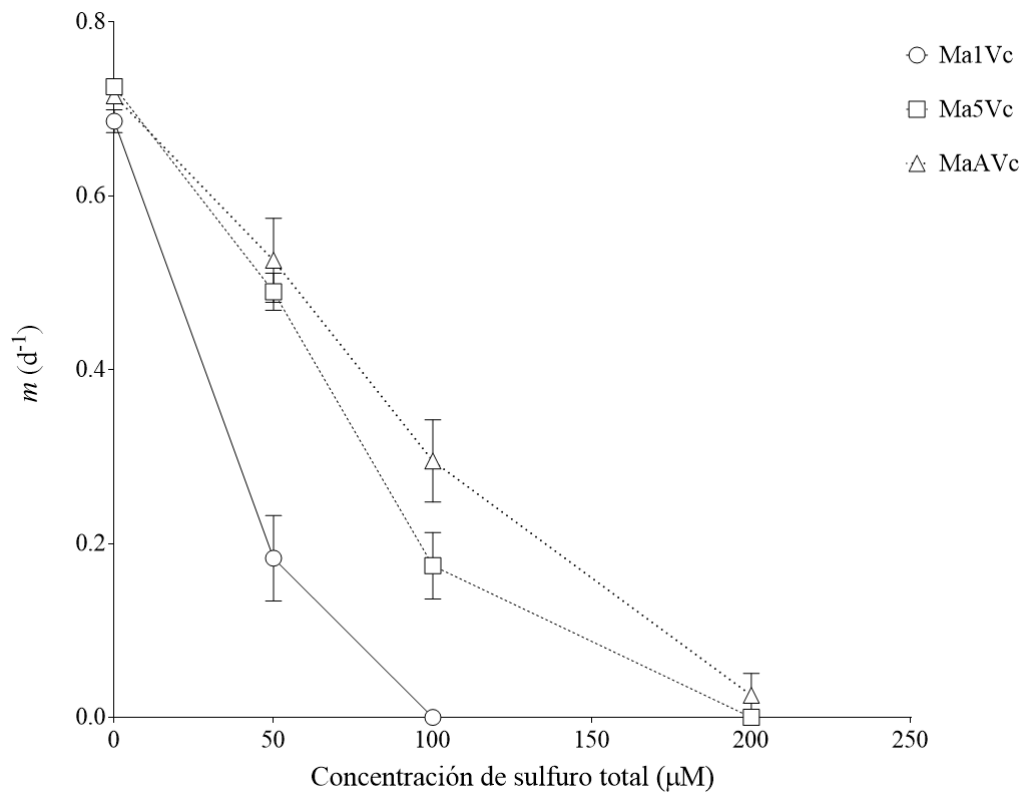
Considerando estos resultados, y para facilitar el cultivo en el cepario, se decidió cultivar todas las cepas a una irradiancia de 50 - 60  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .



**Fig. II.12** Tasa de crecimiento ( $m$ ) en función de la irradiancia de las cepas silvestres de *M. aeruginosa* (las líneas representan el ajuste de los datos a la ecuación de von Bertalanffy) y de la cepa O1LH de *Oscillatoria*. Los datos representan la media  $\pm \sigma$  ( $n = 5$ ).

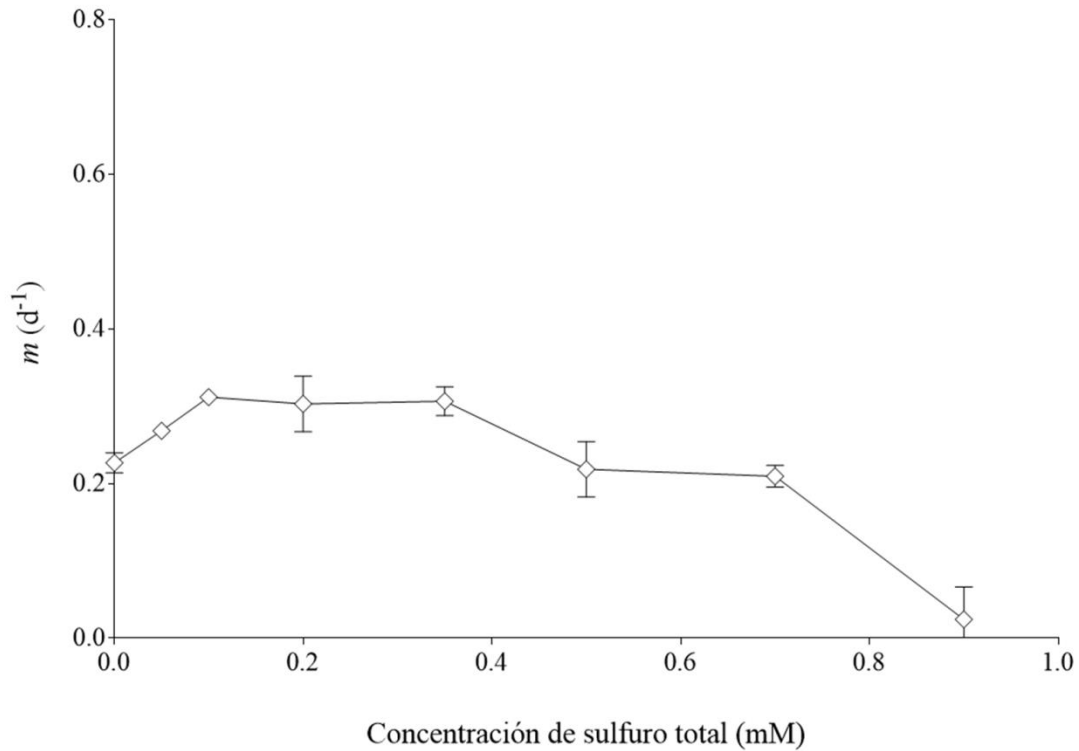
## II.3.2.2. Efecto del sulfuro en la tasa de crecimiento

En ausencia de sulfuro, no hubo diferencias significativas entre el valor de  $m$  de las cepas Ma5Vc y MaAVc ( $0,72 \pm 0,01$  y  $0,71 \pm 0,01 \text{ d}^{-1}$ , respectivamente); sin embargo, el valor de  $m$  de la cepa Ma1Vc ( $0,68 \pm 0,01 \text{ d}^{-1}$ ) fue significativamente menor ( $P < 0,001$ ; ANOVA; Fig. II.13).



**Fig. II.13** Efecto del sulfuro sobre la tasa de crecimiento ( $m$ ) de las cepas Ma1Vc, Ma5Vc y MaAVc de *M. aeruginosa*. La tasa de crecimiento se midió después de 5 días de cultivo a concentraciones crecientes de sulfuro en el medio de ensayo. Los datos corresponden a la media  $\pm \sigma$  ( $n = 5$ ).

La adición de concentraciones crecientes de sulfuro al medio provocó una reducción progresiva del valor de  $m$  en las tres cepas. Así, una concentración de 0,1 mM de sulfuro inhibió totalmente el crecimiento de la cepa Ma1Vc de *M. aeruginosa*. Sin embargo, el crecimiento en las cepas Ma5Vc y MaAVc se inhibió completamente a una concentración de 0,2 mM (Fig. II.13).



**Fig. II.14** Efecto del sulfuro sobre la tasa de crecimiento ( $m$ ) de la cepa silvestre O1LH de *Oscillatoria*. La tasa de crecimiento se midió después de 5 días de cultivo a concentraciones crecientes de sulfuro en el medio de ensayo. Los datos corresponden a la media  $\pm \sigma$  ( $n = 4$ ).

La cepa silvestre de *Oscillatoria* (O1LH) presentó una tolerancia al sulfuro bastante más elevada comparada con las cepas de *M. aeruginosa*, como era de esperar, presentando además un crecimiento mayor en presencia de sulfuro que en ausencia del mismo (Fig. II.14). Los mayores valores de  $m$  se observaron cuando el medio se enriqueció con concentraciones de sulfuro entre 0,1 y 0,35 mM, disminuyendo progresivamente a partir de 0,5 mM de sulfuro (Fig. II.14). A concentraciones por encima de 0,9 mM, no se detectó crecimiento de la cepa O1LH (Fig. II.14).

II.3.3. Aspectos evolutivos de la tolerancia al sulfuro en *M. aeruginosa*II.3.3.1. Análisis de fluctuación de la transformación de la sensibilidad a la resistencia de *M. aeruginosa* a las aguas sulfurosas de la Hedionda

Los cultivos de la cepa Ma1Vc de *M. aeruginosa* se incubaron durante 6 semanas en ALH. La concentración total de sulfuro en ALH utilizada en este experimento osciló, como se indicó en la sección II.2.1.2., entre 97 y 207  $\mu\text{M}$ , con un valor medio de  $147 \pm 36 \mu\text{M}$  ( $n = 6$ ).

**Tabla II.3.** Análisis de fluctuación de la transformación de la sensibilidad a la resistencia al ALH en la cepa Ma1Vc de *M. aeruginosa*. El asterisco indica diferencias significativas (test Z,  $P < 0,0001$ ).

	Set 1	Set 2
Número de cultivos	90	40
Número de cultivos con células en el rango:		
0	73	0
$1-10^4$	1	0
$10^4-10^5$	1	0
$10^5-10^6$	6	0
$>10^6$	9	40
CV del número de células resistentes por cultivo	2,351	0,214
Test Z de una cola para la comparación de los CVs	10,891*	
$\mu$ (células mutantes generación <sup>-1</sup> )	$2,1 \times 10^{-7}$	

En consecuencia, se pudo inferir que (i) el error experimental fue sumamente bajo y, (ii) las células resistentes a ALH surgieron antes de la exposición a ALH por mutaciones espontáneas en lugar de por aclimatación durante la exposición. La tasa de mutación espontánea ( $\mu$ ) de células sensibles a ALH a células resistentes se estimó en  $2,1 \times 10^{-7}$  células mutantes generación<sup>-1</sup> (Tabla II.3).

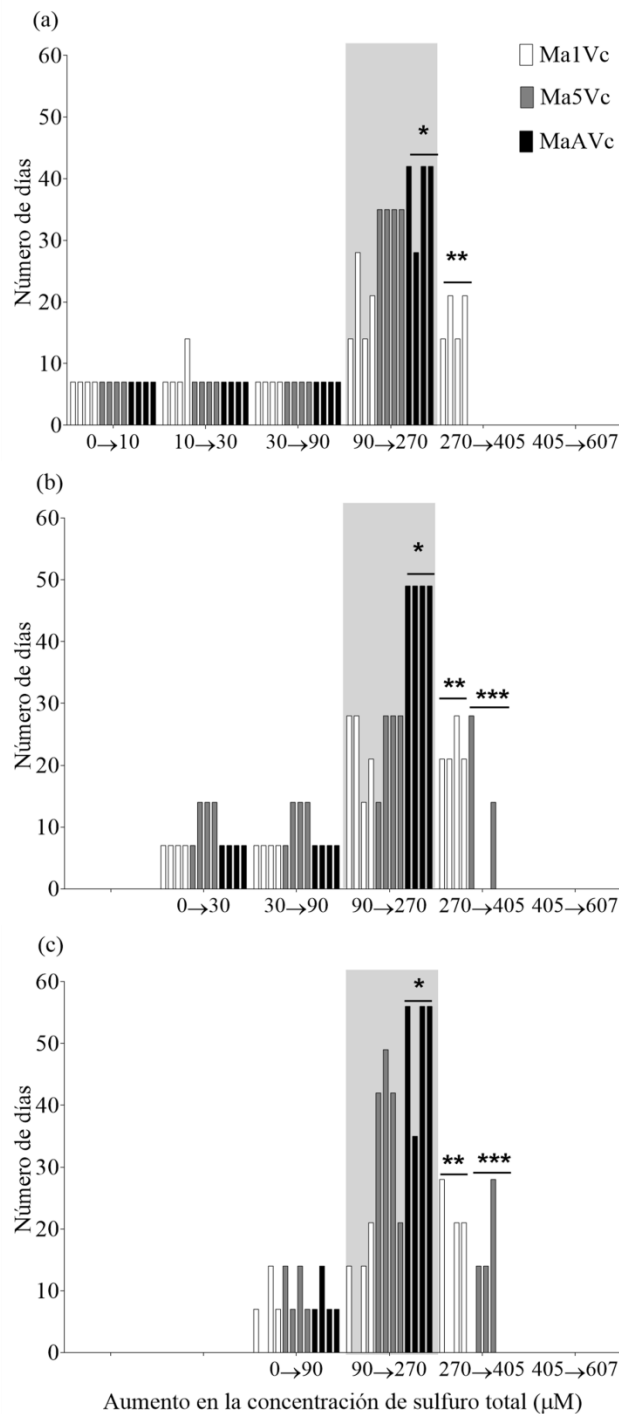
Después de las 6 semanas, se detectó crecimiento celular en 17 de los 90 cultivos del set 1. En el set 2, se detectaron células en todas las réplicas (Tabla II.3). Mientras que el número de células resistentes al sulfuro que proliferaron en los cultivos del set 1 varió en cinco órdenes de magnitud, el set 2 mostró una dispersión muy baja, por lo que el CV para el set 1 resultó significativamente mayor que el del set 2 (Tabla II.3). De los cultivos resistentes al ALH obtenidos en el set 1, se aisló uno al azar y se mantuvo en la colección de cultivos a una concentración de sulfuro de 0,2 mM.

En ausencia del agente selectivo (es decir, medio BG11-50%), el valor de  $m$  de las células de Ma1Vc sensibles a ALH ( $m^s$ ) fue de  $0,5 \pm 0,2 \text{ d}^{-1}$  ( $n = 4$ ), mientras que un valor significativamente menor ( $0,4 \pm 0,03 \text{ d}^{-1}$ ,  $n = 4$ ;  $P < 0,01$ ; test  $t$ -Student) se encontró en las células resistentes a ALH ( $m^r$ ). Utilizando los valores de  $m^s$  y  $m^r$  se calculó un coeficiente de selección ( $s$ ) de 0,22. La estimación de la frecuencia de alelos resistentes al ALH en poblaciones silvestres de *M. aeruginosa* ( $q$ ), en ausencia del agente selectivo, fue de  $9,4 \times 10^{-7}$ .

#### II.3.3.2. Límite de resistencia al sulfuro de *M. aeruginosa* y *Oscillatoria*

El límite máximo de resistencia al sulfuro fue, como se esperaba, diferente para cada especie, siendo menor en el caso de *M. aeruginosa* (Fig. II.15) que en el de *Oscillatoria* (Fig. II.16). Además, el límite de resistencia alcanzado fue distinto en una de las cepas de *M. aeruginosa*. Así, varios cultivos de la cepa Ma1Vc y Ma5Vc llegaron a mostrar crecimiento a una concentración de 405  $\mu\text{M}$  sulfuro; mientras que el límite de resistencia al sulfuro alcanzado por la cepa MaAVc fue de 270  $\mu\text{M}$ .

Las poblaciones de Ma1Vc, Ma5Vc y MaAVc cultivadas en sulfuro alcanzaron la misma concentración que el control en períodos de tiempo diferentes, especialmente a las concentraciones más altas. En el caso de Ma1Vc, incapaz de crecer a concentraciones por encima de 100  $\mu\text{M}$ , no se encontraron diferencias entre réplicas en el tiempo necesario en alcanzar la misma densidad celular que el control hasta que la concentración fue  $> 90 \mu\text{M}$  de sulfuro (todas tardaron 7 d, excepto en tres réplicas: una que no llegó a crecer en la transición de  $0 \rightarrow 90 \mu\text{M}$  de sulfuro (Fig. II.15a) y dos que tardaron 14 d; Figs. II.15ac).



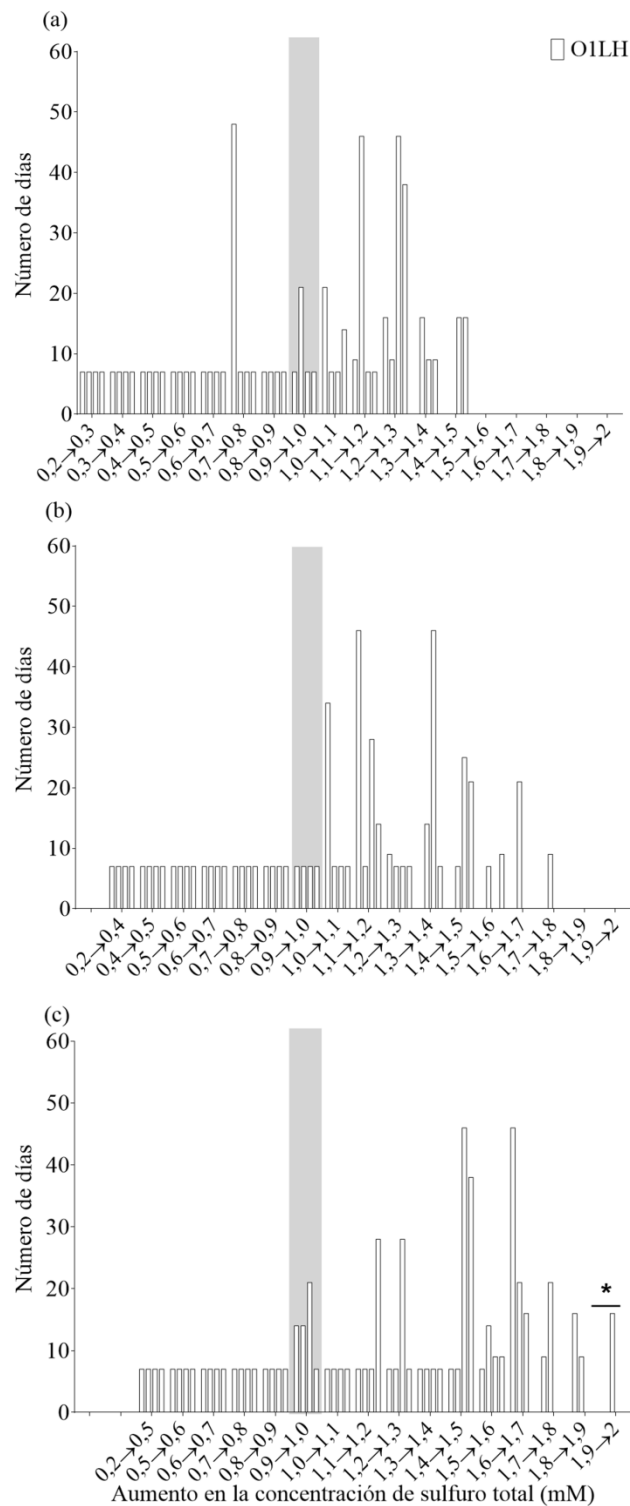
**Fig. II.15** Número de días requeridos por cada cultivo para llegar a crecer bajo dosis crecientes de sulfuro al mismo nivel que el control (sin sulfuro) durante el experimento de trinquete en las cepas de *M. aeruginosa*. El experimento comenzó con la exposición de las células, previamente cultivadas en ausencia de sulfuro, a tres niveles iniciales diferentes: (a) 10 μM, (b) 30 μM y (c) 90 μM. La sombra gris indica que la concentración probada es igual o superior a la concentración de sulfuro que, inicialmente, inhibió completamente el crecimiento de las tres cepas. Los asteriscos indican la máxima resistencia al sulfuro para cada cepa: \* límite de la cepa MaAVc, 270 μM; \*\* límite de la cepa Ma1Vc, 405 μM; y \*\*\* límite de la cepa Ma5Vc, 405 μM.

En la transición de 90 → 270  $\mu\text{M}$ , el tiempo necesario osciló entre 14 y 28 d (Fig. II.15c). Así, 11 de las 12 réplicas mostraron un crecimiento similar al control a una concentración de 405  $\mu\text{M}$ , una concentración que cuadruplica el límite de tolerancia inicial, necesiéndose entre 14 y 28 d para observar dicho crecimiento (Fig. II.15).

La cepa Ma5Vc, incapaz de crecer a concentraciones > 200  $\mu\text{M}$ , tardó entre 7 - 14 d en alcanzar la misma densidad que el control hasta que la concentración de sulfuro fue > 90  $\mu\text{M}$ , tardando entre 21 y 49 d en observarse crecimiento a 270  $\mu\text{M}$  (Fig. II.15). De las 12 réplicas, 5 consiguieron proliferar a 405  $\mu\text{M}$ , una concentración que duplica el límite inicial (Figs. II.15bc), necesitando entre 14 y 28 d. La cepa MaAVc, incapaz de crecer a concentraciones > 200  $\mu\text{M}$ , tardó 7 d (excepto una réplica, que tardó el doble) en alcanzar la misma densidad que el control hasta que la concentración fue > 90  $\mu\text{M}$  sulfuro, tardando en torno a 50 d en el caso de 270  $\mu\text{M}$  sulfuro. Se ha de tener en cuenta que, en el caso de la cepa MaAVc, las 12 réplicas fueron capaces de crecer a 270  $\mu\text{M}$  de sulfuro (Fig. II.15).

De las réplicas que consiguieron crecer a los niveles más altos de sulfuro, se eligió un cultivo al azar de cada una de las tres cepas, denominándose Ma1R, Ma5R (ambas derivadas de las cepas Ma1Vc y Ma5Vc, respectivamente, y cultivadas en el cepario a una concentración de 0,4 mM de sulfuro) y MaAR (derivada de la cepa MaAVc, que se mantuvo en el cepario a una concentración de 0,27 mM).

En el experimento de trinquete realizado con *Oscillatoria*, la concentración de sulfuro máxima a la que consiguieron sobrevivir los cultivos dependió del nivel inicial de exposición al mismo. Así, 2 de los 4 cultivos que comenzaron a una concentración de 0,3 mM de sulfuro llegaron a crecer a 1,5 mM (Fig. II.16a). En el caso de las poblaciones que comenzaron el experimento exponiéndose a 0,4 mM, solo una pudo proliferar hasta una concentración de sulfuro de 1,8 mM (Fig. II.16b). La mayor presión de selección tolerada fue detectada por un cultivo que creció a 2 mM de sulfuro y que fue sometido a una concentración inicial de 0,5 mM sulfuro (Fig. II.16c). Todos los cultivos de O1LH, cuyo crecimiento se inhibía a una concentración de sulfuro por encima de 0,9 mM, mostraron un crecimiento similar al control tras 7 d de cultivo (excepto en un caso), cuando las concentraciones fueron menores de 1 mM. No obstante, una vez superado el valor de tolerancia inicial, el número de días necesarios para alcanzar un límite de resistencia mayor fue diferente entre los distintos cultivos, oscilando entre 7 y 48 d.



**Fig. II.16** Número de días requeridos por cada cultivo para llegar a crecer bajo dosis crecientes de sulfuro al mismo nivel que el control (0,2 mM sulfuro) durante el experimento de trinquete en la cepa O1LH de *Oscillatoria*. El experimento comenzó con la exposición de las células, previamente cultivadas a 0,2 mM de sulfuro, a tres niveles iniciales de sulfuro diferentes: (a) 0,3 mM, (b) 0,4 mM y (c) 0,5 mM. La sombra gris indica que la concentración probada es igual o superior a la concentración de sulfuro que, inicialmente, inhibió totalmente el crecimiento. El asterisco indica el límite máximo de tolerancia al sulfuro alcanzado.



Los cultivos que comenzaron cultivándose a una concentración de 0,3 mM sulfuro (Fig. II.16a), tardaron entre 7 y 48 d en mostrar crecimiento similar al control a una concentración de 1,3 mM; entre 7 y 14 d a 1,4 mM, y 14 d a 1,5 mM sulfuro, la mayor concentración alcanzada por los cultivos de O1LH que comenzaron en 0,3 mM sulfuro. Por su parte, los cultivos que comenzaron cultivándose a 0,4 mM de sulfuro (Fig. II.16b) tardaron 7 d en crecer como el control a una concentración de 1 mM, superando la concentración de sulfuro que limita el crecimiento de O1LH, entre 7 y 35 d en mostrar un crecimiento similar al control a una concentración de 1,1 mM. A partir de esa concentración, el número de días necesarios hasta llegar a crecer como el control a concentraciones crecientes de sulfuro aumentó significativamente, mostrando además una alta variación entre las poblaciones estudiadas. Así, los cultivos tardaron entre 7 y 48 d a concentraciones desde 1,2 a 1,6 mM de sulfuro. Ahora bien, únicamente un cultivo consiguió crecer como el control a una concentración de 1,7 mM de sulfuro tras 21 d, tardando posteriormente 9 d en llegar a crecer como el control a 1,8 mM de sulfuro, el límite de crecimiento de los cultivos que comenzaron a 0,4 mM de sulfuro. Por último, los cultivos que comenzaron bajo una concentración de 0,5 mM (Fig. II.16c), una vez superada la máxima tolerancia inicial de 0,9 mM de sulfuro, tardaron hasta 21 d en mostrar un crecimiento similar al control a 1 mM de sulfuro.

En los siguientes ciclos del trinquete el número de días que necesitaron los cultivos para crecer como el control mostró bastante variación (entre 7 y 48 d) a concentraciones desde 1,1 a 1,7 mM de sulfuro. A 1,8 mM de sulfuro, sólo dos cultivos consiguieron sobrevivir, tardando 9 y 21 en crecer como el control. Ambos sobrevivieron a 1,9 mM de sulfuro y llegaron a crecer como el control tras 16 y 9 d. Sin embargo, en el último ciclo ensayado (de 1,9 a 2 mM), solo uno de esos cultivos, tras 16 d de exposición a esta concentración, mostró un crecimiento similar al control.

El único cultivo de la cepa O1LH capaz de crecer a 2 mM sulfuro, es decir, el que mostró la máxima tolerancia, se aisló para su caracterización posterior, denominándose O1R. Esta cepa se mantuvo en el cepario a una concentración de 1 mM sulfuro, evitando así los problemas de precipitación de azufre y mantenimiento del pH (ver apartado II.2.5.1.2.).

No hubo diferencias en la concentración máxima de sulfuro que pudo tolerar *M. aeruginosa*, independientemente de las concentraciones iniciales analizadas para las cepas Ma1Vc y MaAVc (10, 30 o 90  $\mu$ M; Fig. II.15); sin embargo, la cepa Ma5Vc

mostró un límite menor de tolerancia (270  $\mu\text{M}$ ) cuando fue menor la concentración inicial de sulfuro (10  $\mu\text{M}$ ; Fig. II.15a). En el caso de *Oscillatoria*, sí hubo diferencias en función de la concentración de sulfuro de partida, ya que la concentración más elevada que toleró (2 mM) fue alcanzada por aquellos cultivos expuestos a las concentraciones iniciales más altas de sulfuro (0,5 mM; Fig. II.16c).

#### II.3.3.2.1. Mecanismo de tolerancia: aclimatación vs. adaptación

Para comprobar si la tolerancia a los niveles más altos de sulfuro en el experimento de trinquete se debió a la selección de nuevas variantes genéticas originadas por mutaciones o a la aclimatación de las células tras la exposición al agente selectivo, se cultivaron las cepas resistentes en las condiciones control definidas para las cepas silvestres ( $m_1$ ; ausencia de sulfuro para las cepas Ma1R, Ma5R y MaAR de *M. aeruginosa*, y 0,2 mM para la cepa O1R), y posteriormente bajo la concentración máxima de sulfuro tolerada ( $m_2$ ; 0,4 mM para las cepas Ma1R y Ma5R; 0,27 mM para MaAR; y 2 mM para O1R). Si  $m_1 \sim m_2$ , se infiere que la resistencia fue fruto de la selección de mutaciones espontáneas, mientras que la aclimatación sería el mecanismo de adquisición de tolerancia subyacente si  $m_1 > m_2$ .

**Tabla II.4.** Tasa de crecimiento de las cepas resistentes a sulfuro de *M. aeruginosa* (cepas Ma1R, Ma5R y MaAR) y *Oscillatoria* (O1R) a la concentración control de sulfuro ( $m_1$ ) y bajo la concentración de sulfuro más alta tolerada ( $m_2$ ). Los datos se expresan como la media  $\pm \sigma$  ( $n = 5$ ). El asterisco indica diferencias significativas (test *t*-Student,  $P < 0,001$ ).

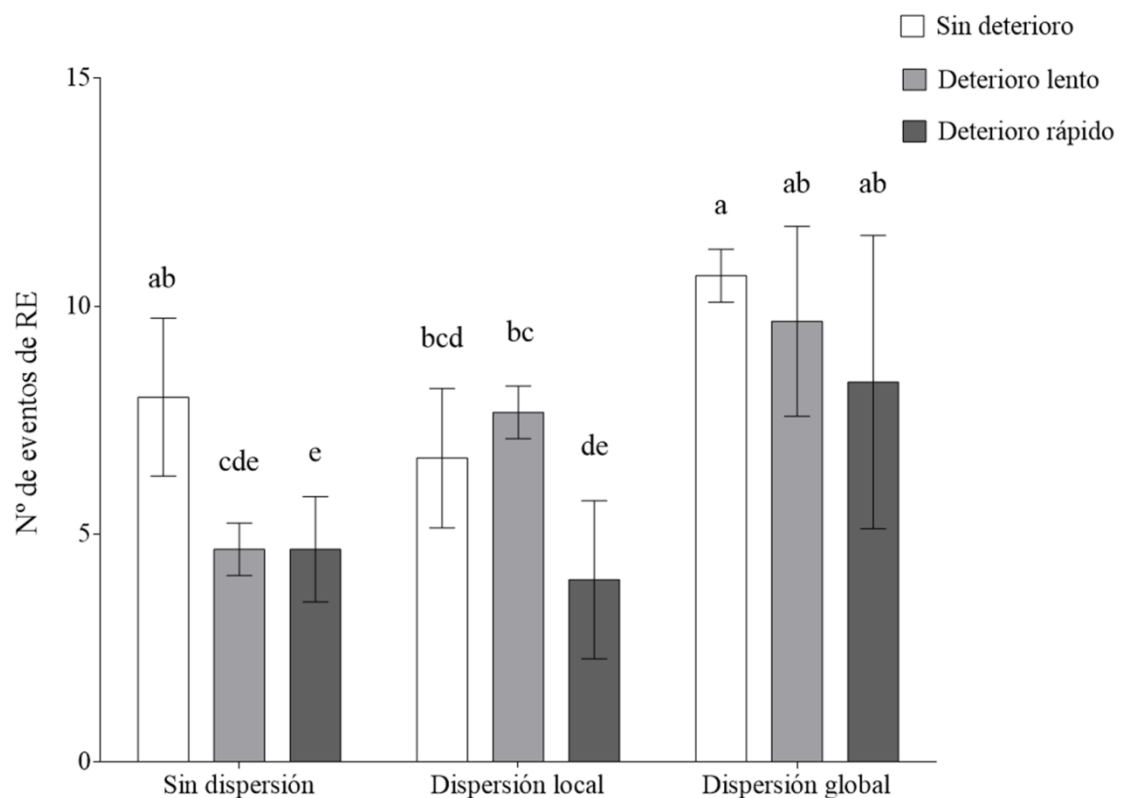
	$m_1$ ( $\text{d}^{-1}$ )	$m_2$ ( $\text{d}^{-1}$ )	Mecanismo de tolerancia
Ma1R	$0,6 \pm 0,04$	$0,6 \pm 0,01$	adaptación
Ma5R	$0,5 \pm 0,03$	$0,5 \pm 0,02$	adaptación
MaAR	$0,5 \pm 0,03$	$0 \pm 0,09^*$	aclimatación
O1R	$0,3 \pm 0,02$	$0,1 \pm 0,07^*$	aclimatación

Las cepas Ma1R y Ma5R se adaptaron a la concentración de 0,4 mM de sulfuro, ya que no hubo diferencias significativas entre  $m_1$  y  $m_2$  ( $P > 0,05$ ; test *t*-Student; Tabla II.4).

Sin embargo, la proliferación de las cepas MaAR y O1R a la concentración más alta de sulfuro se debió a un proceso de aclimatación (Tabla II.4).

### II.3.3.3. Rescate evolutivo bajo selección por sulfuro en *M. aeruginosa*: efectos de la dispersión y de la tasa de deterioro ambiental

Tras someter a la cepa Ma1Vc a un experimento de rescate evolutivo (RE) usando sulfuro como agente selectivo, exponiendo a las poblaciones a diferentes velocidades de deterioro del medio (sin deterioro, lento y rápido) y distintos niveles de dispersión entre poblaciones (sin dispersión, local y global), se observaron eventos de RE bajo todas las combinaciones de ambos tratamientos, variando entre 2 y 12 eventos (Fig. II.17).



**Fig. II.17** Efecto del deterioro ambiental y del modo de dispersión en el número de eventos de rescate evolutivo (RE) observados en poblaciones de la cepa Ma1Vc de *M. aeruginosa* sometidas a concentraciones letales de sulfuro (máximo 12 eventos de RE). Los datos corresponden a la media  $\pm \sigma$  ( $n = 3$ ). Las diferentes letras indican diferencias significativas detectadas por la prueba post-hoc de Student-Newman-Keuls (SNK,  $P < 0,05$ ).

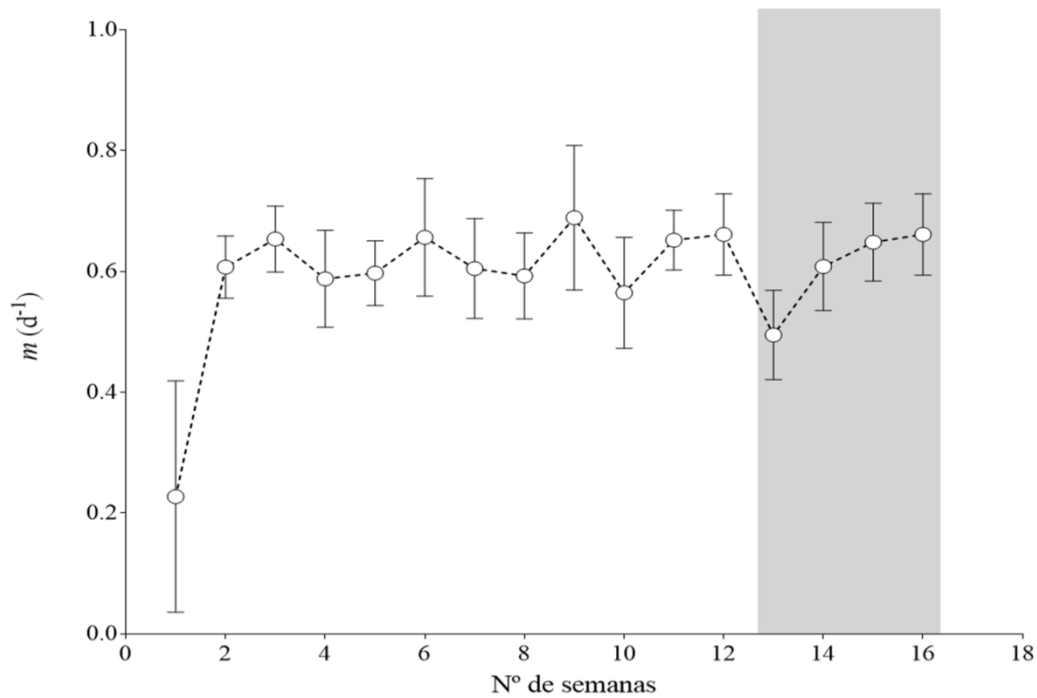
Si bien tanto la tasa de deterioro ambiental como el modo de dispersión afectaron significativamente la dinámica de RE de la cepa Ma1Vc en condiciones selectivas de sulfuro, la interacción de ambos factores no tuvo efecto (Tabla II.5).

**Tabla II.5.** ANOVA de dos vías para la comparación de los eventos de RE de la cepa Ma1Vc de *M. aeruginosa* en condiciones letales de sulfuro. Los modos de dispersión de la población y las tasas de deterioro ambiental se indican en la Fig. II.7.

Fuente de variación	gl	SC	MC	F	P - valor
Dispersión	2	86,518	43,259	16,69	$7,65 \times 10^{-5}$
Deterioro	2	50,074	25,037	9,65	0,001
Dispersión $\times$ deterioro	4	14,592	3,648	1,40	0,27
Error	18	46,666	2,592		

De acuerdo con los valores de probabilidad, la contribución del modo de dispersión a la varianza del número de eventos de RE fue mayor que la contribución del deterioro ambiental (Tabla II.5) y, por esta razón, se representó el número de eventos de RE en función del modo de dispersión (Fig. II.17). La ocurrencia de eventos de RE, cuando las poblaciones se propagaron bajo dispersión global (e independientemente de la tasa de deterioro), fue significativamente mayor ( $P < 0,05$ ; test SNK) que bajo la dispersión local o sin dispersión, con la excepción de la situación sin deterioro. Por otro lado, la tasa rápida de deterioro obstaculizó de manera general la consecución de eventos de RE ( $P < 0,05$ ; test SNK), sobre todo bajo dispersión local y sin dispersión (Fig. II.17). En las poblaciones propagadas sin dispersión (es decir, con baja diversidad genética), el número de eventos de RE alcanzado fue significativamente mayor ( $P < 0,05$ ; test SNK) cuando no se produjo deterioro ambiental (Fig. II.17). Bajo dispersión local (cuando la diversidad genética se debe a la mezcla de las poblaciones sometidas a la misma concentración de sulfuro), la velocidad del deterioro ambiental determinó el número de eventos de RE, siendo significativamente mayor (test SNK,  $P < 0,05$ ) bajo deterioro lento que rápido (Fig. II.17). Sin embargo, no se observaron diferencias entre el deterioro lento

y sin deterioro (Fig. II.17). Solo en la dispersión global no se detectaron diferencias entre los tratamientos en función de la velocidad de deterioro ambiental (Fig. II.17).



**Fig. II.18** Evolución de la tasa de crecimiento ( $m$ ) en las poblaciones de *M. aeruginosa* durante el experimento de rescate evolutivo, sin dispersión en un escenario sin deterioro del medio. La zona sombreada en gris corresponde al momento en el que se impusieron condiciones letales, y en las que se pueden observar los eventos de RE. Los datos representados corresponden al valor medio  $\pm \sigma$  ( $n = 36$ , calculado con 3 repeticiones del experimento, 4 concentraciones de sulfuro y 3 poblaciones por concentración de sulfuro, en cada una de ellos).

El valor de  $m$  durante el experimento de RE mostró variaciones a lo largo del tiempo, siendo diferente en función de la concentración de sulfuro y el momento de incubación considerado. En la Fig. II.18 se muestra la evolución de  $m$  en las poblaciones sin dispersión en un escenario sin deterioro del medio hasta la semana 12, momento en el que se impusieron condiciones selectivas (señaladas en gris). Durante la primera semana, las poblaciones de la cepa Ma1Vc en un escenario sin deterioro del medio, sin dispersión entre poblaciones, y a una concentración de 0, 30, 60 y 90  $\mu\text{M}$  de sulfuro (un total de 12 poblaciones, esto es, 3 poblaciones por cada concentración), mostraron un valor de  $m$  medio de  $0,2 \pm 0,2 \text{ d}^{-1}$  (Fig. II.18), significativamente menor ( $P < 0,001$ ; test  $t$ -Student) que el valor mostrado en ausencia de sulfuro ( $0,7 \pm 0,01 \text{ d}^{-1}$ ; Fig. II.13). Tras la semana 2,

el valor de  $m$  se estabilizó, mostrando valores similares a los observados en ausencia de sulfuro. A partir de la semana 13 las células se sometieron a diferentes concentraciones de sulfuro (150, 180, 210 y 240  $\mu\text{M}$ ), todas ellas por encima de la máxima concentración tolerada por esta cepa (100  $\mu\text{M}$ ). En ese momento, se observó una disminución acusada del valor de  $m$  y la concentración celular de los cultivos, que alcanzaron un tamaño poblacional bajo, de  $\sim 10^5$  céls  $\text{mL}^{-1}$ . Sin embargo, tanto el valor de  $m$  como la concentración celular fue aumentando paulatinamente hasta la semana 16, alcanzando un valor similar al encontrado entre las semanas 2 – 12, observándose, así, rescate evolutivo.

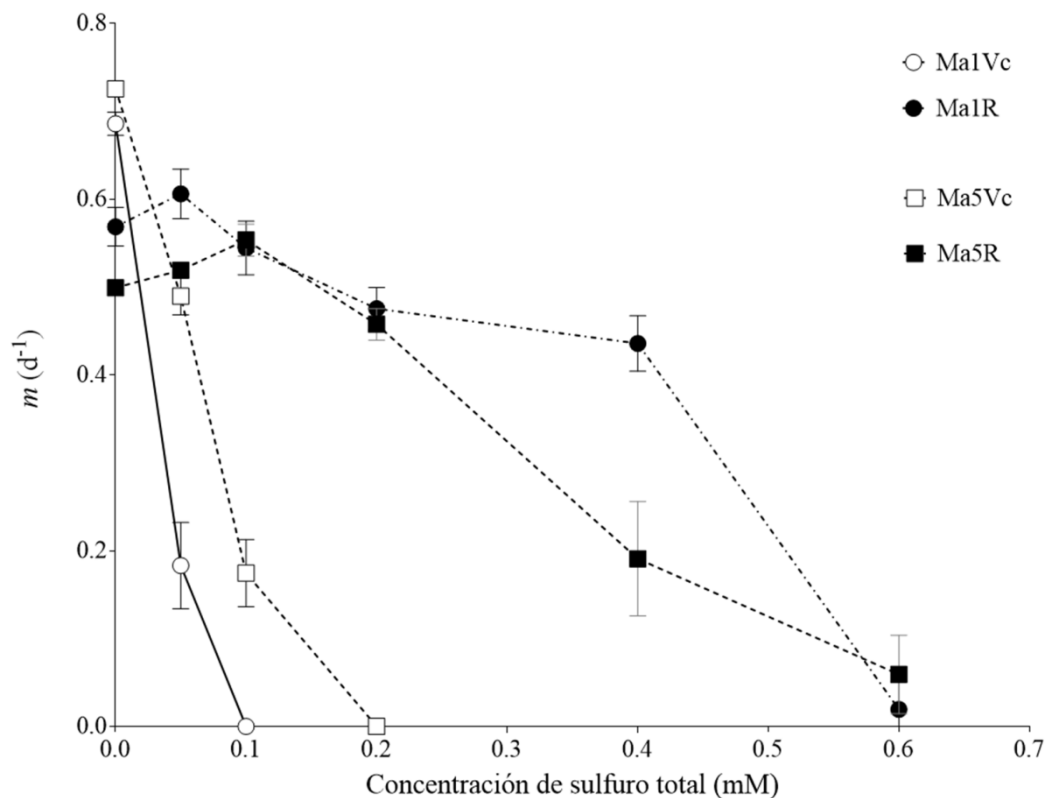
II.3.4. Coste de la tolerancia al sulfuro en las cepas resistentes en términos de crecimiento, fotosintéticos y morfológicos

#### II.3.4.1. Tasa de crecimiento de las cepas resistentes en ausencia y presencia de sulfuro

En este apartado sólo se analizaron las cepas resistentes cuya tolerancia fue fruto de un proceso de adaptación, es decir, las cepas Ma1R y MA5R, comparándolas con sus cepas ancestrales.

En ausencia de sulfuro, la tasa de crecimiento de la cepa silvestre Ma1Vc ( $0,68 \pm 0,01 \text{ d}^{-1}$ ) fue significativamente mayor que la de cepa resistente Ma1R ( $0,57 \pm 0,02 \text{ d}^{-1}$ ;  $P < 0,001$ ; test  $t$ -Student), así como en el caso de la cepa Ma5Vc ( $0,72 \pm 0,006 \text{ d}^{-1}$ ), con respecto a Ma5R ( $0,50 \pm 0,01 \text{ d}^{-1}$ ;  $P < 0,001$ ; test  $t$ -Student). Sin embargo, a medida que aumentó la concentración de sulfuro, los valores de  $m$  de las cepas silvestres Ma1Vc y Ma5Vc disminuyeron drásticamente, tal y como se mostró anteriormente (Fig. II.13), mientras que el crecimiento de las cepas resistentes Ma1R y Ma5R aumentó ligeramente en presencia de bajas concentraciones de sulfuro (Fig. II.19). A partir de 0,1 mM sulfuro, el crecimiento de las resistentes fue notablemente mayor que el de las silvestres. Las cepas resistentes mostraron valores de crecimiento similares a 0,2 mM sulfuro; sin embargo, la cepa Ma5R mostró un crecimiento mucho menor que la cepa Ma1R a 0,4 mM sulfuro. Ambas cepas resistentes sufrieron una disminución abrupta del valor de  $m$  a la concentración de 0,6 mM sulfuro, y no fueron capaces de crecer a la siguiente concentración ensayada (0,8 mM sulfuro; Fig. II.19).

El hecho de que la cepa resistente Ma1R (i) mostrara el mayor aumento en su máxima tolerancia al sulfuro como agente selectivo ( $< 0,1$  mM en la cepa ancestral a  $0,6$  mM; Fig. II.19), (ii) que manifestara la mayor tolerancia a  $0,4$  mM de sulfuro de las dos cepas resistentes (Fig. II.19), y (iii) que dos de los tres experimentos de evolución (análisis de fluctuación y rescate evolutivo) se realizaran con la cepa Ma1Vc, determinó la decisión de usarla como modelo de cepa resistente al sulfuro de *M. aeruginosa* para su caracterización fotosintética y morfológica posterior.

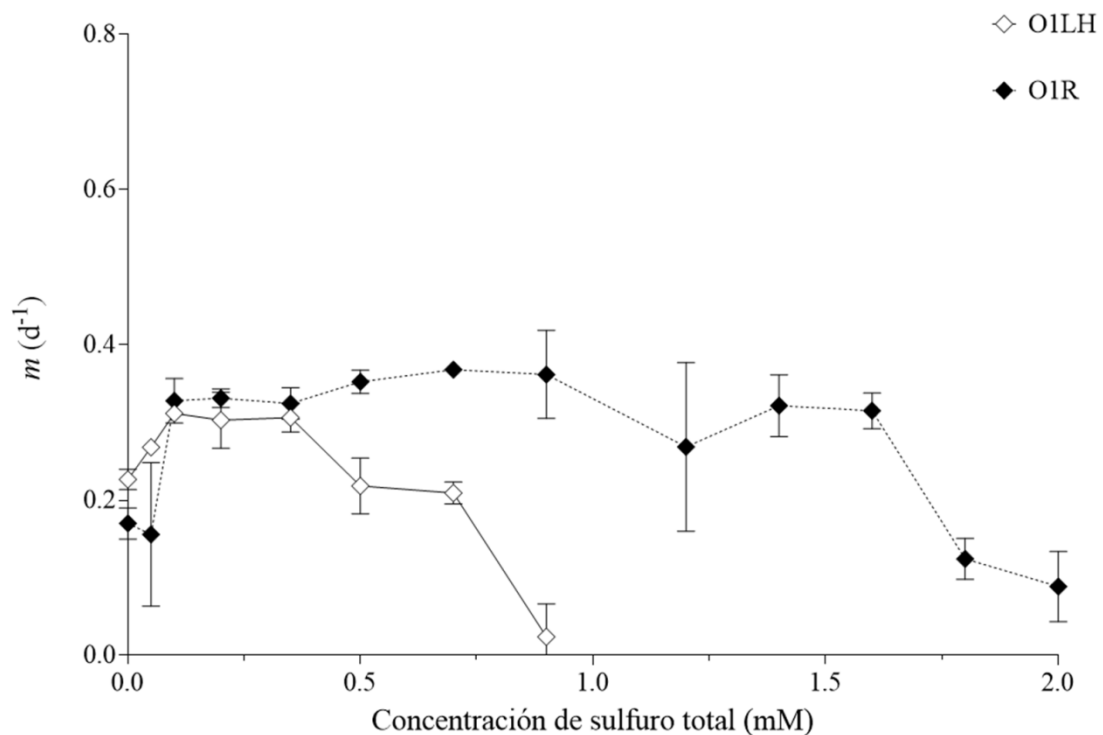


**Fig. II.19** Efecto del sulfuro sobre la tasa de crecimiento ( $m$ ) de las cepas silvestres (Ma1Vc, Ma5Vc) y resistentes a sulfuro (Ma1R, Ma5R) de *M. aeruginosa*. Los datos de las cepas silvestres son los mismos que se han presentado en la Fig. II.13, y se incluyen aquí para su comparación con los de las cepas resistentes. Los datos corresponden a la media  $\pm \sigma$  ( $n = 5$ ).

La cepa resistente de *Oscillatoria* (O1R) presentó una tolerancia al sulfuro bastante más elevada comparada con la de las cepas resistentes de *M. aeruginosa* (Ma1R y Ma5R), como era de esperar (Fig. II.20). Este resultado se había observado anteriormente para las cepas silvestres de ambas especies (Figs. II.13 y II.14).

En ausencia de sulfuro, se observó un valor de  $m$  ligeramente superior ( $P < 0,05$ ; test  $t$ -Student) en la cepa silvestre O1LH que en la resistente O1R ( $0,22 \pm 0,01$  y  $0,17 \pm 0,02$

$d^{-1}$ , respectivamente). Ahora bien, la tasa de crecimiento de ambas cepas O1LH y O1R fue significativamente mayor ( $P < 0,01$ ; test  $t$ -Student) con sulfuro en el medio: la mayor tasa de crecimiento de O1LH se observó en el rango 0,1 - 0,4 mM, como se indicó anteriormente, mientras que O1R mostró un crecimiento máximo en un rango más amplio de sulfuro, de 0,1 a 1,6 mM, concentración a partir de la cual el valor de  $m$  disminuyó progresivamente (Fig. II.20). Aunque O1LH se había considerado ya como cepa resistente al sulfuro, O1R presentó una tolerancia aún mayor. Mientras que la primera no mostró apenas crecimiento a 0,9 mM, la segunda presentó cierta capacidad de crecer a 2 mM, es decir, al doble de la máxima tolerancia de la cepa silvestre. Sin embargo, no se pudo evaluar el crecimiento a concentraciones más altas debido a la precipitación de  $S^0$  y a los cambios de pH inducidos por concentraciones más elevadas de sulfuro, tal y como se indicó en el apartado II.2.5.1.2.



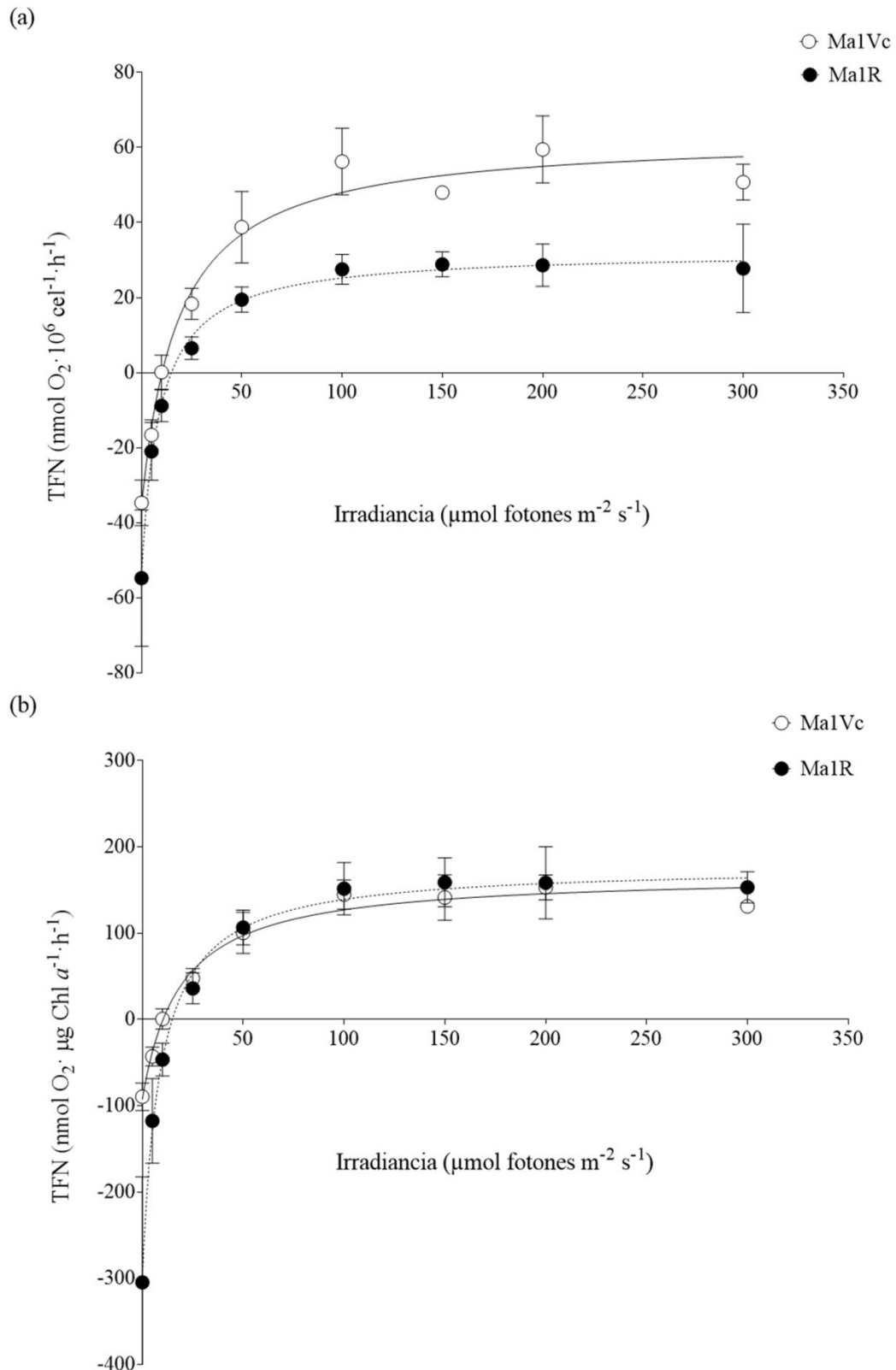
**Fig. II.20** Efecto del sulfuro sobre la tasa de crecimiento ( $m$ ) de las cepas silvestre (O1LH) y resistente (O1R) de *Oscillatoria*. Los valores para la cepa silvestre son los mismos que se han presentado en la Fig. II.14, y se incluyen aquí para su comparación con los de la cepa resistente. Los datos indican la media  $\pm \sigma$  ( $n = 4$ ).



### II.3.4.2. Tasa de fotosíntesis en ausencia de sulfuro

Al comparar los valores obtenidos de tasas de fotosíntesis neta (TFN) medidas en ausencia de sulfuro, se observaron diferencias entre las cepas silvestres y resistentes de *M. aeruginosa* y *Oscillatoria*. Los valores de TFN de *M. aeruginosa* se expresaron en  $\text{nmol O}_2 10^6 \text{ c\acute{e}l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Fig. II.21a), y las de *Oscillatoria* en  $\text{nmol O}_2 \mu\text{g Chl } a^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Fig. II.22). No obstante, con el objetivo de comparar las curvas TFN-I entre ambas especies, los valores de *M. aeruginosa* se expresaron también en  $\text{nmol O}_2 \mu\text{g Chl } a^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Fig. II.21b). En todos los casos, los datos obtenidos se ajustaron al modelo de Edwards y Walker (1983) para la obtención de los diferentes parámetros fotosintéticos (Tablas II.6 y II.7).

El valor de  $\text{TFN}_{\text{max}}$  de la cepa silvestre de *M. aeruginosa* fue aproximadamente el doble del obtenido en la cepa resistente (Fig. 21a; Tabla II.6). Además, las tasas de respiración (TR) fueron significativamente diferentes ( $P < 0,001$ ; test *t*-Student) entre las cepas silvestre y resistente de *M. aeruginosa*, siendo aproximadamente un 35% mayor en la cepa resistente ( $35 \pm 6$  y  $55 \pm 18 \text{ nmol O}_2 10^6 \text{ c\acute{e}l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  para las cepas Ma1Vc y Ma1R, respectivamente). Sin embargo, cuando la TFN se expresó en  $\text{nmol O}_2 \mu\text{g Chl } a^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Fig. II.21b), no se encontraron diferencias ( $P > 0,05$ ; test *t*-Student) entre las  $\text{TFN}_{\text{max}}$  de las cepas de *M. aeruginosa*: los valores obtenidos para las cepas silvestre Ma1Vc y resistente Ma1R fueron  $168 \pm 10$  y  $178 \pm 6 \text{ nmol O}_2 \mu\text{g Chl } a^{-1} \text{ h}^{-1}$ , respectivamente. Hay que tener en cuenta que el contenido de Chl *a* de la cepa resistente es aproximadamente la mitad que el de la cepa silvestre (ver apartado II.3.4.3.), lo que determinó que las curvas TFN-I resultaran semejantes entre cepas cuando la TFN se refirió a la cantidad de Chl *a*.



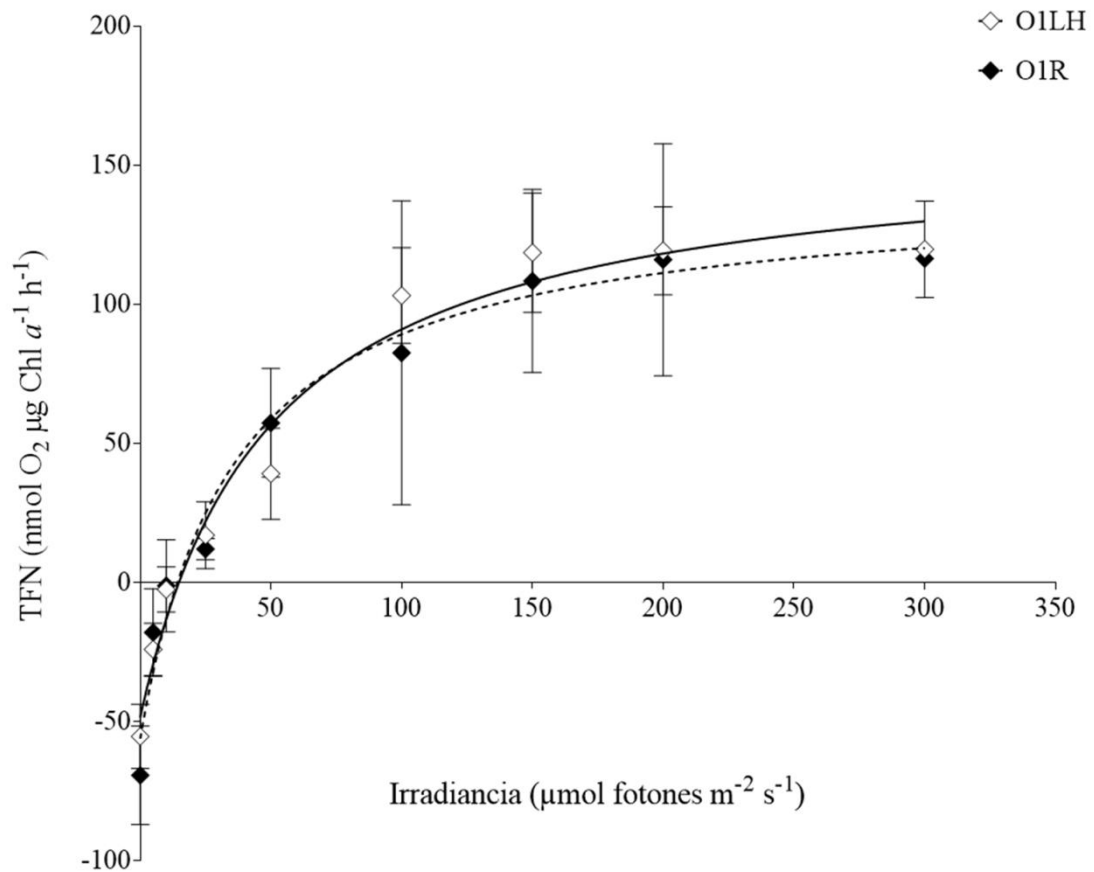
**Fig. II.21** Tasa de fotosíntesis neta (TFN) en función de la irradiancia en la cepa silvestre Ma1Vc y la cepa resistente Ma1R de *M. aeruginosa* expresada en (a) nmol O<sub>2</sub> 10<sup>6</sup> céls<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>; y en (b) nmol O<sub>2</sub> μg Chl a<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Los datos representan la media ± σ (*n* = 6). Las líneas indican el ajuste a la ecuación de Edwards y Walker (1983).

El punto de compensación para la irradiancia ( $I_c$ ) fue ligeramente más elevado en el caso de la cepa Ma1R, pero no se observaron diferencias significativas en la eficiencia fotosintética ( $\alpha^{\text{TFN}}$ ), que se estimó como la pendiente obtenida del ajuste lineal de los cuatro primeros puntos de la curva (Tabla II.6).

**Tabla II.6.** Parámetros fotosintéticos derivados del ajuste de las curvas TFN- $I$  de las cepas silvestre y resistente de *M. aeruginosa* al modelo de Edwards y Walker (1983) y valores de la  $\alpha^{\text{TFN}}$ , calculada como la pendiente que se obtuvo al ajustar los cuatro primeros datos a una recta. Los asteriscos indican diferencias significativas (test  $t$ -Student, \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,001$ ).

	Ma1Vc	Ma1R
TFN <sub>max</sub> (nmol O <sub>2</sub> 10 <sup>6</sup> céls <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	63 ± 4	32 ± 1 **
$I_c$ (μmol fotones m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	10 ± 1	15 ± 1*
$\alpha^{\text{TFN}}$	2,01 ± 0,10	2,1 ± 0,6
$R^2$	0,96 - 0,99	0,95 - 0,99

La relación TFN- $I$  en *Oscillatoria* no difirió entre cepas silvestre y resistente (Fig. II.22). Tras ajustar todos los datos a la ecuación de Edwards y Walker (1983) se observó que no hubo diferencias significativas entre las TFN<sub>max</sub> ni en el resto de parámetros fotosintéticos (Tabla II.7) entre la cepa silvestre O1LH y la resistente O1R. Se ha de tener en cuenta que los datos presentaron una gran desviación, en comparación con los resultados de *M. aeruginosa* (Fig. II.21).



**Fig. II.22** Tasa de fotosíntesis neta (TFN) en función de la irradiancia en la cepa silvestre O1LH y la cepa resistente O1R de *Oscillatoria*, expresada en  $\text{nmol O}_2 \mu\text{g Chl a}^{-1} \text{h}^{-1}$ . Los datos representan la media  $\pm \sigma$  ( $n = 6$ ). Las líneas indican el ajuste de los datos a la ecuación de Edwards y Walker (1983).

Además, tampoco se observaron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ; test *t*-Student) en las TR entre las cepas, siendo  $51 \pm 4$  para la cepa O1LH y  $69 \pm 12$   $\text{nmol O}_2 \text{Chl a}^{-1} \text{h}^{-1}$  para la cepa O1R.

**Tabla II.7.** Parámetros fotosintéticos derivados del ajuste al modelo de Edwards y Walker (1983) de las curvas TFN-*I* de las cepas silvestre y resistente de *Oscillatoria*, así como los valores de la  $\alpha^{\text{TFN}}$ , medida como la pendiente que se obtuvo al ajustar los cuatro primeros datos a una recta. No se detectaron diferencias significativas entre cepas en ninguno de los parámetros ( $P > 0,05$ ; test *t*-Student).

	O1LH	O1R
TFN <sub>max</sub> (nmol O <sub>2</sub> μg Chl <i>a</i> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	160 ± 25	143 ± 36
<i>I</i> <sub>c</sub> (μmol fotones m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	15 ± 4	14 ± 5
$\alpha^{\text{TFN}}$	2,7 ± 0,6	3,7 ± 1
<i>R</i> <sup>2</sup>	0,98 – 0,94	0,95 – 0,80

#### II.3.4.3. Contenido de pigmentos fotosintéticos

El contenido de pigmentos liposolubles (Chl *a* y CT) e hidrosolubles (FC y FE) fue significativamente diferente en las cepas silvestres y resistentes a sulfuro en las dos especies estudiadas (Tabla II.8). Así, en las cepas de *M. aeruginosa*, el contenido de Chl *a* y de CT fue el doble en la cepa silvestre Ma1Vc que en la resistente Ma1R, mientras que el contenido de FE fue casi un orden de magnitud mayor en Ma1R que en la cepa Ma1Vc (Tabla II.8). No hubo diferencias significativas entre el contenido de FC de ambas cepas (Tabla II.8). Las diferencias en el contenido de pigmentos encontradas entre las cepas Ma5Vc y Ma5R siguieron la misma tendencia que la mostrada por las cepas Ma1Vc y Ma1R (datos no mostrados).

Con respecto a *Oscillatoria*, hubo diferencias significativas en el contenido de Chl *a*, CT y FC, que fue mayor en la cepa silvestre O1LH que en la resistente O1R (aunque la diferencia en el contenido de Chl *a* entre cepas fue relativamente baja). Sin embargo, no hubo diferencias significativas en el contenido de FE (Tabla II.8).

**Tabla II.8.** Contenido de pigmentos fotosintéticos en las cepas silvestres y resistentes de *M. aeruginosa* (Ma1Vc y Ma1R) y *Oscillatoria* sp. (O1LH y O1R). Los asteriscos indican diferencias significativas (test *t*-Student, \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,001$ ).

	Ma1Vc	Ma1R	O1LH	O1R
	$(\mu\text{g } 10^6 \text{ células}^{-1})$		$(\mu\text{g mg } PF^{-1})$	
[Chl <i>a</i> ]	0,39±0,03	0,19±0,02**	0,17±0,02	0,15±0,01*
[CT]	0,13±0,01	0,06±0,01**	0,10±0,02	0,05±0,02**
[FC]	0,12±0,02	0,10±0,02	0,07±0,03	0,01±0,005*
[FE]	0,01±0,001	0,09±0,01**	0,07±0,06	0,07±0,07

Sin embargo, al expresar el contenido de pigmentos en función del volumen celular (ver apartado II.3.4.4.), no se encontraron diferencias en el contenido de pigmentos liposolubles entre las cepas Ma1Vc y Ma1R (Tabla II.9). No obstante, la cepa resistente Ma1R siguió presentando un mayor contenido de pigmentos hidrosolubles tanto por célula como por volumen (Tabla II.9).

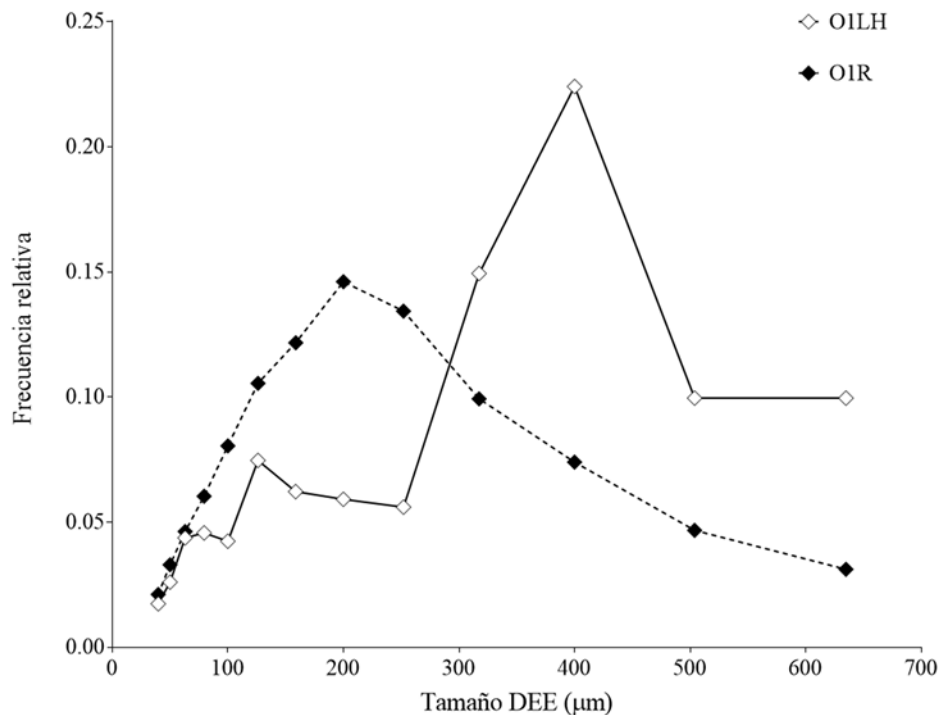
**Tabla II.9.** Contenido de pigmentos fotosintéticos de las cepas *M. aeruginosa* silvestre (Ma1Vc) y resistente al sulfuro (Ma1R) por célula ( $\text{fg cel}^{-1}$ ) y por unidad de volumen ( $\text{fg } \mu\text{m}^{-3}$ ). Un asterisco indica diferencias significativas (test *t*-Student, \* $P < 0,005$ ).

	Ma1Vc	Ma1R
[Chl <i>a</i> ] ( $\text{fg cel}^{-1}$ )	387 ± 26	190 ± 20*
[CT] ( $\text{fg cel}^{-1}$ )	129 ± 9	56 ± 10*
[FC] ( $\text{fg cel}^{-1}$ )	116 ± 21	98 ± 16
[FE] ( $\text{fg cel}^{-1}$ )	9 ± 0	92 ± 12*
[Chl <i>a</i> ] ( $\text{fg } \mu\text{m}^{-3}$ )	6 ± 0	7 ± 1
[CT] ( $\text{fg } \mu\text{m}^{-3}$ )	2 ± 0	2 ± 0
[FC] ( $\text{fg } \mu\text{m}^{-3}$ )	2 ± 0	4 ± 1*
[FE] ( $\text{fg } \mu\text{m}^{-3}$ )	0,2 ± 0	3 ± 0*

II.3.4.4. Volumen celular de *M. aeruginosa* y distribución de tamaños de agregados celulares en *Oscillatoria*

El volumen de las células de la cepa resistente al sulfuro de *M. aeruginosa* Ma1R ( $27,2 \pm 10,3 \mu\text{m}^3$ ,  $n = 200$ ) fue aproximadamente la mitad ( $P < 0,001$ ; test *t*-Student) del observado en la cepa Ma1Vc ancestral ( $60,1 \pm 17,8 \mu\text{m}^3$ ;  $n = 200$ ).

La naturaleza filamentosa de las cepas O1LH y O1R de *Oscillatoria* no permitió la cuantificación del biovolumen como tamaño celular. En su lugar, se midió la distribución de tamaños de los agregados que forman los filamentos (Fig. II.23). La moda del biovolumen total de la cepa O1R fue 200  $\mu\text{m}$  DEE (diámetro esférico equivalente), mientras que en la cepa O1LH, los agregados presentaron una moda de 400  $\mu\text{m}$  DEE, es decir, del doble de tamaño.



**Fig. II.23** Frecuencia relativa del número de agregados de filamentos en las cepas de *Oscillatoria* en función del tamaño, estimado por el diámetro esférico equivalente (DEE,  $\mu\text{m}$ ).

## II.3.4.5. Contenido en C, en N, y relación C:N

Puesto que se observaron diferencias en el contenido de ficobiliproteínas entre las cepas silvestres y resistentes de ambas especies, y dado que estos pigmentos representan un porcentaje alto del contenido celular de N, se determinó el contenido de N (y también de C) de todas las cepas. Mientras que no se observaron diferencias significativas en el contenido en C entre ambas cepas de *M. aeruginosa*, el contenido en N de la cepa resistente a sulfuro fue significativamente mayor que el de la silvestre, dando lugar a un valor de la relación C:N significativamente menor en el caso de la cepa resistente a sulfuro (Tabla II.10). En el caso de *Oscillatoria*, la cepa O1R mostró un contenido de C y N menor que la cepa silvestre, pero la relación C:N fue similar en ambas cepas.

**Tabla II.10.** Contenido en C, N e índice C:N en cepas silvestres y resistentes al sulfuro de *M. aeruginosa* (Ma1Vc y Ma1R) y *Oscillatoria* (O1LH y O1R). Los datos muestran la media  $\pm \sigma$  (n = 5). Los asteriscos indican diferencias significativas (test *t*-Student, \* $P < 0,01$ ; \*\*  $P < 0,001$ ).

	Ma1Vc	Ma1R	O1LH	O1R
% C	41,98 $\pm$ 0,28	42,24 $\pm$ 1,13	38,97 $\pm$ 1,49	25,81 $\pm$ 13,24**
% N	6,95 $\pm$ 0,03	7,95 $\pm$ 0,32**	8,61 $\pm$ 0,38	5,46 $\pm$ 2,84*
C:N	7,05 $\pm$ 0,05	6,21 $\pm$ 0,38*	5,30 $\pm$ 0,43	5,53 $\pm$ 0,19

## II.3.5. Caracterización fotosintética de las cepas silvestres y resistentes en presencia de sulfuro

## II.3.5.1. Rendimiento cuántico máximo del PSII

Los valores del rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ ) obtenidos en las cepas de *M. aeruginosa*, en ausencia de sulfuro, fueron mayores a los observados en las cepas de *Oscillatoria*: en las cepas Ma1Vc y Ma1R, los valores estuvieron en torno a 0,6, mientras que los de las cepas O1LH y O1R fueron próximos a 0,2 (Tabla II.11).

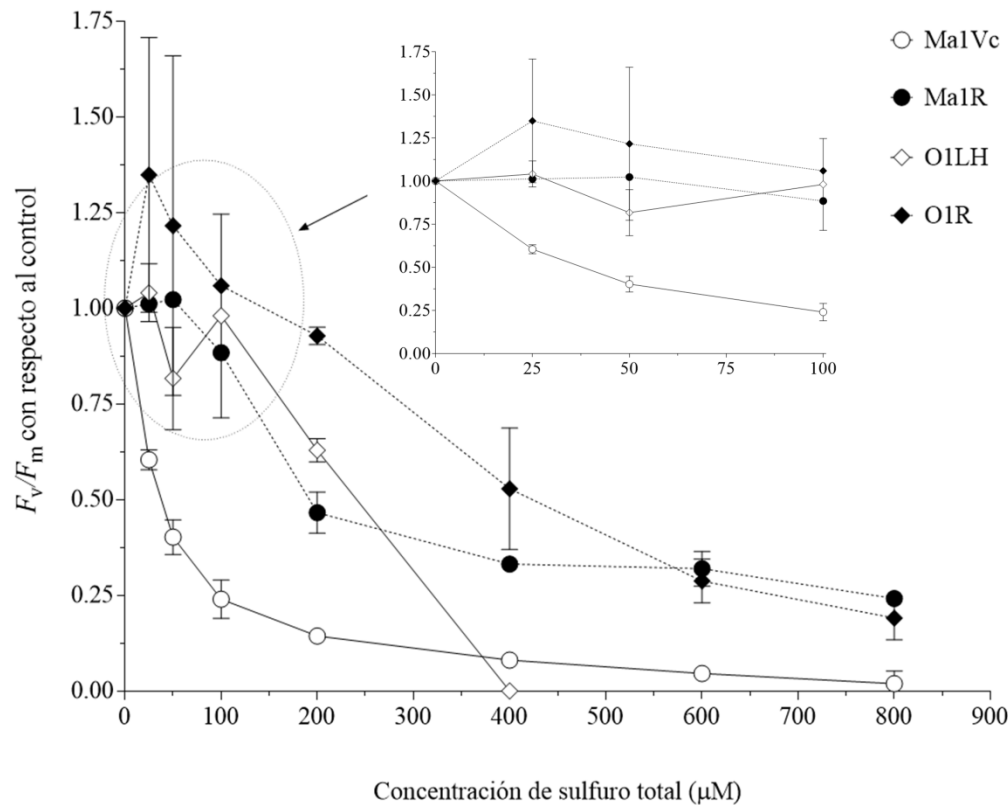


Los valores de  $F_v/F_m$  para la cepa Ma1Vc disminuyeron casi a la mitad a 25  $\mu\text{M}$ , un 60% a 50  $\mu\text{M}$  y un 75% a 100  $\mu\text{M}$  sulfuro (Tabla II.11; Fig. II.24). Sin embargo, las células de la cepa Ma1R presentaron valores de  $F_v/F_m$  prácticamente constantes a 0, 25 y 50  $\mu\text{M}$  sulfuro, disminuyendo ligeramente a 100  $\mu\text{M}$  y aproximadamente un 50% a 200  $\mu\text{M}$ ; los valores se mantuvieron bastante constantes hasta 800  $\mu\text{M}$  sulfuro, en torno a un 25% con respecto a control (Tabla II.11; Fig. II.24). Por otro lado, con respecto a *Oscillatoria* (Tabla II.11; Fig. II.24), no hubo diferencias entre las cepas sensible y resistente hasta 200  $\mu\text{M}$  sulfuro, concentración a partir de la cual el rendimiento cuántico máximo de O1LH fue indetectable. Sin embargo, los valores de la cepa O1R fueron disminuyendo progresivamente a partir de esa concentración, siempre presentando valores más altos que O1LH. Hay que tener en cuenta que los valores de  $F_v/F_m$  de *Oscillatoria*, de partida, fueron muy bajos, con lo cual llegaron a ser indetectables a 400  $\mu\text{M}$ .

**Tabla II.11.** Rendimiento cuántico máximo ( $F_v/F_m$ ) de las cepas silvestres y resistentes a sulfuro Ma1Vc y Ma1R de *M. aeruginosa*, y O1LH y O1R de *Oscillatoria*. Los datos representan la media  $\pm \sigma$  ( $n = 3$ ). Los asteriscos indican diferencias significativas (test *t*-Student, \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ).

Concentración de sulfuro ( $\mu\text{M}$ )	Ma1Vc	Ma1R	O1LH	O1R
	0	0,64 $\pm$ 0,02	0,58 $\pm$ 0,05	0,26 $\pm$ 0,03
25	0,39 $\pm$ 0,03	0,59 $\pm$ 0,05**	0,26 $\pm$ 0,05	0,23 $\pm$ 0,09
50	0,26 $\pm$ 0,02	0,59 $\pm$ 0,05***	0,21 $\pm$ 0,04	0,21 $\pm$ 0,09
100	0,15 $\pm$ 0,03	0,51 $\pm$ 0,05***	0,24 $\pm$ 0,03	0,18 $\pm$ 0,04
200	0,09 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,06**	0,16 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,04
400	0,05 $\pm$ 0,01	0,19 $\pm$ 0,03**	-	0,08 $\pm$ 0,05
600	0,03 $\pm$ 0,01	0,19 $\pm$ 0,04**	-	0,05 $\pm$ 0,03
800	0,01 $\pm$ 0,02	0,14 $\pm$ 0,01**	-	0,03 $\pm$ 0,03

Con el objetivo de realizar la comparación entre cepas y especies, los valores de  $F_v/F_m$  se expresaron en función de su control respectivo, esto es, en ausencia de sulfuro (Fig. II.24). De este modo, observamos que en el rango 25 - 100  $\mu\text{M}$  de sulfuro, las cepas Ma1R, O1LH y O1R presentaron valores próximos a 1 y mayores que la cepa Ma1Vc, que en este mismo rango mostró una disminución del 75%, indicativo de una mayor sensibilidad del PSII al sulfuro.



**Fig. II.24** Rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ ) relativo de las cepas silvestres (Ma1Vc, O1LH) y resistentes (Ma1R, O1R) de *M. aeruginosa* y *Oscillatoria* con respecto al control (en ausencia de sulfuro) a concentraciones crecientes de este compuesto. Los datos se representan como la media  $\pm \sigma$  ( $n = 3$ ).

Por el contrario, la cepa en principio más tolerante al sulfuro, la cepa O1R, en el rango 25 – 50  $\mu\text{M}$  sulfuro, mostró un valor medio superior al del resto de cepas, aunque los datos presentaron una gran variación. A 100  $\mu\text{M}$  de sulfuro, las cepas Ma1R, O1LH y O1R mostraron un valor relativo de  $F_v/F_m$  similar al exhibido en ausencia de sulfuro, mientras que la cepa Ma1Vc mostró valores relativos de aproximadamente el 25% del control. Ahora bien, bajo una concentración de 200  $\mu\text{M}$ , la cepa O1R registró los valores de  $F_v/F_m$  relativos más altos, seguida de la cepa O1LH, Ma1R, y finalmente, Ma1Vc. Los

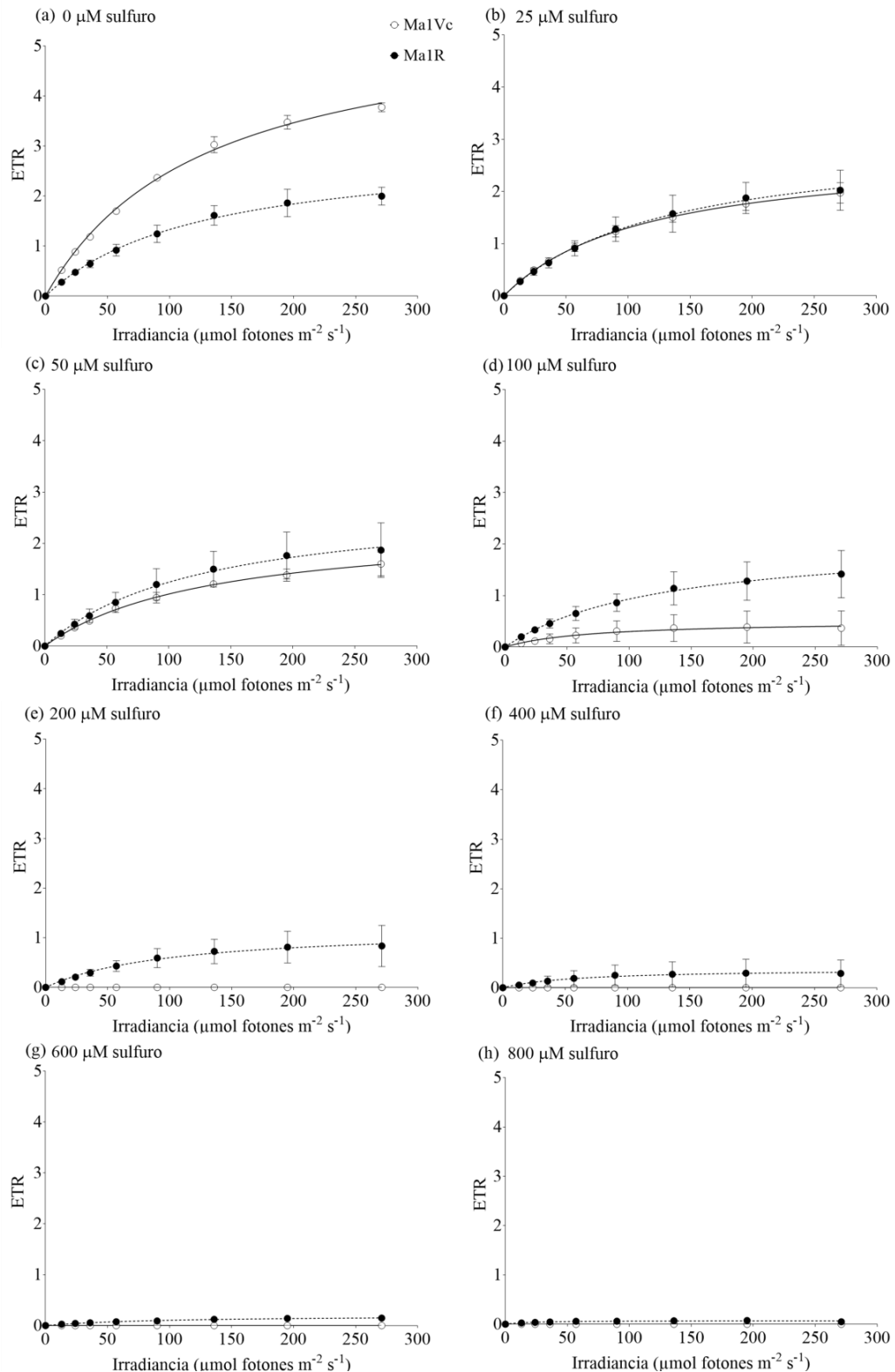
valores de  $F_v/F_m$  a 400  $\mu\text{M}$  de sulfuro de la cepa O1LH, como se comentó anteriormente, fueron indetectables, pero los de la cepa O1R fueron mayores que los de la cepa Ma1R. A partir de 600  $\mu\text{M}$  de sulfuro, no se observaron diferencias entre las dos cepas resistentes.

#### II.3.5.2. Tasa de transporte de electrones (ETR)

El efecto del sulfuro sobre la de la tasa de transporte de electrones (ETR) de las cepas silvestres y resistentes de *M. aeruginosa* y *Oscillatoria* se analizó obteniendo las curvas ETR-I a concentraciones crecientes de este (0, 25, 50, 100, 200, 400, 600 y 800  $\mu\text{M}$  sulfuro; Figs. II.25 y II.26). Los valores de ETR se obtuvieron como resultado de multiplicar los valores relativos por la absorptancia ( $a^*$ ) de cada cepa.

Al ser estos datos adimensionales, también lo fueron los valores de ETR obtenidos, que se muestran en las Figs. II.25 y II.26. Con el ajuste a la ecuación de Michaelis - Menten se obtuvieron los valores de  $\text{ETR}_{\text{max}}$  para ambas cepas a cada concentración de sulfuro (Tablas II.12 y II.13).

Los valores de  $a^*$  fueron  $0,24 \pm 0,015$  y  $0,12 \pm 0,017$  para Ma1Vc y Ma1R, respectivamente ( $n = 3$ ). En ausencia de sulfuro, la  $\text{ETR}_{\text{max}}$  de Ma1Vc prácticamente duplicó a la de la cepa Ma1R, aunque no presentaron diferencias significativas a 25 y 50  $\mu\text{M}$  sulfuro (Fig. II.25bc, Tabla II.12). Este resultado se debió a que la  $\text{ETR}_{\text{max}}$  de Ma1Vc disminuyó más de un 50% cuando se agregó 25 y 50  $\mu\text{M}$  sulfuro al medio; sin embargo, la  $\text{ETR}_{\text{max}}$  de Ma1R apenas varió en el rango 0 - 50  $\mu\text{M}$  sulfuro. Sin embargo, tras añadir 100  $\mu\text{M}$  sulfuro a la cepa Ma1Vc, la  $\text{ETR}_{\text{max}}$  disminuyó un 80% con respecto al valor observado a 50  $\mu\text{M}$  (Fig. II.25c-d). Es más, la tasa de flujo de electrones fue indetectable en esta cepa a partir de 200  $\mu\text{M}$  sulfuro, pero sí en el caso de la cepa resistente Ma1R, que mostró un descenso progresivo en el valor de  $\text{ETR}_{\text{max}}$ , aunque a 600 y 800  $\mu\text{M}$  sulfuro los valores fueron cercanos a 0 (Fig. II.25e-h, Tabla II.12).



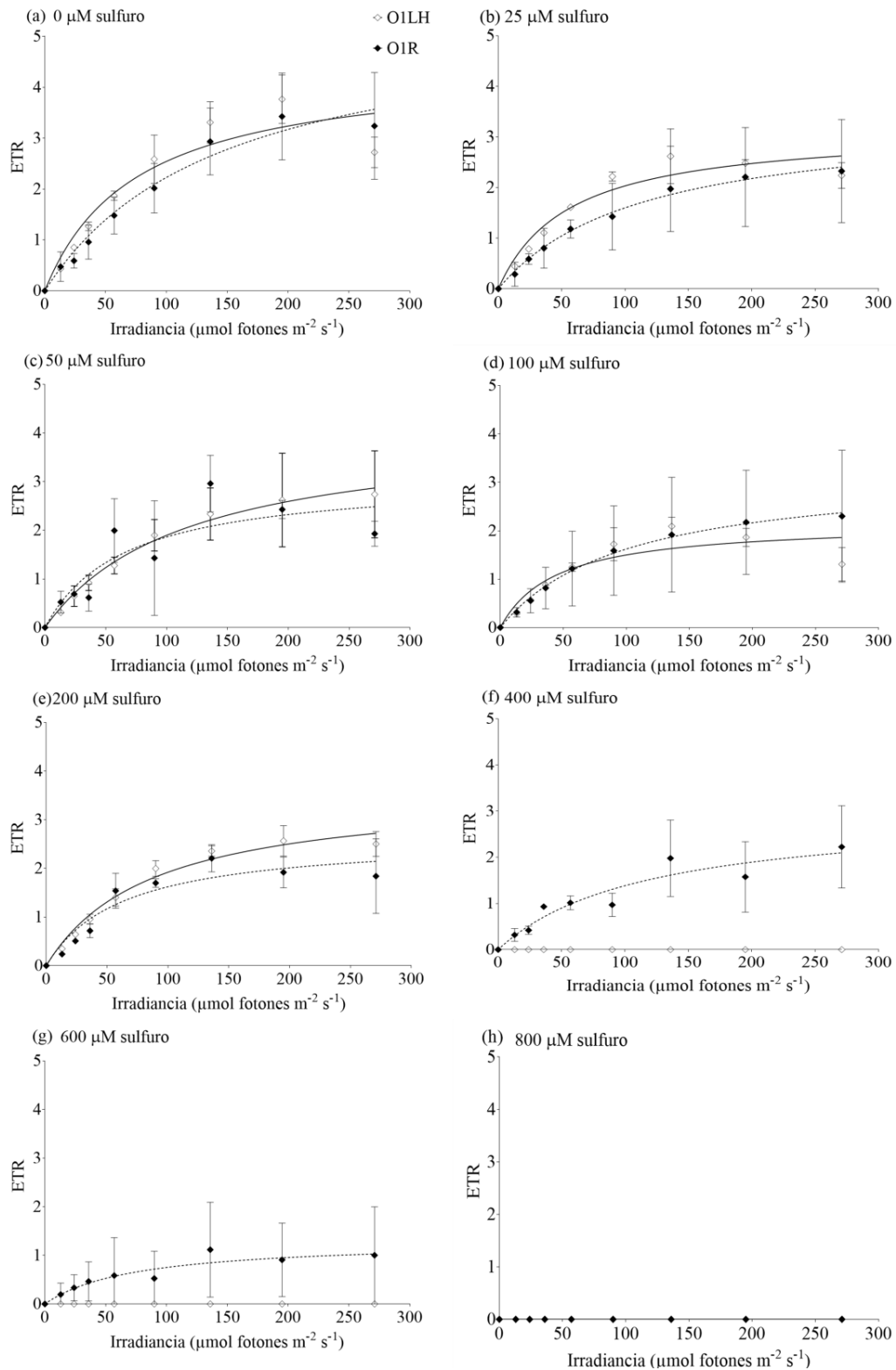
**Fig. II.25** Tasa de transporte de electrones (ETR) a irradiancias crecientes ( $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) en las cepas de *M. aeruginosa* silvestre (Ma1Vc; círculos blancos, línea continua) y resistente (Ma1R ; círculos negros, línea discontinua) en (a) 0  $\mu\text{M}$ ; (b) 25  $\mu\text{M}$ ; (c) 50  $\mu\text{M}$ ; (d) 100  $\mu\text{M}$ ; (e) 200  $\mu\text{M}$ ; (f) 400  $\mu\text{M}$ ; (g) 600  $\mu\text{M}$ ; y (h) 800  $\mu\text{M}$  sulfuro. Los datos muestran la media  $\pm \sigma$  ( $n = 3$ ). Las líneas indican el ajuste de los datos a la ecuación de Michaelis-Menten.

El valor de  $\alpha^{ETR}$  en ausencia de sulfuro fue mayor en la cepa Ma1Vc que en la cepa resistente Ma1R, pero no se observaron diferencias significativas a 25 y 50  $\mu\text{M}$  sulfuro; sin embargo, a 100  $\mu\text{M}$  sulfuro, la  $\alpha^{ETR}$  de la cepa Ma1R fue mayor. A partir de 200  $\mu\text{M}$  la ETR de la cepa Ma1Vc fue indetectable, y no se pudo obtener este parámetro y a partir de 400  $\mu\text{M}$ , la  $\alpha^{ETR}$  de la cepa Ma1R fue muy próxima a 0 (Tabla II.12).

**Tabla II.12.** Parámetros fotosintéticos ( $ETR_{\text{max}}$  y  $\alpha^{ETR}$ ) derivados de la relación ETR-I en las cepas silvestres (Ma1Vc) y resistentes (Ma1R) de *M. aeruginosa*. El guión indica que no fue posible el ajuste debido a que las tasas fueron indetectables. Los asteriscos indican diferencias significativas (test *t*-Student; \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,001$ ).

Concentración de sulfuro ( $\mu\text{M}$ )	$ETR_{\text{max}}$		$\alpha^{ETR}$	
	Ma1Vc	Ma1R	Ma1Vc	Ma1R
0	5,7 $\pm$ 0,4	3,0 $\pm$ 0,3**	0,39 $\pm$ 0,001	0,21 $\pm$ 0,02**
25	2,8 $\pm$ 0,3	3,1 $\pm$ 0,6	0,21 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,03
50	2,4 $\pm$ 0,4	2,9 $\pm$ 0,9	0,16 $\pm$ 0,001	0,19 $\pm$ 0,04
100	0,5 $\pm$ 0,4	2,1 $\pm$ 0,9*	0,05 $\pm$ 0,03	0,15 $\pm$ 0,03*
200	-	1,2 $\pm$ 0,7	-	0,1 $\pm$ 0,02
400	-	0,4 $\pm$ 0,4	-	0,04 $\pm$ 0,03
600	-	0,08 $\pm$ 0,05	-	0,01 $\pm$ 0,00
800	-	0,2 $\pm$ 0,1	-	0,02 $\pm$ 0,00

En el caso de *Oscillatoria*, los valores de  $a^*$  medidos fueron 0,27  $\pm$  0,02 y 0,37  $\pm$  0,01 para las cepas O1LH y O1R, respectivamente ( $n = 3$ ), y se utilizaron para obtener los valores absolutos de ETR. Se ha de resaltar que los datos de ETR mostraron una mayor variabilidad que los observados en el caso de *M. aeruginosa* (Fig. II.25). Al ajustar las curvas ETR-I a la ecuación de Michaelis-Menten, se obtuvieron los valores de  $ETR_{\text{max}}$  para las cepas O1LH y O1R a cada concentración de sulfuro (Tabla II.13).



**Fig. II.26** Tasa de transporte de electrones (ETR) en función de la irradiancia en las cepas de *Oscillatoria* silvestre (O1LH; rombos blancos, línea continua) y resistente (O1R; rombos negros, línea discontinua) en (a) 0  $\mu\text{M}$ ; (b) 25  $\mu\text{M}$ ; (c) 50  $\mu\text{M}$ ; (d) 100  $\mu\text{M}$ ; (e) 200  $\mu\text{M}$ ; (f) 400  $\mu\text{M}$ ; (g) 600  $\mu\text{M}$ ; y (h) 800  $\mu\text{M}$  de sulfuro, y muestran la media  $\pm \sigma$  ( $n = 3$ ). Las líneas indican el ajuste de las curvas a la ecuación de Michaelis - Menten.

Los valores de  $ETR_{\max}$  en ausencia de sulfuro no mostraron diferencias significativas entre las cepas O1LH y O1R. Los valores de  $ETR_{\max}$  de la cepa O1LH no mostraron un patrón claro de variación entre 25 y 200  $\mu\text{M}$  sulfuro (Tabla II.13), probablemente debido a que en algunos casos se observa una disminución del valor de ETR a la irradiancias mayores (Fig. II.26cd). Sin embargo, en el caso de la cepa O1R, se observa una disminución de la  $ETR_{\max}$  de aproximadamente un 40% a 25  $\mu\text{M}$  sulfuro frente al control, pero a partir de esta concentración, los valores se mantuvieron bastante estables hasta 200  $\mu\text{M}$  (Tabla II.13), ascendiendo levemente a 400  $\mu\text{M}$  y disminuyendo drásticamente a 600  $\mu\text{M}$  sulfuro.

**Tabla II.13.** Parámetros derivados de la relación  $ETR-I$  ( $ETR_{\max}$ , y  $\alpha^{ETR}$ ) de las cepas silvestres y resistentes de *Oscillatoria*. Se realizó una comparación entre cepas mediante el test  $t$ -Student, no encontrándose diferencias significativas.

Concentración de sulfuro ( $\mu\text{M}$ )	$ETR_{\max}$		$\alpha^{ETR}$	
	O1LH	O1R	O1LH	O1R
0	4,5 $\pm$ 0,1	4,2 $\pm$ 1,4	0,42 $\pm$ 0,03	0,29 $\pm$ 0,13
25	3,2 $\pm$ 0,3	2,5 $\pm$ 1,3	0,37 $\pm$ 0,00	0,26 $\pm$ 0,12
50	4,2 $\pm$ 1,9	2,3 $\pm$ 0,1	0,31 $\pm$ 0,06	0,17 $\pm$ 0,14
100	2,2 $\pm$ 0,2	2,4 $\pm$ 1,4	0,29 $\pm$ 0,02	0,3 $\pm$ 0,12
200	3,6 $\pm$ 0,4	2,5 $\pm$ 1,3	0,32 $\pm$ 0,03	0,25 $\pm$ 0,05
400	-	3,4 $\pm$ 1,9	-	0,28 $\pm$ 0,03
600	-	0,61 $\pm$ 0,71	-	0,06 $\pm$ 0,03
800	-	-	-	-

De hecho, el flujo de electrones ya fue indetectable en esta cepa a 800  $\mu\text{M}$  sulfuro. A pesar de este comportamiento dispar, no se observaron diferencias significativas entre las  $ETR_{\max}$  de las cepas O1LH y O1R a ninguna de las concentraciones de sulfuro y tampoco

se observaron diferencias significativas entre los valores de  $\alpha^{\text{ETR}}$  ( $P > 0,05$ ; test  $t$ -Student). No obstante, en el caso de la cepa O1LH se observó una ligera disminución de la eficiencia a concentraciones elevadas de sulfuro con respecto al control, pero no se observó un patrón claro de variación en la cepa O1R.

### II.3.5.3. Fotoincorporación de $\text{CO}_2$

Tras la realización del ensayo de fotoincorporación de  $^{14}\text{C}$ , se observó que ninguna de las cuatro cepas estudiadas presentó la capacidad de realizar fotosíntesis anoxigénica usando  $\text{H}_2\text{S}$  como donador de  $e^-$  al PSI. No hubo fijación de carbono significativa en presencia de  $10 \mu\text{M}$  DCMU (que inhibe el paso de  $e^-$  desde el PSII al PSI) y  $500 \mu\text{M}$  sulfuro en ninguna de las cepas (Tabla II.14), aunque se corroboró la mayor tolerancia de la fotosíntesis oxigénica de las cepas de *Oscillatoria* en presencia de  $500 \mu\text{M}$  sulfuro (Tabla II.14).

**Tabla II.14.** Tasa de fijación de carbono ( $\text{nmol C } \mu\text{g Chl } a^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) de las cepas Ma1Vc y Ma1R de *M. aeruginosa*, y cepas O1LH y O1R de *Oscillatoria* bajo diferentes tratamientos. En los primeros cuatro tratamientos, se usó una irradiancia saturante. Los asteriscos indican diferencias significativas (test  $t$ -Student; \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ).

	Ma1Vc	Ma1R	O1LH	O1R
Sin sulfuro	160,2 ± 11,4	146,2 ± 8,2	116,5 ± 25,3	141,59 ± 28,7
500 $\mu\text{M}$ sulfuro	1,3 ± 0,5	6,0 ± 1,9*	38,77 ± 6,77	43,76 ± 18,23
500 $\mu\text{M}$ sulfuro + 10 $\mu\text{M}$ DCMU	0,1 ± 0,0	0,5 ± 0,5	0,03 ± 0,01	0,10 ± 0,03*
Sin sulfuro + 10 $\mu\text{M}$ DCMU	1,2 ± 0,2	2,6 ± 0,7*	0,34 ± 0,03	0,74 ± 0,03***
Oscuridad sin sulfuro	0,8 ± 0,3	1,6 ± 0,1**	0,36 ± 0,03	0,63 ± 0,26

Los valores de fijación de carbono en ausencia de sulfuro (aerobiosis) no fueron significativamente distintos entre las cepas Ma1Vc y Ma1R, tal y como se observó con la producción de oxígeno referida al contenido de Chl  $a$  (Fig. II.21b). No obstante, en



presencia de 500  $\mu\text{M}$  sulfuro, la fotosíntesis oxigénica supuso un 0,8 y un 4%, respectivamente, en comparación con la exhibida en aerobiosis sin sulfuro (Tabla II.14). Ello es indicativo de la sensibilidad al sulfuro de este proceso en ambas cepas. Sin embargo, se observaron diferencias significativas entre las cepas, siendo algo mayor, como era de esperar, en la cepa resistente (Tabla II.14).

Por el contrario, ambas cepas de *Oscillatoria* presentaron fotosíntesis oxigénica parcialmente tolerante a 500  $\mu\text{M}$  sulfuro (Tabla II.14). En concreto, la tasa fotosintética fue aproximadamente del 33 y 31% del valor observado en ausencia de sulfuro para las cepas O1LH y O1R, respectivamente, no mostrando diferencias significativas entre ellas (Tabla II.14). Al igual que en el caso de *M. aeruginosa*, no se detectaron diferencias significativas en la incorporación de carbono de ambas cepas en ausencia de sulfuro (Tabla II.14). Sin embargo, se observó una tasa de incorporación de carbono algo mayor en la cepa silvestre de *M. aeruginosa* que en la de *Oscillatoria* ( $P < 0,001$ ), al igual que se había observado en la producción de oxígeno.

Es importante destacar que la tasa fotosintética medida como incorporación de carbono se encuentra en el mismo rango que la medida como producción de oxígeno a un valor de  $I$  de 200  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (el valor de  $I$  más próximo al utilizado en el experimento de fotoincorporación) para ambas especies estudiadas, esto es:  $153 \pm 15$  en el caso de Ma1Vc; y  $158 \pm 42$  para Ma1R;  $119 \pm 16$  para O1LH y  $116 \pm 10$  para O1R ( $n = 6$ ; ver apartado II.3.4.2.). Además, todas las cepas exhibieron resultados similares en el control en oscuridad y el control con 10  $\mu\text{M}$  de DCMU, es decir, se obtuvieron unos valores inferiores al 3% de los medidos en aerobiosis y ausencia de sulfuro. Los valores de fijación de  $^{14}\text{C}$  obtenidos en el control con 10  $\mu\text{M}$  de DCMU, por su parte, indican que a esta concentración la transferencia de  $e^-$  desde el PSII al PSI está bloqueada.

## II.4. DISCUSIÓN

### II.4.1. Dinámica de la adaptación y rescate evolutivo bajo selección por sulfuro

El neodarwinismo postula que, ante un cambio en las condiciones ambientales, tanto la presión selectiva como la variabilidad genética dan lugar a que los genotipos mejor adaptados sean favorecidos. Así, al considerar cómo evolucionan las poblaciones, la atención ha de recaer en el genotipo de los organismos, en cómo se manifiesta como fenotipo, y en cómo contribuye a la aptitud del organismo en las diferentes condiciones ambientales (Elena y de Visser, 2003). Esta suposición ha sido ampliamente aceptada por la comunidad científica; sin embargo, las demostraciones experimentales son escasas, debido a la dificultad para llevarlas a cabo (Sniegowski, 2005; Bell y Gonzalez, 2009, 2011; Lindsey et al., 2013; Orr y Unckless, 2014; Carja y Plotkin, 2019, Liu et al., 2019). En este contexto, hemos simulado diferentes escenarios de presión selectiva, realizando tres experimentos diferentes de “evolución en acción” sometiendo a poblaciones de dos taxones de cianobacterias a concentraciones crecientes de sulfuro y llegando a valores, *a priori*, letales para dichos taxones.

El sulfuro provoca una amplia variedad de efectos nocivos, ya que reacciona con citocromos, hemoproteínas y otras proteínas que contienen hierro y, como consecuencia, inhibe el transporte de  $e^-$  en las cadenas fotosintéticas y respiratorias (Bagarinao, 1992; Stal, 1995, 2012). Teniendo en cuenta que las cianobacterias destacan por ser un grupo de microorganismos que ha logrado una vasta distribución en ambientes extremos durante su historia evolutiva, poseen la capacidad de tolerar ambientes sulfurosos en un amplio rango de concentraciones (Cohen et al., 1975a,b, 1986; Padan, 1979; de Wit y van Gemerden, 1987; García-Pichel y Castenholz, 1990; Miller y Bebout, 2004; Klatt et al., 2015). Las adaptaciones que permiten esta resistencia están relacionadas con el mantenimiento de la fotosíntesis oxigénica debido a la tolerancia del PSII al sulfuro (Castenholz, 1977; Cohen et al., 1986; Dodds y Castenholz, 1990; Miller y Bebout, 2004) o a la realización de fotosíntesis anoxigénica independiente del PSII usando sulfuro como donante de electrones al PSI (Cohen et al. 1975a,b, 1986; Hamilton et al., 2016; Leister, 2017; Walter et al., 2017).

Mientras que los mecanismos a través de los cuales las cianobacterias pueden sobrevivir en ambientes sulfurosos se han caracterizado y estudiado (Cohen et al.,

1975a,b, 1986; Oren et al., 1977, 1979; Oren y Padan, 1978; Jørgensen et al., 1986; Arieli et al., 1991, 1994; Miller y Bebout, 2004; Myers y Richardson, 2009), apenas hay trabajos en los que se haya analizado el proceso de tolerancia al sulfuro desde un punto de vista filogenético (Sánchez-Baracaldo, 2005), evolutivo (Miller y Bebout, 2004; Fernández-Arjona et al., 2013) o eco-evolutivo (Martín-Clemente et al., 2019).

Como se esperaba, las cepas silvestres de *M. aeruginosa* y *Oscillatoria* mostraron diferente grado de tolerancia a la presencia de sulfuro (Figs. II.13 y II.14). Las cepas silvestres de *M. aeruginosa* dejaron de crecer a diferentes concentraciones: en torno a 0,1 mM de sulfuro en el caso de la cepa Ma1Vc, y a 0,2 mM en las cepas Ma5Vc y MaAVc. Estos valores están en el rango de los descritos en la literatura, ya que se sabe que las poblaciones de cianobacterias aisladas de ambientes no sulfurosos son extremadamente sensibles a este compuesto (esto es, a concentraciones < 0,15 mM de sulfuro total; Cohen et al., 1986; Miller y Bebout, 2004). Por su parte, la cepa O1LH de *Oscillatoria* mantuvo la capacidad de crecer hasta 0,7 mM sulfuro, mostrando apenas crecimiento a 0,9 mM. La máxima tolerancia al sulfuro de las cepas de *M. aeruginosa* y *Oscillatoria* está en consonancia con el medio natural del que fueron aisladas, resultado que coincide con el observado previamente por Miller y Bebout (2004) y que, por tanto, corrobora el hecho de que el grado de tolerancia al sulfuro en cianobacterias está directamente relacionado con los niveles de sulfuro existentes en el ecosistema en el que viven. Las tres cepas usadas de *M. aeruginosa* se aislaron de aguas libres de sulfuro, por lo que era de esperar que tanto el crecimiento como la actividad fotosintética se inhibieran a bajas concentraciones del mismo (Castenholz, 1977; Cohen et al., 1986, García-Pichel y Castenholz, 1990). Por el contrario, *Oscillatoria* se aisló de las aguas sulfurosas de Los Baños de La Hedionda, donde la concentración de sulfuro se mantiene entre 0,1 y 0,2 mM de sulfuro en las estaciones de verano y otoño, con un valor en el momento de su aislamiento de 0,1 mM sulfuro. De hecho, esta cepa mostró tasas de crecimiento máximas a concentraciones de sulfuro en el rango de 0,1 - 0,35 mM. En este sentido, se ha de tener en cuenta que cuando hablamos de límites o grado de tolerancia al sulfuro, nos referimos a adiciones diarias de sulfuro. Por ello, las concentraciones límite de crecimiento y de crecimiento máximo podrían estar sobreestimadas con respecto a la situación real de las poblaciones naturales, sometidas a una concentración de sulfuro más o menos constante a lo largo del tiempo.

#### II.4.1.1. Adaptación de *M. aeruginosa* a las aguas de los Baños de La Hedionda

A pesar de la alta sensibilidad de *M. aeruginosa* al sulfuro, la cepa Ma1Vc pudo adaptarse a los niveles, en principio letales, presentes en el ALH, utilizada como agente selectivo en el experimento de análisis de fluctuación, y que presentó concentraciones entre 97 y 207  $\mu\text{M}$  de sulfuro. Los resultados obtenidos en este experimento indicaron que las células resistentes a ALH surgieron por mutaciones en lugar de por aclimatación (Tabla II.3). Efectivamente, es un hecho aceptado que si las condiciones selectivas o el nivel de estrés no exceden los límites de tolerancia fisiológica, la supervivencia surge como resultado de procesos de aclimatación, a través de modificaciones en la expresión de los genotipos preexistentes (Bradshaw y Hardwick, 1989). Sin embargo, una vez que el nivel de estrés excede el límite fisiológico, la supervivencia depende exclusivamente de la evolución adaptativa, que resulta de la selección de mutaciones que confieren resistencia (Sniegowski y Lenski 1995; Flores-Moya et al., 2005; Sniegowski, 2005; Costas et al., 2007; López-Rodas et al., 2008a,b; Baselga-Cervera et al., 2016). En un estudio anterior se analizó el mecanismo que permitió la resistencia de la cepa Ma1G de *M. aeruginosa* a las aguas sulfurosas de Los Baños del Vilo (Periana, Málaga), con una concentración en torno a 0,24 mM sulfuro (Fernández-Arjona et al., 2013). En este trabajo también se observó que la cepa Ma1G se adaptó a través de mutaciones que surgieron antes de la exposición al agente selectivo. Además, las tasas de mutación espontánea ( $\mu$ ) en ambos casos fueron del mismo orden de magnitud:  $2,1 \times 10^{-7}$  en este estudio (Tabla II.3), y  $7,1 \times 10^{-7}$  en el caso de Los Baños de Vilo (unidades en células mutantes generación<sup>-1</sup>). De hecho, también coinciden con los valores de  $\mu$  encontrados en otras cepas de *M. aeruginosa* en el caso resistencia a NaCl ( $7,3 \times 10^{-7}$ , Melero-Jiménez et al., 2019) y a glifosato ( $3,1 - 3,6 \times 10^{-7}$ ; López-Rodas et al., 2007), pero un orden de magnitud menor que el valor para la resistencia al cobre ( $1,8 \times 10^{-6}$ ; García- Villada et al., 2004), altas temperaturas ( $1,2 \times 10^{-6}$ ; Costas et al., 2014) y dos órdenes de magnitud más bajos que el valor de  $\mu$  encontrado en el caso de la resistencia a petróleo y a gasoil ( $1,7 \times 10^{-5}$  y  $1,8 \times 10^{-5}$ ; Romero et al., 2012). Hay que señalar que todas estas tasas de mutación son comparables porque se calcularon del mismo modo, ya que derivaron de un diseño experimental similar.

Si, de manera recurrente, se producen dichas mutaciones de alelos silvestres sensibles a alelos resistentes, surgirían nuevos mutantes en cada generación. Sin embargo, debido a



que los alelos resistentes al sulfuro, con frecuencia, pueden generar un coste fisiológico en ausencia del mismo, la mayoría de estos mutantes se eliminarían por selección natural o azar (Crow y Kimura, 1970; Spiess y Spiess, 1989). Es decir, en las poblaciones se da un equilibrio mutación-selección, que, en el caso del sulfuro, arrojó un valor de  $\sim 1$  célula mutante resistente al sulfuro por cada  $10^6$  células silvestres, que fue similar al de la cepa Ma1G resistente a sulfuro estudiada por Bañares-España et al. (2016). Además, también fue similar al observado en otras cepas de la misma especie para la resistencia a NaCl (1 célula por cada  $10^6$  células silvestres; Melero-Jiménez et al., 2019) y a altas temperaturas (1,2 células por cada  $10^6$  células silvestres; Costas et al., 2014), pero mayor que el obtenido para algunos ambientes naturales extremos (1 – 2 células por  $10^7$  células de tipo silvestre; López-Rodas et al., 2011), y menor que el observado para el herbicida glifosato (6 – 7 células por  $10^4$  células de tipo silvestre; López-Rodas et al., 2007). Esta proporción de mutantes resistentes debería ser suficiente para asegurar la adaptación, y por tanto, la supervivencia, de *M. aeruginosa* en poblaciones expuestas repentinamente a concentraciones letales de sulfuro. Se podría plantear la hipótesis de que, en un escenario en los que algunos cuerpos de agua dulce se vieran inesperadamente contaminados con vertidos sulfurosos, pudieran seleccionarse poblaciones de *M. aeruginosa* resistentes a este compuesto, aunque su contribución a la producción primaria sería significativamente menor que la observada en ecosistemas inalterados.

### II.4.1.2. Rescate evolutivo en poblaciones de *M. aeruginosa* en condiciones letales de sulfuro

Aunque algunos ambientes ricos en sulfuro mantienen una concentración de sulfuro relativamente constante, como los manantiales sulfurosos, en otros las concentraciones cambian con el tiempo, como el hipolimnion de lagos estratificados o sedimentos marinos y de agua dulce, donde la flora microbiana puede generar gradientes verticales fluctuantes de sulfuro (Camacho et al., 2005). Por otra parte, la concentración de sulfuro en los cuerpos de agua cercanos a manantiales sulfurosos depende del contenido de materia orgánica, la concentración de oxígeno del agua y la temperatura. De hecho, muchos lagos estratificados, cuencas oceánicas y fiordos tienen aguas estancadas y ricas en  $H_2S$  (Jørgensen et al., 1979), en los que la concentración de sulfuro fluctúa entre su

producción por bacterias reductoras de sulfato y su oxidación química o anaeróbica por bacterias fotosintéticas del azufre (Czeczuga, 1968; Culver y Brunskill, 1969). En el caso de las aguas termales de La Hedionda, observamos que el contenido en sulfuro cambió a lo largo del año (Fig. II.8), en función del flujo de la corriente de agua desde el propio manantial hasta la zona de los baños, relacionado a su vez con el patrón de precipitación observado durante el ciclo anual (Reul et al., 2020). Así, resulta interesante analizar cómo una determinada población de cianobacterias, sometida de manera abrupta a niveles letales de sulfuro, puede evitar la extinción gracias al RE. De manera general, los factores que condicionan la probabilidad de supervivencia de una población a través de RE son la velocidad de deterioro del medio, el nivel de estrés alcanzado, el tamaño de la población afectada y la cantidad de variación genética disponible para la selección natural (Bell y Gonzalez, 2009, 2011; Lindsey et al., 2013; Baselga-Cervera et al., 2016; Liu et al., 2019). En esta Tesis se ha estudiado si la probabilidad de que ocurra RE podría verse afectada por el nivel de dispersión poblacional (una representación de la variación genética) y la tasa de deterioro del medio (es decir, a distintas velocidades de aumento de la concentración de sulfuro).

Los resultados con la cepa Ma1Vc de *M. aeruginosa* mostraron que el RE bajo selección por sulfuro, dependió principalmente de la variación genética, aunque también se vio afectado por la tasa de deterioro medioambiental (Tabla II.5; Fig. II.17). Bell y Gonzalez (2011) encontraron un resultado similar en levaduras sometidas a selección por salinidad: la probabilidad de RE depende tanto de la historia del cambio ambiental como de la conectividad entre poblaciones. En nuestro caso, los niveles más altos de RE se registraron en un entorno de dispersión global independientemente de la tasa de deterioro ambiental. Esto sugiere que una alta variación genética en las poblaciones de *M. aeruginosa* sería crucial para sobrevivir a niveles letales de sulfuro, y que esto podría ser suficiente para superar el estrés por sulfuro en el rango de concentraciones estudiadas y bajo cualquier velocidad de cambio ambiental (Fig. II.17). El mecanismo responsable podría ser la propagación, a través de las poblaciones, de mutaciones beneficiosas que confieran resistencia a sulfuro (Bell, 2017). Sin embargo, cuando la variación genética fue pequeña o nula (como se simuló bajo los escenarios de dispersión local o sin dispersión, respectivamente), una tasa de deterioro rápido disminuyó la probabilidad de RE (Fig. II.17). Concretamente, en poblaciones sin dispersión, el RE disminuyó siempre que hubo deterioro del medio, ya fuera lento o rápido. Así, la historia previa antes del

deterioro ambiental severo, es decir, antes de someter a las poblaciones a condiciones letales, afectó significativamente la probabilidad de ocurrencia de RE (Fig. II.17). Los resultados en el escenario con baja variabilidad genética coinciden con otros estudios experimentales, que han demostrado que tasas más bajas de cambio ambiental conducen a poblaciones más adaptadas, o lo que es lo mismo, a una menor probabilidad de extinción (Perron et al., 2008; Bell y Gonzalez, 2009, 2011; Collins y de Meaux, 2009). Además, confirman la hipótesis de que la tasa de deterioro ambiental puede modular el efecto de mutaciones beneficiosas. Es decir, los cambios ambientales rápidos tienden a favorecer la fijación de genotipos generados por pocas mutaciones de gran efecto, mientras que la adaptación a un deterioro más lento se basaría en la fijación en la población de cambios genéticos producto de numerosas mutaciones de efecto más pequeño (Collins y De Meaux, 2009; Lindsey et al., 2013). Así, nuestros resultados coinciden con los estudios previos: la variabilidad genética y la velocidad de deterioro afectan significativamente al RE y a la prevención de extinción de una población sometida a estrés ambiental (Bell y Gonzalez, 2009, 2011).

Paralelamente a la probabilidad de RE en poblaciones sometidas a estrés, resulta interesante estudiar cual fue la dinámica poblacional durante las semanas que duró el experimento. De manera general, cuando una población se expone a un estrés de manera abrupta, el número de individuos dentro de la población tiende a disminuir hasta la extinción, a menos que se evite mediante la propagación de variantes alélicas que confieran resistencia a dicho estrés (Bell, 2017). La dinámica poblacional general del RE es el resultado de dos procesos: la disminución exponencial de los genotipos sensibles y la propagación exponencial de los tipos resistentes, lo que resulta en una trayectoria general de tamaño poblacional en función del tiempo en forma de U (Bell, 2017). Este fenómeno fue analizado por primera vez por Gomulkiewicz y Holt (1995), y ha sido revisado y extendido por Orr y Unckless (2014). De manera general, pero de una forma más acusada en el tratamiento sin dispersión y sin deterioro del medio, las poblaciones de *M. aeruginosa* sometidas a estrés por sulfuro experimentaron esta respuesta en forma de U en la tasa de crecimiento al final del experimento (Fig. II.18), es decir, de declive seguido de recuperación poblacional, lo que ha sido propuesto por Bell (2017) como “el sello distintivo del RE”. Esto es, durante las 4 semanas en las que se establecieron condiciones letales de sulfuro, las poblaciones estudiadas sufrieron una caída inicial del valor de  $m$ , seguida de una recuperación al final de dicho período (Fig. II.18). La curva

en forma de U sería, en nuestro escenario, la unión de dos curvas: una que caracteriza la disminución en el número de individuos que portan el alelo silvestre de sensibilidad a concentraciones  $\sim 0,1$  mM sulfuro, y otra que caracteriza el aumento del número de individuos que portan el alelo mutante que les permitió sobrevivir en un ambiente con concentraciones  $> 0,15$  mM de sulfuro. Se ha de tener en cuenta que un mayor tamaño poblacional facilita el RE, tanto porque las poblaciones más grandes contienen inicialmente un mayor rango de variación genética, como porque producen una mayor cantidad de mutantes antes de extinguirse (Bell, 2017). En este sentido, cuando el RE depende de la aparición de nuevas variantes alélicas dentro de la población, la curva en forma de U se estira hacia la derecha (Orr y Unckless, 2014). Esto ocurre porque la recuperación es más lenta que si esta dependiera de variantes alélicas preexistentes dentro de la población, lo que refleja el tiempo de espera requerido para la aparición de una nueva mutación exitosa (Orr y Unckless, 2014).

Tomando conjuntamente los resultados del análisis de fluctuación y del experimento del RE, podemos plantear la hipótesis de que poblaciones de *M. aeruginosa* podrían sobrevivir a concentraciones letales de sulfuro a través de la selección de mutaciones preselectivas (adaptación), y que la variabilidad genética de la población y la velocidad de deterioro serían decisivas para el logro de dicha resistencia. Desde un punto de vista ecológico, se puede hipotetizar que la adaptación de poblaciones naturales de *M. aeruginosa* al sulfuro es muy probable. La razón es que en esta cianobacteria, un alto porcentaje de la variación fenotípica en muchos caracteres es consecuencia de variación genética, siendo la contribución no genética menos significativa (Bañares-España et al., 2006, 2007; López-Rodas et al., 2006a,b). En consecuencia, una alta variación genética en poblaciones naturales podría contribuir a la supervivencia de *M. aeruginosa* incluso a cambios bruscos de los niveles de sulfuro por encima de los niveles letales.

#### II.4.1.3. Límite de tolerancia al sulfuro de *M. aeruginosa* y *Oscillatoria* sp.

¿Cuál sería la concentración de sulfuro máxima que podrían llegar a tolerar poblaciones de *M. aeruginosa* y *Oscillatoria*, considerando su diferente historia previa de crecimiento bajo sulfuro? Para responder esta pregunta, se llevó a cabo el protocolo de trinquete, diseñado específicamente como una herramienta para estimar el límite máximo



de tolerancia a un agente selectivo. Así, observamos que la tolerancia al sulfuro aumentó significativamente en todas las cepas estudiadas. En el caso de la cepa Ma1Vc, todos los cultivos experimentales, excepto uno, consiguieron sobrevivir bajo una concentración de 0,4 mM sulfuro (Fig. II.15). Este resultado es bastante relevante, ya que se trata de una concentración que casi cuadruplica la tolerancia máxima inicial de esta cepa (~ 0,1 mM; Fig. II.13). Además, no se encontraron diferencias en el límite de resistencia al sulfuro en las poblaciones estudiadas, independientemente de la concentración inicial de sulfuro utilizada, lo que sugiere que el papel de la exposición previa al sulfuro no influyó en la resistencia final en esta cepa. Por otro lado, sólo 5 de las 12 poblaciones fundadas de la cepa Ma5Vc consiguieron sobrevivir a una concentración de 0,4 mM, el doble de la tolerancia máxima inicial de esta cepa (~ 0,2 mM; Fig. II.13), mientras que las 7 restantes sólo consiguieron sobrevivir bajo adiciones diarias de 0,27 mM (Fig. II.15), una concentración muy parecida al límite de crecimiento inicial mostrado por la cepa Ma5Vc. Además, la concentración de sulfuro de partida sí que influyó en el límite de la resistencia alcanzado, ya que el número de cultivos que consiguió sobrevivir a 0,4 mM fue mayor cuanto mayor fue la concentración de sulfuro de partida (Fig. II.15). Por su parte, la cepa MaAVc sólo llegó a sobrevivir a una concentración de 0,27 mM sulfuro, una concentración próxima a su límite de tolerancia (~ 0,2 mM; Fig. II.13). Desde un punto de vista evolutivo, este resultado es especialmente interesante, ya que se observa un potencial evolutivo distinto entre tres cepas pertenecientes a la misma especie y que se han aislado del mismo cuerpo de agua. Esto lleva a pensar a que en la naturaleza coexistan cepas de la misma especie que, bajo una hipotética situación de fragmentación o heterogeneidad espacial, puedan dar lugar a poblaciones con diferente capacidad adaptativa al sulfuro. Además, tras analizar las cepas Ma1R y Ma5R, derivadas del experimento de trinquete, observamos que el mecanismo que permitió el aumento de tolerancia al sulfuro en las cepas Ma1Vc y Ma5Vc fue adaptación a través de mutaciones preseleccionadas (Tabla II.4). Sin embargo, la cepa MaAVc, analizando la cepa derivada MaAR, sobrevivió a 0,27 mM de sulfuro a través de aclimatación (Tabla II.4). De hecho, la cepa Ma1Vc, la más sensible al sulfuro de las estudiadas de *M. aeruginosa*, fue la que consiguió un límite de adaptación mayor y en mayor número de poblaciones, en comparación con las cepas Ma5Vc y MaAVc (Fig. II.15).

La respuesta de las cepas más tolerantes al sulfuro (Ma1R y Ma5R) frente a este compuesto se analizó en mayor profundidad determinando su crecimiento tras 5 d de

cultivo en el laboratorio. La cepa Ma1R fue capaz de crecer, aunque a una tasa muy baja, hasta una concentración de sulfuro de 0,6 mM (Fig. II.19). Esto significa que toleró concentraciones de sulfuro que sextuplicaron el límite observado en la cepa silvestre. Este aumento de la tolerancia a un agente selectivo es similar al encontrado en otros mutantes de *M. aeruginosa* resistentes a otros compuestos tóxicos. De hecho, la tolerancia aumentó por cuatro o por doce en diferentes cepas usando cobre como agente selectivo (Rouco et al., 2014), por seis para petróleo o gasoil (Romero et al., 2012) y por nueve usando el herbicida simazina (Huertas et al., 2010).

Por otro lado, la cepa O1LH de *Oscillatoria*, como se esperaba, desarrolló una mayor tolerancia al sulfuro en comparación con *M. aeruginosa* (Fig. II.16). Una de las poblaciones experimentales derivadas pudo crecer bajo adiciones diarias de 2 mM, la concentración más alta probada, y otras cinco a valores ligeramente por debajo (tres a 1,8 mM y dos a 1,9 mM). Este resultado coincide con el hecho de que varias especies del género *Oscillatoria* proliferan en ambientes naturales donde los niveles de sulfuro total pueden alcanzar concentraciones  $\geq 1,5$  mM (Camacho et al., 1996, 2000). Curiosamente, en esta cepa, las condiciones de cultivo con las que comenzó el experimento determinaron el límite de tolerancia, así como sucedió (en menor medida) en la cepa Ma5Vc, y a diferencia de lo que ocurrió en la cepa Ma1Vc. Es decir, solo cuando la concentración inicial de sulfuro fue de 0,5 mM, uno de los cultivos de la cepa O1LH fue capaz de llegar a tolerar 2 mM sulfuro (Fig. II.16c). Esto podría explicarse por el hecho de que la cepa Ma1Vc de *M. aeruginosa* es muy sensible al sulfuro y, como consecuencia, niveles de sulfuro subletales no modularían el punto final de su tolerancia máxima. Por el contrario, la presencia de un nivel moderado-alto de sulfuro (0,5 mM) permitió llegar al límite máximo de tolerancia observado en *Oscillatoria*. Este resultado estaría relacionado con el hecho de que concentraciones moderadas de sulfuro pueden inducir cambios en las características fotosintéticas de las cianobacterias resistentes al mismo (Cohen et al., 1986; Camacho et al., 2005).

Posteriormente, y tras el estudio de la cepa O1R (la cepa aislada de trinquete), se demostró que la cepa O1LH llegó a ese máximo límite de tolerancia a través de un proceso de aclimatación (Tabla II.4). Como se comentó anteriormente, el experimento de trinquete con *Oscillatoria* finalizó por motivos experimentales, por lo que es posible que no se llegara al límite de la resistencia al sulfuro en esta cepa aislada de aguas sulfurosas. Bajo adiciones diarias de 2 mM, una concentración algo mayor del doble de la



concentración de sulfuro que limitaba su crecimiento, la cepa O1LH llegó a aclimatarse a condiciones inicialmente letales de sulfuro. Además, ambas cepas mostraron un patrón de crecimiento similar ante concentraciones crecientes de sulfuro, con una tasa de crecimiento más alta en presencia de este compuesto (Fig. II. 20). De hecho, la mayor tasa de crecimiento observada en la cepa O1LH se detectó a concentraciones entre 0,1 y 0,35 mM de sulfuro, disminuyendo progresivamente a partir de este nivel. Sin embargo, la tasa de crecimiento para O1R se mantuvo más o menos estable hasta 1,6 mM de sulfuro, disminuyendo gradualmente a partir de este valor. Ambas cepas, de este modo, manifestaron el mismo patrón de crecimiento, aumentando con la concentración de sulfuro, mostrando una meseta de crecimiento constante, y disminuyendo a concentraciones de sulfuro limitantes.

### II.4.2. Coste fisiológico de la tolerancia al sulfuro

La adaptación a un agente selectivo implica, generalmente, un coste fisiológico (Lenski, 1998; Andersson y Levin, 1999; Anderson, 2006) pues conlleva una modificación del fenotipo preexistente, lo que se considera perjudicial dentro del contexto del ambiente ancestral (Coustau et al., 2000). Por ello, en aguas no sulfurosas, las células resistentes al sulfuro serían desplazadas por las silvestres debido a su menor tasa de crecimiento. Así, y para comprobar y cuantificar el coste fisiológico que implica la adquisición de algún tipo de resistencia al sulfuro, estudiamos la tasa de crecimiento de las cepas silvestres y resistentes de *M. aeruginosa* y *Oscillatoria*, así como las características fotosintéticas y morfológicas. En el caso de *M. aeruginosa*, para analizar la tasa de crecimiento se eligieron las dos cepas más resistentes derivadas del experimento de trinquete (Ma1R y Ma5R). Por otro lado, para el análisis fotosintético y morfológico solo se consideró la cepa Ma1R.

#### II.4.2.1. Crecimiento y fotosíntesis en condiciones no selectivas

Los resultados mostraron un coste fisiológico en las cepas resistentes al sulfuro de *M. aeruginosa*, derivado de dicha tolerancia. Cuando se cultivaron las células de la cepa

Ma1R en ausencia de sulfuro, se observó una disminución del crecimiento de  $\sim 17\%$  con respecto a las células de la cepa silvestre Ma1Vc (Fig. II.19). Este mismo efecto se observó tras analizar el crecimiento en ausencia de sulfuro de la cepa resistente Ma5R, que disminuyó  $\sim 31\%$  con respecto a la cepa silvestre Ma5Vc de la que provenía (Fig. II.19). Estos resultados reflejan el coste de la adaptación sufrido por las cepas de *M. aeruginosa* adaptadas a vivir en 0,4 mM sulfuro. Paralelamente, la alta tasa de respiración (TR) medida en la cepa Ma1R (Fig. II.21) podría ser también un indicador del estrés sobrellevado por esta cepa, al ser cultivada bajo condiciones selectivas.

La menor tasa de crecimiento observada en la cepa Ma1R está en consonancia con el menor valor de tasa de fotosíntesis neta máxima ( $TFN_{max}$ ) por célula detectada en esta cepa comparada con la silvestre (Fig. II.21a; Tabla II.6). No obstante, el coste fisiológico de la resistencia al sulfuro en términos fotosintéticos fue más notable que en términos de crecimiento, pues la  $TFN_{max}$  descendió  $\sim 50\%$  en el caso de la cepa Ma1R con respecto a la cepa ancestral. Sin embargo, la producción de oxígeno por unidad de Chl *a* se mantuvo sin diferencias (ver apartado II.4.2.2). Además, no se observaron diferencias entre la eficiencia fotosintética de las cepas. Por otro lado, la falta de diferencias entre cepas en el valor de  $F_v/F_m$  en ausencia de sulfuro (Tabla II.11) es indicativo de un funcionamiento óptimo del PSII en la cepa resistente, y concuerda con que las cepas Ma1R y Ma1Vc tengan una eficiencia fotosintética similar. Bañares-España et al. (2016) tampoco encontraron diferencias entre el valor de  $F_v/F_m$  de la cepa silvestre Ma1G y su resistente al sulfuro en ausencia del mismo, lo que podría significar que el coste fisiológico a nivel fotosintético en ambos casos podría no estar relacionado con un deterioro de la eficiencia fotoquímica del PSII.

En lo que respecta a las curvas ETR-I en ausencia de sulfuro, se observó una disminución en el valor de  $ETR_{max}$  de la cepa resistente de *M. aeruginosa* con respecto a la ancestral. De hecho, la  $ETR_{max}$  mostrada por la cepa silvestre Ma1Vc prácticamente duplicó los valores obtenidos en la cepa resistente (Tabla II.12). Este porcentaje de disminución coincide con el observado en los valores de  $TFN_{max}$ , medidos como producción de oxígeno y referidos a la concentración celular. Este mismo efecto se observó por Bañares-España et al. (2016), con una disminución de aproximadamente un 50% de la  $ETR_{max}$  en la cepa Ma1G resistente a sulfuro comparada con la silvestre. Además se observaron diferencias en los valores de  $\alpha^{ETR}$ , menores en el caso de la cepa Ma1R, al igual que se observó en el caso de la cepa resistente Ma1G (Bañares-España et

al., 2016). No obstante, esta diferencia en la eficiencia calculada a partir de la ETR no se observó en los valores de eficiencia calculada a partir de los datos de producción de oxígeno, resultado que sí se observó en el caso de la cepa Ma1G (Bañares-España et al., 2016). La razón de esta discrepancia podría deberse a la diferente forma del cálculo de la absorptancia en cada caso.

En lo que respecta a las cepas de *Oscillatoria*, y teniendo en cuenta que la cepa O1R se obtuvo a través de aclimatación, no era esperable observar un coste fisiológico comparable, en principio, al que se daría por un proceso de adaptación a través de la selección de mutaciones preselektivas. Así, y aunque la cepa O1R creció ligeramente menos en ausencia de sulfuro (Fig. II.20), los valores de  $TFN_{max}$  y eficiencia fotosintética fueron similares en las dos cepas (Fig. II.22; Tabla II.7). Sin embargo, se ha de tener en cuenta que las condiciones óptimas de cultivo de la cepa O1LH en laboratorio fueron bajo adiciones diarias de 0,2 mM de sulfuro. Por ello, también podríamos argumentar que no se observaron diferencias en el valor de  $m$  entre las cepas O1LH y O1R a 0,2 mM sulfuro (Fig. II.20), si se considera esa concentración como la condición ancestral de la cepa silvestre. Además, no se observaron diferencias en los valores de  $ETR_{max}$  en ausencia de sulfuro (Tabla II.13). Este era el resultado esperado, teniendo en cuenta que la  $TFN_{max}$  no mostró diferencias significativas entre las cepas O1LH y O1R. Además, tampoco se observaron diferencias en el valor de  $\alpha^{ETR}$ , al igual que no se encontraron diferencias significativas en el valor de  $\alpha^{TFN}$ . Hay que resaltar aquí que, debido al carácter filamentososo de *Oscillatoria*, las suspensiones no eran homogéneas durante las medidas de ETR, provocando la obtención de curvas ETR- $I$  con considerables desviaciones (Fig. II.26). Bajo esta premisa, no se habría observado coste fisiológico en la cepa O1R ni a nivel de crecimiento celular ni a nivel fotosintético.

### II.4.2.2. Contenido pigmentario, C y N total y morfología celular

El coste fisiológico de la mutación, además de en una disminución de la tasa de crecimiento, puede verse reflejado en otros caracteres fenotípicos (Coustau et al., 2000). De hecho, en un estudio previo realizado con mutantes resistentes a las aguas de los Baños del Vilo, obtenidos a partir de la cepa Ma1G de *M. aeruginosa*, se observaron cambios en contenido de pigmentos fotosintéticos, el volumen celular, así como

alteraciones en la morfología celular (Bañares-España et al., 2016). En el caso del contenido pigmentario de *M. aeruginosa* y *Oscillatoria*, se observaron diferencias significativas entre cepas silvestres y resistentes. De hecho, la concentración de Chl *a* es una de las variables consideradas de manera rutinaria en muchas áreas de investigación del estrés desde un punto de vista fisiológico (Parida et al., 2002, 2007). La síntesis de Chl *a* cambia considerablemente en respuesta al estrés en plantas (Tanaka y Tanaka, 2006), aunque los mecanismos reguladores de la biosíntesis de Chl *a* en cianobacterias siguen sin estar claros. Por su parte, la concentración de carotenoides (CT) a menudo está relacionada con el nivel de estrés celular (Zhu et al., 2010), ya que los CT no solo desempeñan funciones importantes en la recolección de luz y en la estructura y biogénesis de los complejos fotosintéticos, sino que también poseen un papel esencial en la disipación del exceso de energía (Demmig-Adams, 1992; Horton et al., 1996). Aunque la modulación de la síntesis de pigmentos en situaciones de estrés suele estar relacionada con procesos de aclimatación, es posible que las cepas adaptadas a mayores concentraciones de sulfuro pudieran presentar también este tipo de respuestas.

Nuestros resultados revelaron que las concentraciones de Chl *a* y CT fueron más bajas en las células resistentes a sulfuro que en las silvestres en ambas especies (Tabla II.8). En el caso de la cepa Ma1R, el contenido de Chl *a* y CT por célula se redujo aproximadamente a la mitad. Este resultado difiere del obtenido por Bañares-España et al. (2016), donde la cepa resistente al sulfuro duplicó la cantidad de Chl *a* por célula, sin cambios en el nivel de CT. El menor contenido de Chl *a* por célula observado en la cepa Ma1R podría ser consecuencia de una disminución de la síntesis de este pigmento (Wherley et al., 2005), así como de una disminución en el tamaño y/o el número de unidades fotosintéticas por célula (Jodłowska y Latała, 2010). Esta segunda opción explicaría que cuando la TFN se expresó en función del contenido de Chl *a*, no se observaran diferencias entre las cepas resistentes y sensibles (Dring, 1982). Como pigmentos accesorios, los CT tienen la capacidad de transferir la energía lumínica capturada a la Chl *a*, lo que aumenta el potencial de producción fotosintética (Clayton, 1980). Una disminución de ambos pigmentos de aproximadamente un 50% por célula, explicaría la reducción de la TFN<sub>max</sub> (referida a 10<sup>6</sup> células) a casi la mitad, observada en la cepa resistente Ma1R (Fig. II.21a). No obstante, no se encontraron diferencias entre cepas de *M. aeruginosa* cuando el nivel de contenido pigmentario se refirió al volumen celular (Tabla II.9). Este resultado se debe a que las células de la cepa resistente al

sulfuro poseen un volumen de aproximadamente la mitad de la de las silvestres. Curiosamente, se observó la misma respuesta en el caso de la cepa Ma1G, pero por la razón inversa. Dado que se detectó un aumento del volumen celular en la cepa Ma1G resistente al sulfuro (Bañares-España et al., 2006), el contenido de Chl *a* por volumen fue similar en ambas cepas. Así, podemos observar una modificación significativa de los niveles de Chl *a* por célula en ambos estudios, sin diferencias en la concentración por volumen. Se ha de tener en cuenta, además, que las cepas resistentes a sulfuro se obtuvieron a través de experimentos diferentes (trinquete en este estudio, y análisis de fluctuación en el trabajo de Bañares-España et al., 2016).

En el caso de *Oscillatoria*, la cepa O1R mostró una disminución de aproximadamente un 12% en el contenido de Chl *a* por unidad de biomasa con respecto a O1LH (Tabla II.8). Del mismo modo, el contenido de CT mostró valores significativamente más bajos, casi la mitad, en la cepa resistente. Este cambio en el contenido de pigmentos no pareció afectar a la tasa de fotosíntesis ni a la eficiencia fotosintética de esta cepa (calculada tanto a partir de la producción de oxígeno como a partir de los valores de ETR), pero sí se observó un valor algo menor de  $F_v/F_m$  en la cepa O1R comparada con la cepa silvestre O1LH cuando se midió en ausencia de sulfuro (Tabla II.11).

En cuanto al contenido de pigmentos hidrosolubles, se observó que el contenido de ficoeritrina (FE) por célula en la cepa resistente Ma1R (Tabla II.8) y la cepa resistente Ma1G estudiada por Bañares-España et al. (2016) mostraron niveles significativamente más altos que sus respectivas cepas de tipo silvestre (en torno a 10 veces más). No obstante, en el caso de la cepa Ma1R y Ma1Vc, no se observaron diferencias significativas en el contenido por célula de la ficobiliproteína más abundante, la ficocianina (FC), resultado diferente al observado en el caso de la cepa Ma1G, donde se observó el doble de contenido en la cepa resistente (Bañares-España et al., 2016). Observamos, de nuevo, una respuesta diferente en las dos cepas de *M. aeruginosa* resistentes al sulfuro. Por otra parte, la cepa O1R presentó un menor contenido de FC, una séptima parte del observado en la cepa O1LH, y un contenido de FE similar.

Sumando el contenido total de pigmentos, se observa que la concentración por célula es menor en la cepa Ma1R que en la cepa Ma1Vc. Uno de los cambios observados en la cepa Ma1G resistente al sulfuro fue la presencia de un sistema de membranas tilacoidales menos desarrollado, con espacios vacíos, que se podrían atribuir al efecto del sulfuro sobre la actividad enzimática o sobre la estructura de macromoléculas implicadas en la

integridad de la membrana (Bañares-España et al., 2016). Aunque desconocemos si este efecto está presente en el caso de la cepa Ma1R, la diferencia en el contenido de pigmentos podría ser consecuencia del deterioro de las membranas de las células cultivadas a niveles altos de sulfuro. Sin embargo, no se detectó un menor contenido de N en la cepa Ma1R, como cabría esperar quizás, en células que contienen menos pigmentos, sino todo lo contrario, un porcentaje mayor (Tabla II.10). Es decir, parece que la presencia de sulfuro no afectaría, en principio, a la incorporación y asimilación de N, pero sí a la síntesis de pigmentos fotosintéticos. En el caso de plantas terrestres, concentraciones de hasta 0,1 mM NaHS tienen un efecto promotor de la fotosíntesis; entre otros, de la síntesis de Chl *a* y de RubisCo, y se ha sugerido su papel regulador en este proceso (Chen et al., 2011). Sin embargo, concentraciones entre 0,5 y 1 mM NaHS, reducen el contenido de pigmentos y de RubisCo, sin que se detecte una disminución de proteínas totales (Chen et al., 2011). Es decir, se observó un efecto específico sobre el contenido de Chl *a*, que podría estar ocurriendo en el caso de la cepa Ma1R, cultivada a 0,4 mM sulfuro. Sin embargo, en *Oscillatoria* sí se observó un menor contenido de N en la cepa O1R, que podría estar relacionado con el menor contenido total de pigmentos en esta cepa comparada con la salvaje.

Por otro lado, el tamaño de los agregados de los cultivos de *Oscillatoria* también pareció verse modificado como consecuencia de la aclimatación a concentraciones de sulfuro letales por parte de la cepa O1LH. Ramsing et al. (1993) observaron en poblaciones naturales de *Oscillatoria* de Kattegat (Dinamarca), que sus filamentos característicos parecían fusionarse cuando las cianobacterias, en condiciones de estrés, se degradaban. De hecho, también observaron una menor concentración de pigmentos en estas poblaciones afectadas. Se sabe que uno de los principales factores relacionados con el aumento del tamaño de los agregados celulares en los tapetes microbianos es la producción de polisacáridos (Thornton, 2002; Yang et al., 2008), que puede estar estimulado por el estrés celular (Yang et al., 2010). Así, cabría esperar que los cultivos de la cepa O1R presentaran un tamaño de agregados celulares mayor que los de la cepa O1LH. Sin embargo, nuestros resultados muestran lo contrario: la cepa O1LH mostró agregados mayores que la cepa O1R (Fig. II.23). Sin embargo, la precipitación de azufre coloidal, como consecuencia de adiciones de altos niveles de sulfuro a los cultivos de O1R, podría haber afectado a la formación de agregados. De hecho, un aspecto importante, y poco estudiado en las comunidades que habitan manantiales sulfurosos, es



la relación entre la estructura de los tapetes microbianos y los depósitos de azufre coloidal (o azufre elemental; Douglas y Douglas, 2000). Estos pequeños glóbulos esféricos de azufre se unen extracelularmente a las cianobacterias de ambientes con altos niveles de sulfuro (Douglas y Douglas, 2000), influyendo en la flotación (Perkins et al., 1981), en el proceso de agregación (McGregor-Shaw et al., 1973) y en la disminución de la probabilidad de ser consumidos por herbívoros (Brooke et al., 1995). De este modo, los depósitos de azufre coloidal dificultarían la adhesión entre células para formar agregados, lo que podría justificar que los cultivos de la cepa O1R presentaran agregados celulares de menor tamaño que los de la cepa O1LH.

### II.4.3. Fotosíntesis en presencia de sulfuro: tolerancia del PSII, ETR y fijación de $^{14}\text{C}$

Ya que el sulfuro afecta directamente al PSII, un análisis de la fluorescencia de la Chl *a* de cepas silvestres y resistentes a distintas concentraciones de sulfuro puede revelar aspectos acerca de su nivel de resistencia a este compuesto, tal y como observaron Miller y Bebout (2004). Ahora bien, y como se ha comentado anteriormente, el valor de  $F_v/F_m$  no es un indicador absoluto de la función del PSII en cianobacterias y puede mostrar valores muy diferentes entre distintas especies, como se ha observado en este trabajo en el caso de *M. aeruginosa* y *Oscillatoria*. No obstante, cuando se interpreta con precaución,  $F_v/F_m$  sigue siendo un parámetro útil (Ogawa et al., 2017). Además, al expresar los datos de  $F_v/F_m$  con respecto al control en ausencia de sulfuro, fue posible realizar una comparación fehaciente entre cepas del efecto del sulfuro sobre la actividad de PSII, tal y como se ha hecho previamente con otras cepas de cianobacterias (Miller y Bebout, 2004). Hay que tener en cuenta que las concentraciones de sulfuro discutidas más adelante hacen referencia a la concentración inicial de sulfuro inoculada. Como ya se ha comentado, aunque la concentración de sulfuro disminuya en el proceso de medida, la exposición a una determinada concentración de sulfuro inicial tiene un efecto duradero que persiste incluso después de eliminarlo del medio (García-Pichel y Castenholz, 1990).

En ausencia de sulfuro, no se detectaron diferencias entre el valor de  $F_v/F_m$  medido en las cepas sensibles y resistentes de *M. aeruginosa* (Tabla II.11). López-Rodas et al. (2006) estimaron los valores de  $F_v/F_m$  de 18 cepas de *M. aeruginosa*, observando que variaban en un rango entre  $0,055 \pm 0,008$  hasta  $0,555 \pm 0,018$ ; así, nuestros datos en

ausencia de sulfuro ( $\sim 0,6$ ) se encontrarían en el rango más alto de los descritos por López-Rodas et al. (2006). Del mismo modo, nuestros valores están en el rango de los medidos también por Bañares-España (2016) y Fernández-Arjona et al. (2013) en la cepa Ma1G de *M. aeruginosa*. Se ha de tener en cuenta que la aplicación de esta técnica en las muestras de *Oscillatoria* ha estado limitada por las dificultades experimentales para conseguir una muestra homogénea durante las medidas de  $F_v/F_m$ , y que los valores obtenidos fueron considerablemente más bajos que los observados en *M. aeruginosa* ( $\sim 0,25$ ). Sin embargo, estos datos se acercan a los descritos, por ejemplo, en una cepa de *Oscillatoria limnetica* aislada de Klong Pravatebureerom (Tailandia), con un valor de  $F_v/F_m$  entre 0,3 y 0,4 (Ruangsomboon, 2015), así como en la cepa de *Oscillatoria* estudiada por Nath et al. (2017), que mostró un valor de  $F_v/F_m \sim 0,15$ .

La concentración de sulfuro a la cual se observó una disminución significativa de  $F_v/F_m$  varió entre cepas, y fue indicativa de diferencias en la eficiencia del PSII en presencia de sulfuro (Fig. II.24; Miller y Bebout, 2004). La tolerancia del PSII al sulfuro observada en la cepa Ma1Vc fue muy baja, ya que el valor de  $F_v/F_m$  disminuyó drásticamente incluso en la concentración más baja de sulfuro probada (25  $\mu\text{M}$ ). Sin embargo, en comparación con Ma1Vc, la cepa Ma1R mostró una mayor tolerancia del PSII bajo concentraciones moderadas de sulfuro, ya que los valores de  $F_v/F_m$  permanecieron bastante constantes en el rango 0 - 0,1 mM sulfuro. Por su parte, las dos cepas de *Oscillatoria* mostraron una mayor tolerancia del PSII al sulfuro en comparación con la cepa Ma1Vc, e incluso mayor que la presentada por la cepa Ma1R, sobre todo en el caso de la cepa O1R. Así, en ambas cepas de esta especie los valores de  $F_v/F_m$  se mantuvieron estables en el rango de concentraciones de 0 a 0,2 mM sulfuro. Sorprendentemente, en el rango de concentraciones de 0 a 0,1 mM sulfuro, no hubo diferencias en los valores de  $F_v/F_m$  con respecto al control entre las cepas Ma1R, O1LH y O1R (Fig. II.24). Por otro lado, el hecho de que el valor de  $F_v/F_m$  en la cepa O1LH fuera indetectable a 0,4 mM sulfuro no es congruente teniendo en cuenta los datos de crecimiento de dicha cepa a esta concentración. Se ha de tener en cuenta que el valor de partida de  $F_v/F_m$  fue muy bajo (0,26), lo que puede haber dificultado su detección a concentraciones más altas de sulfuro. Por otra parte, la concentración de sulfuro aplicada en la medición de ambos parámetros (crecimiento y  $F_v/F_m$ ) no es estrictamente comparable. La tasa de crecimiento se calcula tras 5 d y adiciones diarias de sulfuro. Sin

embargo,  $F_v/F_m$  se estima tras 1h desde la adición de sulfuro. Este hecho podría influir en la interpretación conjunta del crecimiento y los valores de  $F_v/F_m$  en presencia de sulfuro.

**Tabla II.15.** Cepas de *Oscillatoria* estudiadas por Miller y Bebout (2004), y las cepas de este estudio (\*). Se señala, por columnas de izquierda a derecha, la concentración de H<sub>2</sub>S necesaria para reducir la función del PSII un 50% (Miller y Bebout 2004; este trabajo); la concentración estimada de sulfuro total necesaria para reducir la función del PSII un 50% (este trabajo); la concentración de H<sub>2</sub>S del medio del que se aislaron las cepas (Miller y Bebout 2004; este trabajo); la concentración estimada de sulfuro total en dichos medios (este trabajo) y su pH (Miller y Bebout, 2004; este trabajo). Se ha de tener en cuenta que los experimentos se llevaron a cabo a pH 7,2 en ambos estudios, por lo que ~ 35% del sulfuro total está en forma de H<sub>2</sub>S.

Cepa de <i>Oscillatoria</i>	Concentración que causa el 50% de inhibición de $F_v/F_m$ ( $\mu\text{M}$ )		Concentración ( $\mu\text{M}$ ) y pH del medio del que se aislaron las cepas		
	[H <sub>2</sub> S]	[Sulfuro total]	[H <sub>2</sub> S]	[Sulfuro total]	pH
U - Stink	64,9	185,4	1200	1320	6,1
DV-00-5	42	120	145	290	7,0
DV-00-7	20,2	57,7	87	174	7,0
13_1	3,7	10,6	40	800	8,5
WHS-4	107,3	306,5	2200	4900	7,1
O1LH*	87,5	250	38	109	7,2
O1R*	140	400	700	2000	7,2

La cantidad de sulfuro necesaria para inhibir la función del PSII en un 50% se puede usar como indicativo del nivel de tolerancia a este compuesto. La dosis de sulfuro requerida para reducir la función de PSII en un 50% fue ~ 40  $\mu\text{M}$  para la cepa Ma1Vc, ~ 200  $\mu\text{M}$  para Ma1R, ~ 250  $\mu\text{M}$  para O1LH y ~ 400  $\mu\text{M}$  para O1R. Miller y Bebout (2004) compararon la tolerancia del PSII al H<sub>2</sub>S en 12 cepas de cianobacterias (entre ellas, varias cepas de *Oscillatoria*; Tabla II.15) aisladas de diferentes manantiales sulfurosos. Hay que indicar que sus resultados se obtuvieron tras 5 min de exposición a condiciones sulfurosas, y los de este trabajo tras 1 h de incubación. No obstante, se llegó

a un resultado similar: una relación positiva entre la tolerancia mostrada por el PSII y la concentración de sulfuro del medio del que se aislaron las cepas.

La resistencia exhibida por las cepas O1LH y O1R sería parecida a la mostrada por las cepas U-Stink y WHS-4 (Tabla II.15), aisladas de medios con una concentración de sulfuro muy por encima a la de La Hedionda. Sin embargo, la cepa U-Stink (Cohen et al., 1986) es capaz de realizar fotosíntesis anoxigénica. Cohen et al. (1986) señalaron que, en las cianobacterias que realizan fotosíntesis anoxigénica pertenecientes al grupo (iv), el PSII es sensible a concentraciones relativamente bajas de sulfuro. Esto podría explicar que la resistencia del PSII de las cepas O1LH y O1R sea parecida a aquellas aisladas de medios con una concentración de sulfuro mucho mayor, las cuales podrían realizar fotosíntesis anoxigénica. Además, la resistencia de dichas cepas fue mayor que la mostrada por las cepas DV-00-5 y DV-00-7 aisladas de Keane Mine Spring (EEUU), de zonas con 290 y 174  $\mu\text{M}$  sulfuro (Tabla II.15), concentraciones parecidas a la de La Hedionda. Este hecho sugiere que la cepa O1LH posee un PSII con una resistencia relativamente alta al sulfuro teniendo en cuenta el medio del que fue aislada.

En el caso de las cepas O1LH y O1R, el PSII es considerablemente menos sensible a la toxicidad por sulfuro en comparación, también, con poblaciones pertenecientes a la especie *Oscillatoria limnetica*, capaz de realizar fotosíntesis anoxigénica, y cuya fotosíntesis oxigénica se inhibe a concentraciones de sulfuro  $\sim 0,1 - 0,2$  mM (Cohen y Gurevitz, 2006). No obstante, la adaptación al sulfuro basada en la resistencia del PSII suele ser usual en especies dentro del género *Oscillatoria*. Por ejemplo, se han encontrado poblaciones de *Oscillatoria* sp. en aguas termales ricas en sulfuro en Utah (EEUU) y Nueva Zelanda, capaces de realizar fotosíntesis oxigénica incluso en presencia de 2 mM de sulfuro (Cohen et al., 1986). Por otro lado, Dodds y Castenholz (1990) observaron que la resistencia al sulfuro mostrada por una cepa de *Oscillatoria amphigranulata* se debía a que el sitio donador de  $e^-$  del PS II estaba específicamente protegido de la acción dañina del sulfuro. Además, se han aislado poblaciones de *Oscillatoria terebriformis* con este mecanismo de resistencia al sulfuro de aguas termales ricas en este compuesto (Castenholz, 1977; Richardson y Castenholz, 1987). En este sentido, nuestros resultados también contribuyen a sugerir que la presencia de fotosíntesis oxigénica resistente al sulfuro, en lugar de la fotosíntesis anoxigénica, parece ser una estrategia común seguida por poblaciones pertenecientes al género *Oscillatoria*, lo cual les permite sobrevivir en manantiales con aguas oxigenadas y niveles moderados de

sulfuro. Desafortunadamente, el mecanismo de desintoxicación que realizan este tipo de cianobacterias resistentes a concentraciones medianamente altas de sulfuro y sin capacidad de realizar fotosíntesis anoxigénica aún se desconoce (Cohen y Gurevitz, 2006).

Si se comparan los datos de  $ETR_{max}$  de ambas especies en presencia de sulfuro (Tablas II.12 y II.13), se observa que los valores de  $ETR_{max}$  de las dos cepas de *Oscillatoria* fueron más altos que los observados para *M. aeruginosa* (incluso para la cepa resistente Ma1R) a partir de 0,1 mM. Este resultado era de esperar, teniendo en cuenta el diferente comportamiento de los valores de  $F_v/F_m$  de ambas especies en presencia de este compuesto. De ello se puede deducir, con cierta cautela (pues no siempre hay una relación directa entre el flujo de electrones y la producción de oxígeno; Masojídek et al., 2001), que la producción de oxígeno podría mantenerse a concentraciones elevadas de sulfuro (0,1 - 0,4 mM) en el caso de *Oscillatoria*, mientras que en el caso de la cepa Ma1R de *M. aeruginosa* ya estaría inhibida, y aún más en el caso de la cepa Ma1Vc. No obstante, hay que recordar que a 0,4 mM sulfuro no se detectó  $F_v/F_m$  en el caso de la cepa O1LH. A 0,6 mM sulfuro, todavía podría observarse evolución de oxígeno en la cepa O1R de *Oscillatoria*, mientras que estaría completamente inhibida en el caso de ambas cepas de *M. aeruginosa*. Este resultado sería congruente con la bajísima tasa de crecimiento observada a 0,6 mM sulfuro para Ma1R (Fig. II.19) y el crecimiento detectado en la cepa O1R (Fig. II.20) a esta concentración. No obstante, la tasa de crecimiento de la cepa O1R se mantuvo en valores altos a concentraciones superiores a 0,6 mM sulfuro (Fig. II.20). Como se ha comentado previamente, las medidas de fluorescencia y las de crecimiento no serían estrictamente comparables. Sin embargo, el efecto fisiológico observado en experimentos cortos, como las medidas de fluorescencia, siempre puede ser orientativo de los efectos fisiológicos observados a más largo plazo, como el crecimiento celular.

Teniendo en cuenta que la cepa O1LH de *Oscillatoria* se aisló de aguas sulfurosas, se planteó la hipótesis de que esta y la cepa O1R pudieran realizar fotosíntesis anoxigénica. Por ello, se analizó su capacidad para incorporar  $^{14}C$ , así como en las cepas Ma1Vc y Ma1R de *M. aeruginosa* en diferentes condiciones (Tabla II.14). Esta medida se realizó también en ausencia de sulfuro, lo que permitió comparar los valores de fijación de  $CO_2$  y de producción de  $O_2$ . Las tasas de intercambio de  $CO_2$  y  $O_2$  se pueden relacionar a través del cociente fotosintético, o PQ, por sus siglas en inglés *photosynthetic quotient*



(Laws, 1991), que se define como la relación entre la tasa neta de producción de oxígeno y la fijación de carbono en la biomasa. Para hacer este cálculo, se tomaron los valores de TFN referidos por cantidad de clorofila y a  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , pues esta fue la irradiancia más próxima a la utilizada en el caso de las incubaciones para determinar la fijación de  $^{14}\text{C}$ . Hay que indicar que la fuente de luz, aun siendo luz blanca, no fue la misma, dado que la incubación con  $^{14}\text{C}$  se realizó en instalaciones radioprotegidas de los SCAI. Los índices PQ fueron de 0,95 y 1,08 mol  $\text{O}_2$ :mol  $\text{CO}_2$  para las cepas Ma1Vc y Ma1R de *M. aeruginosa*; y 1,02 y 0,82 mol  $\text{O}_2$ :mol  $\text{CO}_2$  para las cepas O1LH y O1R de *Oscillatoria*. Así, los valores se ajustaron a lo esperado, esto es, a valores próximos a 1 (Laws 1991), excepto en el caso de O1R, donde se alejaron ligeramente.

Dado que no se observó fotoincorporación de  $^{14}\text{C}$  a 0,5 mM sulfuro en presencia de DCMU en ninguna de las cepas, se ha de concluir que ninguna tiene la capacidad de realizar fotosíntesis anoxigénica. Este resultado, en el caso de *M. aeruginosa*, era esperable, ya que la mayoría de las cianobacterias son fotótrofos oxigénicos obligados (Cohen et al., 1986). La fotosíntesis oxigénica de Ma1Vc y Ma1R se inhibió completamente en presencia de 0,5 mM sulfuro, aunque algo menos en el caso de la cepa Ma1R. Esto es congruente con la inhibición total observada en los valores de  $F_v/F_m$  y ETR de la cepa Ma1Vc a 0,4 mM, y la disminución algo menor en el caso de la cepa Ma1R. Así, se concluye que ambas cepas poseen un PSII sensible a bajas concentraciones de sulfuro, y se englobarían en el grupo (i) de Cohen et al. (1986). En este grupo de cianobacterias, bajas concentraciones de  $\text{H}_2\text{S}$  (10 - 50  $\mu\text{M}$ ), equivalentes a  $\sim 30 - 140 \mu\text{M}$  de sulfuro total (considerando un pH de 7,2 y 20 °C) inducen el bloqueo de la fotoasimilación de  $\text{CO}_2$  (Cohen et al., 1986).

Sin embargo, en presencia de 0,5 mM sulfuro, las cepas de *Oscillatoria* O1LH y O1R pudieron llevar a cabo aproximadamente un 33 y 31% del valor de fotosíntesis observado en ausencia de sulfuro, mostrando fotosíntesis oxigénica parcialmente resistente. Esta tolerancia es inferior a la encontrada en una cepa de *Oscillatoria* aislada de Wilbur Hot Springs (California, EEUU), en la que la fotosíntesis oxigénica se mantuvo en un 70% con respecto al control sin sulfuro a esta misma concentración, y que presentó fotosíntesis oxigénica resistente a concentraciones de hasta 0,35 mM  $\text{H}_2\text{S}$ , es decir,  $\sim 1$  mM sulfuro total (Cohen et al., 1986). No obstante, es mayor a la observada en una cepa de *Oscillatoria* aislada de River Dee (UK) (Howsley y Pearson, 1979), en la que la fotosíntesis se inhibió un 50% a 100  $\mu\text{M}$  sulfuro. Por otra parte, el efecto observado es

congruente con la disminución de  $F_v/F_m$  y  $ETR_{max}$  en la cepa O1R en el rango 0,4 y 0,6 mM sulfuro (Tablas II.11 y II.13), pero con el mantenimiento en valores relativos altos de  $F_v/F_m$  en relación con las cepas de *M. aeruginosa* (Fig. II.24). Si comparamos el valor de fijación de carbono observado a 0,5 mM sulfuro en el caso de la cepa O1LH, no resulta congruente el obtenido para  $F_v/F_m$  y ETR a 0,4 y 0,6 mM de sulfuro, ya que fueron indetectables (Tablas II.11 y II.13). Es decir, esto no puede deberse a una inhibición total de la actividad del PSII en esta cepa, si no quizá, como se ha comentado antes, a un problema en la medida de  $F_v/F_m$ . La resistencia parcial del PSII de las cepas de *Oscillatoria* a 0,5 mM sulfuro coincide con el resultado hallado en *Oscillatoria terebriformis* aislada de un manantial de sulfuro en Hunter's Hot Springs (Oregón, EEUU), que también se describió como una cepa resistente al sulfuro, pero incapaz de realizar fotosíntesis anoxigénica (Castenholz, 1977). Así, ambas cepas de *Oscillatoria*, O1LH y O1R, podrían incluirse en el grupo (ii) de Cohen et al. (1986), en el cual la fotosíntesis oxigénica sigue funcionando en presencia de 0,2 - 0,3 mM H<sub>2</sub>S (equivalentes a ~ 0,57 - 0,85 mM sulfuro total a pH 7,2) debido a la tolerancia del PSII, pero son incapaces de realizar fotosíntesis anoxigénica. Este resultado es bastante relevante, ya que se ha considerado que la tolerancia de la fotosíntesis oxigénica al sulfuro en cianobacterias puede ser considerablemente más importante, ecológicamente hablando, que la capacidad de utilizar sulfuro como donante de e<sup>-</sup> (Howsley y Pearson, 1979). Teniendo en cuenta la toxicidad del sulfuro en el metabolismo celular, la continuidad de la fotosíntesis oxigénica también sería beneficiosa en este tipo de cepas, al proporcionar oxígeno adicional para la eliminación oxidativa del sulfuro del medio (Howsley y Pearson, 1979). Además, Cohen et al. (1986) concluyeron que el sulfuro es, incluso, esencial para el funcionamiento de la fotosíntesis oxigénica en este grupo (ii), lo cual coincide con el mantenimiento de los valores de  $F_v/F_m$  en presencia de sulfuro en estas cepas (Fig. II.24) y con los mayores valores de crecimiento en presencia que en ausencia de sulfuro (Fig. II.20). Además, puesto que las cepas O1LH y O1R no mostraron diferencias significativas entre sus parámetros fotosintéticos, cabe suponer que las dos cepas poseen el mismo tipo de resistencia del PSII ante condiciones sulfurosas. Como se ha comentado antes, el sulfuro induce un aumento de la tasa de crecimiento en ambas cepas, en un rango de concentraciones que van hasta 0,35 mM en el caso de la cepa silvestre O1LH, y hasta 1,6 mM en el caso de la cepa resistente O1LH (Fig. II.20). Sin embargo, la mayor tasa de crecimiento de O1R a altas concentraciones de sulfuro,

sugiere que su proceso de aclimatación estaría relacionado con otros aspectos del metabolismo o la fisiología celular.

#### II.4.4. Aspectos eco-evolutivos de la resistencia al sulfuro en *Oscillatoria*

A pesar de su papel crucial en el GEO y la formación de la atmósfera, las cianobacterias persistieron en ambientes pobres en oxígeno y/o sulfhídricos durante gran parte de la historia de la Tierra (Hamilton et al., 2016). Actualmente, a menudo se observan poblaciones de cianobacterias en lagos euxínicos (Melak y Kilham, 1974; Cohen et al., 1975a; 1986). La resistencia al sulfuro (bien a través de la resistencia del PSII, de su uso como donante de  $e^-$ , o ambas) es un rasgo que se ha adquirido varias veces, de manera independiente, a lo largo de la historia evolutiva de este grupo (Miller y Bebout, 2004; Sánchez-Baracaldo et al., 2005). El patrón filogenético del uso de sulfuro (en grupos dispersos, en los extremos del árbol filogenético) sugiere que este rasgo se ha incorporado en varios taxones de cianobacterias no relacionados (Sánchez-Baracaldo et al., 2005). Este hecho explicaría las diferentes estrategias para sobrevivir a ambientes sulfurosos previamente identificadas por Cohen et al. (1986). Así, la resistencia a este compuesto sería un rasgo adquirido, a diferencia de la fotosíntesis oxigénica, que se ha confirmado como ancestral (Miller y Bebout, 2004; Sánchez-Baracaldo et al., 2005).

El hecho de que una cepa del género *Oscillatoria* sea la cianobacteria dominante en un manantial sulfuroso como el de La Hedionda, gracias a la resistencia del PSII, coincide con lo que ya se había descrito para otras cepas del género (Oren, 1978; Belkin y Padan, 1983; Miller y Bebout, 2004; Myers y Richardson, 2009; Grim y Dick, 2016); aunque se han descrito especies del género *Oscillatoria* capaces de realizar fotosíntesis anoxigénica (Cohen et al., 1975a, b; Jørgensen et al., 1986; de Wit y van Gemerden, 1987; Castenholz et al., 1991; Voorhies et al., 2012). De hecho, en aguas ricas en sulfuro, los tapetes microbianos suelen contener especies del género *Oscillatoria*, que o bien tienen fotosíntesis oxigénica tolerante al sulfuro, o bien lo utilizan como donador de  $e^-$  (Ward et al., 1992). Castenholz (1976, 1977), además, sugiere que el sulfuro actúa como principal agente selectivo en las poblaciones que habitan las aguas termales de sulfuro, donde predominan las cianobacterias filamentosas que carecen de heterocistes, en particular, *Oscillatoria* y *Spirulina*.



Este resultado coincide con lo observado en La Hedionda, donde la cianobacteria predominante es *Oscillatoria* sp. y su abundancia se correlaciona con los niveles de sulfuro del medio (Reul et al., 2020). Es decir, en el período de verano se detecta una mayor abundancia de *Oscillatoria* y mayores niveles de sulfuro que en el período de invierno, que destacó por ser pobre en sulfuro y en abundancia de esta cianobacteria. Esta baja concentración de sulfuro podría estar relacionada con una dilución de su concentración debido a la recarga del acuífero a través de la precipitación en invierno y primavera (Reul et al., 2020). Por su parte, la baja concentración de *Oscillatoria* observada durante el período con bajos niveles de sulfuro podría deberse a una mayor pérdida de filamentos por la escorrentía de agua, que puede llegar a tener un caudal de  $\sim 110 - 135 \text{ L s}^{-1}$  (Jiménez-Sánchez et al., 2011). Sin embargo, la pérdida de microorganismos por escorrentía afectaría a todos los grupos planctónicos de manera similar, pero estudios paralelos a los realizados en esta Tesis indican que los otros grupos permanecieron en concentraciones similares durante todo el año, no observándose diferencias significativas entre el verano y el invierno (Reul et al., 2020). Por lo tanto, otros factores diferentes a la escorrentía deberían ser los responsables del ciclo de abundancia de *Oscillatoria*. Además, y aunque se ha indicado que podría haber una limitación de crecimiento de *Oscillatoria* por P, Reul et al. (2020) realizaron un análisis estadístico GAM por el que descartaron la influencia del nivel de este nutriente sobre la concentración de *Oscillatoria* y, sin embargo, se determinó que el sulfuro modulaba la concentración de *Oscillatoria* (Reul et al., 2020). En concreto, se observó que los valores más altos de concentración de *Oscillatoria* se daban en el rango  $100 - 150 \mu\text{M}$  de sulfuro (Fig. II.11; Reul et al., 2020). Sin embargo, nuestros análisis en el laboratorio muestran un máximo de crecimiento de la cepa O1LH entre  $100 - 350 \mu\text{M}$  de sulfuro. Se ha de tener en cuenta que, en el ALH, la concentración de sulfuro se mantiene bastante estable, ya que el aporte de sulfuro desde la surgencia a los baños es prácticamente constante y permanente en el tiempo (Jiménez-Sánchez et al., 2011). No obstante, los valores de crecimiento se obtuvieron en experimentos en los que se realizaron adiciones diarias de sulfuro, es decir, la concentración de sulfuro no era constante. Por ello, el nivel de sulfuro óptimo para el crecimiento de *Oscillatoria* podría estar sobreestimado. Aun así, las observaciones en el laboratorio y en el medio natural coinciden en el hecho de que el aumento de la concentración de sulfuro se correlaciona con un aumento en el crecimiento de *Oscillatoria*.

La cepa O1LH por tanto está adaptada para proliferar a los niveles de sulfuro presentes en el ALH. Desde un punto de vista evolutivo, varios estudios han concluido que la tolerancia al sulfuro es un rasgo dinámico que puede adquirirse(o desaparecer) en cianobacterias en respuesta a cambios en el sulfuro ambiental (Miller y Bebout, 2004; Sánchez-Baracaldo et al., 2015) y que el nivel de tolerancia está correlacionado con los niveles de sulfuro presentes donde habitan las cianobacterias (Miller y Bebout, 2004). Por ello, el rango de concentración de sulfuro óptimo al que están adaptadas actualmente las poblaciones de *Oscillatoria* en el ALH podría variar ante un cambio permanente en la concentración de sulfuro. De hecho, ha sido posible observar en el laboratorio cómo esta especie es capaz de aclimatarse a niveles más elevados de sulfuro, pues la cepa O1R es capaz de mantener una tasa de crecimiento elevada hasta niveles próximos a 1.5 mM sulfuro. Considerando los estudios filogenéticos mencionados sería posible que esta mayor tolerancia pudiera quedar fijada en la población por un proceso de adaptación a presiones de selección más elevadas de sulfuro.

#### II.4.5. Conclusiones

Las cepas silvestres de *M. aeruginosa* y *Oscillatoria* mostraron diferente tolerancia al efecto tóxico del sulfuro, de acuerdo con los niveles de sulfuro en el ambiente de los cuales se aisló cada cepa (Miller y Bebout, 2004). Sin embargo, y a pesar de su alta sensibilidad, poblaciones de *M. aeruginosa* pudieron adaptarse a los niveles de sulfuro, en principio letales, del ALH. Así, las células resistentes al ALH surgieron antes de la exposición al agente selectivo por mutaciones espontáneas, en lugar de por aclimatación. Ahora bien, la tolerancia al sulfuro en las cepas de *M. aeruginosa* aumentó entre cuatro y dos veces la inicial en el caso de las cepas Ma1Vc y Ma5Vc, respectivamente, a través de un proceso de adaptación. Sin embargo, la cepa MaAVc solo aumentó ligeramente su nivel de tolerancia inicial a través de un proceso de aclimatación. Por otro lado, la cepa O1LH de *Oscillatoria*, como se esperaba, desarrolló una mayor tolerancia al sulfuro en comparación con las cepas de *M. aeruginosa*, pudiendo aclimatarse hasta 2 mM sulfuro, la concentración más alta probada.

La probabilidad de ocurrencia de eventos de RE en *M. aeruginosa* depende tanto de la variación genética como de la tasa de deterioro, siendo el efecto de la primera mayor que

el de la segunda. Así, una alta variación genética en las poblaciones de *M. aeruginosa* podría ser suficiente para superar el estrés por sulfuro en el rango de concentraciones de sulfuro examinado, y bajo cualquier velocidad de cambio ambiental. Sin embargo, en situaciones en las que variación genética fuese pequeña, tasas de deterioro rápidas disminuirían la probabilidad de RE en *M. aeruginosa*.

En el caso de *M. aeruginosa*, las cepas resistentes adaptadas a la mayor concentración de sulfuro experimentaron un coste fisiológico derivado de su resistencia, con una menor tasa de crecimiento en ausencia de sulfuro, una menor tasa fotosintética por célula, un menor tamaño y un menor contenido de pigmentos liposolubles. De este modo, estas cepas resistentes al sulfuro serían desplazadas por el genotipo silvestre mediante selección natural en situaciones sin agente selectivo.

El mecanismo de tolerancia de la cepa resistente de *M. aeruginosa* parece estar relacionado con la tolerancia del PSII hasta 0,1 mM sulfuro. A concentraciones moderadas (0,1 - 0,4 mM sulfuro) otros mecanismos de resistencia diferentes a la tolerancia del PSII estarían actuando, permitiendo a esta cepa crecer a dichas concentraciones. La cepa resistente de *Oscillatoria*, así como la cepa silvestre, parecen poseer el mismo mecanismo de tolerancia al sulfuro, basado en la resistencia del PSII a concentraciones moderadas de este compuesto, teniendo en cuenta que ninguna de estas cepas mostró capacidad de realizar fotosíntesis anoxigénica en presencia de sulfuro. De hecho, en estas cepas, la presencia de sulfuro favorece el crecimiento, coincidiendo con el hecho de que las poblaciones silvestres de *Oscillatoria* aumenten su abundancia en La Hedionda cuando este manantial presenta concentraciones altas de sulfuro.

Los enfoques de evolución experimental empleados en esta Tesis han permitido explorar los mecanismos de adaptación al sulfuro y las limitaciones de este proceso en dos taxones representativos de cianobacterias. Otros estudios, que involucren más linajes de cianobacterias, podrían clarificar cómo ha podido evolucionar la tolerancia al sulfuro en este tipo de microorganismos. Por otra parte, aunque se ha podido arrojar luz sobre la tolerancia del PSII al sulfuro, otros cambios fisiológicos (contenido en pigmentos fotosintéticos, y en C y N, etc) y morfológicos observados en las cepas resistentes pueden ser indicativos de otros mecanismos celulares implicados en la tolerancia, que requerirían estudios adicionales para analizar su posible implicación en este proceso.

**CHAPTER III. ANALYSIS OF THE  
UNICELLULARITY - MULTICELLULARITY  
TRANSITION ON THE BUDDING YEAST  
*KLUYVEROMYCES LACTIS***

---



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



## III.1. INTRODUCTION

### III.1.1. Major transitions events in evolution

During the history of life, there have been several key events that have altered the evolution of life itself. These include the evolution of cells from solitary replicators, eukaryotes from prokaryotes, and multicellular organisms from unicellular ancestors. Maynard-Smith & Szathmary (1995) named several of these pivotal events as the ‘major evolutionary transitions’ (MET): evolutionary innovations that implied a new level of biological organization and permitted the evolution of more complex organisms. While there is no theoretical reason to expect an inexorable evolutionary trend towards complexity, the Earth has been repeatedly transformed by the origins, evolution, and diversification of increasingly complex lineages. In this sense, the origin of multicellularity has been recognized as one of the METs (Buss, 1987; Maynard-Smith & Szathmary, 1995; Queller, 2000). This is because the inter-dependence among cells, in a multicellular organism, is so complete that the basic properties of the organism are only expressed as a collective, which therefore constitutes a new level of biological organization (Maynard-Smith & Szathmary, 1995; Fisher & Cornwallis, 2013).

Most of the Earth’s ecosystems have been colonized by multicellular organisms, particularly animals, fungi, and plants. The origins of multicellularity posed new evolutionary challenges, such as the increase in size and the need for inter-cellular collaboration that concurrently created new ecological opportunities. As Bonner (1998) said, “*the size increase came first, and the possible advantages that this change might provide would follow*”. Unlike in other METs, multicellular organisms have evolved *de novo* independently and repeatedly, at least 25 times (Buss, 1987; Bonner, 1998, 2000; Cavalier-Smith, 1991; Kaiser, 2001; Maynard-Smith & Szathmary, 1995; Carroll, 2001; Medina et al., 2003). Multicellularity changed the course of life itself, and created new situations which organisms had to lead with, such the need for intercellular collaboration, communication and the division of labor. However, how multicellularity originated remains uncertain.

#### III.1.2. The origin of multicellularity

A central question in the transition from single cells to multicellular organisms is: why Darwinian natural selection among cells did not interrupt the integrity of the group? In most complex multicellular organisms, for example, individual somatic cells lack the capacity to grow independently. This can be explained as a product of evolution at the organismal level, as unrestrained cellular proliferation, such as in cancer, can easily undermine the functioning of multicellular organisms. The very first steps in the evolution of multicellularity are likely to be the most unstable since there would be few barriers to the reversal to unicellularity. Thus, identifying the mechanisms that initially led to the evolution of multicellularity can help us understand what prevents reversal.

Van Gestel & Tarnita (2017) distinguish between two situations that could favor the appearance and maintenance of the first group of multicellular organisms: a change in the environment or a mutation. Both circumstances affect the mechanism involved in the origin of the first groups of multicellular organisms, but would not affect to the selective pressures that might favor or limit the formation of such groups. Assuming that the change on the environmental conditions came first, ecological fluctuations (biotic or abiotic) would act on preexisting cells, leading to the formation of a multicellular cluster (West-Eberhard, 1989; Wolpert, 1994). This scenario could happen if, for example, the preexisting cells were exposed to some unexpected environmental conditions, where several proteins involved on cell adhesion were overexpressed, promoting cell connections and group formation (Gestel & Tarnita, 2017). In this situation, an ecological change would be responsible for starting group formation from a unicellular ancestor, through the overexpression or a plastic response of the preexisting genes. In this situation, this ecological change should persist long enough to maintain the group formation across generations.

In the 'genes first' scenario, multicellularity arises from a genetic change in the same ecological context. It could happen, for example, due to a mutation that blocked some genes involved in the hydrolyzation of the cell wall during mitosis (Kuranda & Robbins, 1991). In this case, cells would remain attached and together after cell division, eventually forming a multicellular cluster, which could grow, fragment and form a group of incipient multicellular organisms (Koschwanez et al., 2013; Gestel & Tarnita, 2017). The environmental circumstances could be important on this scenario as well, if the

mutation could be influenced by the environment. For example, Chai et al. (2010) discovered an epigenetic regulation of the transcription of genes involved in cell separation and motility during growth of *Bacillus subtilis*, through the expression of hydrolyzing proteins. Although in this scenario, environmental fluctuations are not directly triggering the origin of the first multicellular organisms, the ecological conditions on the field could be crucial for the development and maintenance of the incipient multicellular stage.

Following Bonner (1998), Queller (2000), Tarnita et al., (2013) and Driscoll & Travisano (2017), we can also distinguish between two different mechanisms regarding the formation of primary cell clusters. In one mechanism, cells can stay together (ST) due to an unfinished cell separation after mitosis, leading to the formation of a cluster where cells tend to be genetically identical. This ST situation could arise through many mechanisms: cells can have an imperfect cytokinesis, so the cell wall of both daughter cells would keep attached (Kuranda & Robbins, 1991); a daughter cell could be surrounded by the mother cell during cell division (Angert, 2005), or cells could experience complete cell division, persisting attached due to the action of adhesive proteins (Berk et al., 2012). Alternatively, pre-existing cells might form an incipient and genetically diverse cluster by coming together (CT, West-Eberhard, 1989; Wolpert, 1994; Gestel & Tarnita, 2017). Coming together (also known as ‘aggregative development’) can occur when unrelated cells aggregate via chemotaxis, and end up sharing a common surface (Loomis, 2014; Hölscher et al., 2015), or simply bind among other surrounding cells (Sathe & Durand, 2016). While cells in groups formed via ST are inevitably clonal, those in groups formed via CT can vary substantially in their degree of genetic similarity (Gestel & Tarnita, 2017). Furthermore, both ST and CT mechanisms could have occurred simultaneously, since a group of cells could aggregate and form an incipient group before experiencing cell division without a complete cytokinesis (Hölscher et al., 2015; Nadel et al., 2016). Bonner (1998) also pointed out that on aquatic environments, multicellularity could arise via ST, whereas in a terrestrial context it would more probably evolve through CT. He claimed that the physics of the environment (for example, a lack of places that could maintain incipient aggregative clusters in marine systems) could limit the way multicellular organisms emerged.

During the formation of multicellular groups, where an incipient cooperation is being established, it is possible that single cells persist inside the groups. On one hand, a high



genetic diversity within a group could promote competition, encouraging the appearance of “cheaters”: cells that take advantage of the benefit that ensues from being part of a group, without reciprocating (Sachs et al., 2004). In the absence of mechanisms that ensure the persistence of the group, cheaters may succeed and compromise the integrity of the group (Wade & Breden, 1980; Nunnery, 1985; Michod, 1996; Santorelli, 2008). Nevertheless, cooperation among non-relatives could also allow the persistence of fast-growing unicellular lineages of ‘free-riders’ (Driscoll & Travisano, 2017). It has also been observed that the benefits of cooperation among multicellular clusters could be extended to unicellular “free-riders”, supporting stable coexistence without compromising the stability of the group (Driscoll & Travisano, 2017). Furthermore, it has been proposed that single cells can also display positive metabolic interactions via exchanging metabolites that increase the growth of both sides (Pande et al., 2015). In clonal groups developed by a single genotype, cells can also show a variety of collaborations as well (Furusawa & Kaneko, 1998), including cooperative interactions (Koschwanez et al., 2013) and complementarity through phenotypic heterogeneity (different cell responses to local environmental changes; Stewart & Franklin, 2008).

It should be considered that the evolution of an incipient multicellular lineage towards increasing complexity depends on solutions to the dilemma of cooperation (Sachs, 2008). Cooperation is indispensable for the evolution of multicellularity, because cheaters could potentially hinder the benefits of multicellular life (Rainey & Rainey, 2003; Velicer & Yuen-Tsu, 2003; Sachs et al., 2004). For this reason, Michod (2006) identified cooperation as the principal factor behind the enhancement of complexity throughout the formation of new categories of individuals through MET.

On the other hand, some studies have analysed the genetic heritage of the multicellular trait. Ruiz-Trillo et al. (2007) postulated that most of the genes involved in the adhesion, differentiation, and communication among cells probably were already present before the origin of the first multicellular clusters. Besides, the majority of the key regulatory and signaling genes that presumably arose during the origin of multicellular organisms are conserved through the Metazoa supergroup (Ruiz-Trillo et al., 2007). It has been postulated that most of the structural molecules involved in cell and tissue organization, as well as the extracellular matrix proteins, are distributed quite uniformly in all metazoans (Technau, et al., 2005; Ruiz-Trillo et al., 2007). In any case, identifying common genes to all members of the multicellular group might provide limited insight on

the evolutionary origin, because the multiplicity of independent origins strongly suggests that different genes were involved in the first steps (Sebé-Pedrós et al., 2018). Therefore, some of the shared genes within Metazoa may simply indicate shared ancestry, rather than sufficiency for the origin of multicellularity.

#### III.1.4. The opportunity of evolutionary reversal to unicellularity

Multicellularity provides several benefits, like division of labor (Michod, 2007) and reduction of predation (Maynard-Smith & Szathmary, 1995). The evolution of increased complexity and the formation of multicellular collectives from single cells involve such extensive genetic changes that the reversion of this trait could be improbable (Muller, 1939; Bull & Charnov, 1985; Rebolleda-Gómez & Travisano, 2018, 2019). More generally, every adaptive change may tend to constrain the directions of future evolutionary transformations (Dobzhansky, 1970; Gould, 2002; Zufall & Rausher, 2004; Rebolleda-Gómez & Travisano 2018). In this sense, Dollo's law states that the loss of a character from a population is irreversible (Gould, 1970; Bull & Charnov, 1985). One possible explanation for the impossibility of many reversals in evolution, and the reversion to unicellularity from a multicellular ancestor in particular, is that major changes in a population use to involve multiple gene modifications (Gould, 1970; Bull & Charnov, 1985). In this sense, multiple genes of a network could be inactivated or mutated to develop new functions; but these changes make a character reversion highly unlikely, as numerous concurrent mutations would be required (Bull & Charnov, 1985).

Although there may be ecological situations that favor reversal, such as some phenotypic transitions that have been documented by phylogenetic analyses (Zufall & Rausher, 2004), like intracellular conflict and competition (Michod 1997; Rebolleda-Gómez & Travisano 2018), or cancer (Aktipis et al., 2015; Chen et al., 2015; Tabassum & Polyak, 2015), little is known about what causes this phenomenon. In cancer, for example, it has been described that a tumor can develop single cancer cells that could transfer from one individual to another (Rebeck et al., 2009; Metzger et al., 2015, 2016; Pye et al., 2016), even among individuals belonging to different, but related, species (Yonemitsu et al., 2019). In this sense, we find the study of the multicellular achievement

from a reversion approach an interesting and remarkable way to disentangle the first steps towards multicellularity.

#### III.1.5. An experimental perspective on the origin and reversion of multicellularity

Experimental evolution allows us to observe the evolution of multicellular lineages from unicellular ancestors in laboratory populations, improving our understanding of how multicellularity first evolved in nature. This approach has been followed previously using yeast as a model organism (Ratcliff et al., 2012; Driscoll & Travisano, 2017; Rebolleda-Gómez & Travisano, 2018, 2019). Yeasts are single-celled fungi and belong to the eukaryotic group Opisthokonta, providing an excellent evolutionary framework to work on the origin and reversal of the first multicellular organisms (Ruiz-Trillo et al., 2007). The opisthokonts include Metazoa and Fungi, two of the most conspicuous kingdoms on the Earth, as well as countless unicellular lineages. All members of this group share a single-celled common ancestor (Ruiz-Trillo et al., 2007). The first studies using this experimental evolution approach were performed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Ratcliff et al., 2012, 2013; Rebolleda-Gómez et al., 2012; Pentz et al., 2014; Ratcliff & Travisano, 2014). Later, Driscoll & Travisano (2017) used the budding yeast *Kluyveromyces lactis* instead *S. cerevisiae*. Although both yeasts quickly evolve multicellular cluster formation from unicellular cultures, Driscoll & Travisano (2017) observed several unique outcomes in *K. lactis* populations.

Settling selection, leading to the preferential survival of larger particles, has been used as a proxy to evolve multicellularity in the laboratory (Ratcliff et al., 2012; Driscoll & Travisano, 2017). The multicellular phenotype obtained through settling selection was named as ‘snowflake’ cluster (Driscoll & Travisano, 2017), a common name given to multicellular yeasts because of its shape. The snowflake morphology describes a cluster of cells that result from incomplete cell division between mother and daughter cells (Driscoll & Travisano, 2017). However, experimental studies have been mainly focused on the appearance of multicellularity, rather on their maintenance. In this sense, it is possible to simulate in the laboratory different types of selection, against or in favor of the development of “snowflake” morphotypes, which is known to affect the achievement of multicellularity (Driscoll & Travisano, 2017; Rebolleda-Gómez & Travisano, 2019).



On the other hand, it is also possible to find populations with different degree of genetic variability. This factor is interesting to analyze since it has been proposed that the degree of genetic relatedness between individuals played an important role in the evolutionary transition from single-cells to multicellular organisms (Hamilton, 1964; Leigh, 1995; Maynard-Smith & Szathmary, 1995; Michod, 1997; Queller, 2000; Boomsma, 2007, 2009, 2013; Bourke, 2011; Muraille, 2018). Finally, it is also possible to determine the contribution of selection to the persistence of unicellular lineages in competition with multicellular competitors (Driscoll & Travisano, 2017), testing the capacity of each phenotype (uni- and multicellular) to colonize a foreign landscape (mainly composed by the opposite phenotype) under favorable selection.

The general objective of this work is, then, to analyze, using an experimental evolution approach, the emergence and maintenance of multicellularity from the point of view of the character reversal, using *K. lactis* as model organism. We hypothesize that whereas the gain of multicellularity from unicellular ancestors should not be a simple process, it must be a more parsimonious route than the opposite one, i.e., the reversal to unicellularity. This could be explained because when multicellularity is gained on a lineage, the reversal to unicellularity is unlikely due to the numerous genetic dependencies (Gould, 1970). Indeed, Zufall & Rausher (2004) stated that the selective history of an intricate trait might prevent from successive reversals. Nevertheless, the accumulation of neutral mutations could help to the reversal to single cells in environments where multicellularity is not intensely favored (Rebolleda-Gómez & Travisano, 2018). To test our hypothesis, we conducted selection experiments to favor or to prevent multicellularity, as well as competition assays among morphotypes. Several questions are addressed: what are the evolutionary conditions, depending on selective pressure and genetic diversity, favoring the degeneration of multicellular clusters? Is the selective pressure a force strong enough to maintain multicellularity? Which is the potential role of local competition on the maintenance of multicellularity?

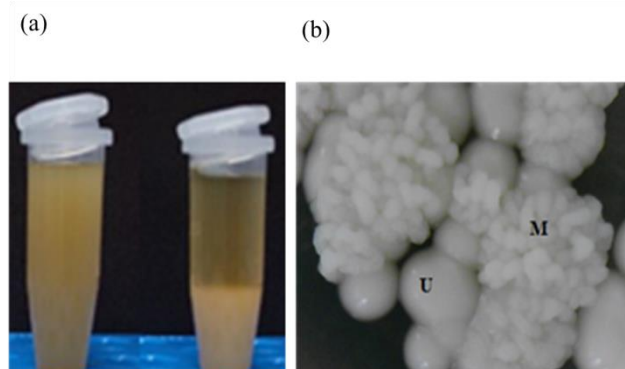
Specifically, the objectives of this work are the following:

1. To analyse the effect of different types of selective pressure and different levels of genetic diversity, and their interaction, on the achievement and loss of multicellularity in *K. lactis*.
2. To study the effect of competition between unicellular and multicellular morphotypes of *K. lactis* on the gain and loss of the multicellular character.

## III.2. MATERIAL AND METHODS

### III.2.1. Strains characteristics and culture conditions

We used *K. lactis* budding yeast, a species studied previously in Driscoll & Travisano (2017). Although *K. lactis* is separated from *Saccharomyces cerevisiae* by ~ 100 million years of evolution (Dujon et al., 2004), they both have the capacity to develop multicellular (snowflakes) morphotypes from unicellular cultures (Ratcliff et al., 2012; Driscoll & Travisano, 2017; Rebolleda-Gómez & Travisano, 2018, 2019). We used the isogenic *K. lactis* strain Y8 provided by the University of Minnesota (USA), which descends from a 60<sup>th</sup> transfer isolated population from the *K. lactis* strain NRLY-1140 (ATCC 8585). The strain used here has two morphotypes: unicellular (unicells) and multicellular (snowflakes). Both morphotypes were described by Driscoll & Travisano (2017) and are descendants from the same unicellular ancestor.

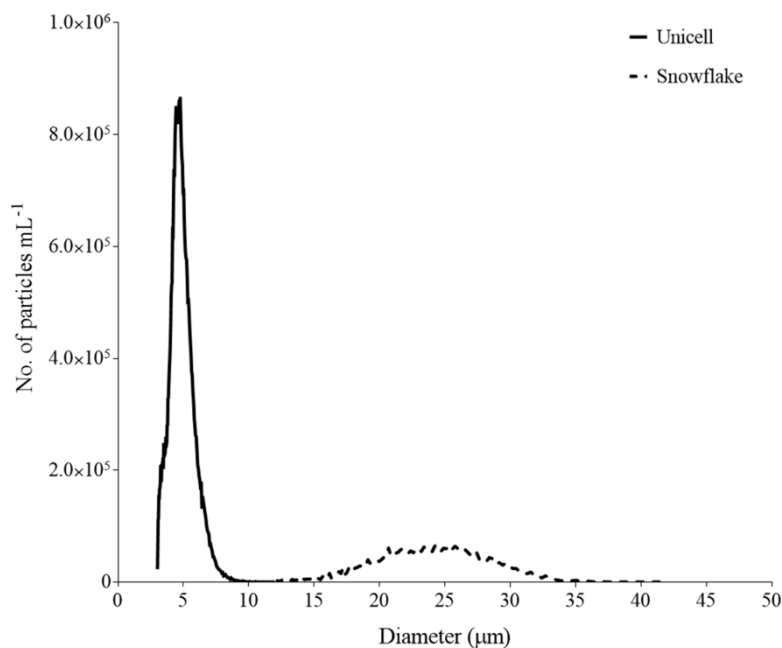


**Fig. III.1** Visual comparison of (a) overnight subcultures of unicellular (left) and multicellular (snowflake, right) isolates after 7 minutes settling in 1.5 mL tubes; and (b) different colony morphology: single cells form a smooth, brilliant colony (U), whereas multicellular clusters build a wrinkled, opaque and bigger colony (M).

Unicells and snowflake morphotypes, which we called ‘ancestors’ in our experiments, have important differences, which make *K. lactis* Y8 an interesting strain (Driscoll & Travisano, 2017). On one hand, unicells and snowflakes displayed different features on liquid cultures when settling. While the unicellular morphotype remained quite uniform after 7 minutes settling, multicellular cultures formed a pellet after settling, whereas the liquid fraction remained clear (i.e., snowflakes tended to deposit; Fig. III.1a). Besides,

when plating in a Petri dish, morphotypes show differences: single cells build a smooth, brilliant colony, whereas multicellular clusters build a wrinkled, opaque and bigger colony (Fig. III.1.b). Finally, while single cells show a coccoid shape, multicellular clusters show the characteristic “snowflake” shape, which was rough and bigger compared with single cells.

In addition, cultures of each morphotype showed a different particle size when analyzed with a coulter counter (see below). Differences between the two populations are shown in Fig. III.2. A representative unicellular population presented a peak on particles whose diameter was around 6  $\mu\text{m}$ , i. e., single cells (Fig. III.2). However, snowflake populations showed a Gaussian bell curve among sizes from  $\sim 15 - 35 \mu\text{m}$ . If the diameter spectrum is divided into 3 subzones, 3 - 9, 9 - 15 and 15 - 35  $\mu\text{m}$ , we observed a percentage of particles distribution of  $\sim 99.91$ , 0.07 and 0.01% on the ancestral unicell population, and  $\sim 8.82$ , 3.47, and 87.70% on the snowflake ancestral population. These percentages correspond to the proportion of particles belonging to each size range among the total particles within a culture.



**Fig. III.2** Size distribution of unicell and snowflake morphotypes in *K. lactis* Y8 strain.

Cultures were grown in 10 mL liquid medium culture composed by yeast extract–peptone–dextrose (YPD, 1% yeast extract, 2% peptone and 2% dextrose) in 25 mm  $\times$  150

mm glass culture vials, or YPD agar 15% when plating in Petri dishes. Cultures were incubated at 30 °C, dark and shaking at 250 rpm on a heater. Every day, culture transfers were made as follows: 100 µL of the preexisting culture was transferred to a new tube containing 10 mL of fresh media. Every fifth transfer, 700 µL of each population were put in glycerol (15%) and frozen at - 80 °C in order to maintain and monitor samples of every population along time.

To follow the evolution of cultures along the experiments (which lasted 15 d each), an aliquot of every tube was observed every day on an optic microscope (Nikon ECLIPSE CI-L, USA) and, several times along the experiments, populations were plated in agar in Petri dishes in order to measure the proportion of both unicellular and multicellular colony-forming units (CFUs, Fig III.1b). Using this procedure, we calculated the percentage of snowflakes and unicells within every replicate, establishing a percentage of morphotypes on a culture. For that purpose, on a laminar flow hood, cultures were diluted in double distilled H<sub>2</sub>O (ddH<sub>2</sub>O) previous vortexing and spotting (10 µL per spot) on YPD agar plates (for a total of 10 spots per dish). Driscoll & Travisano (2017) followed this protocol in order to enumerate population densities and relative frequencies of different morphotypes. Then, in order to remove the liquid of the spots, plates were placed opened on the sterile hood for 10 - 20 min, to ensure an even distribution of CFUs in the reasonably small spots. Colonies were counted after 24 h of growth at room temperature on relatively dry plates using a dissection microscope. As explained before, it was agreed that ‘smooth’ colonies were produced by unicells, whereas multicellular ‘snowflake’ clusters formed wrinkled colonies (Fig. III.1b).

In addition, every five days, we measured the size population composition (Fig. III.2) using a Multisizer 4e Coulter counter (Beckman Coulter, Indianapolis, USA). The Mutisizer principle states that when a cell surpasses an aperture, the aperture decreases its electrical conductivity as much as the cell volume (Coulter, 1956). For that purpose, a 100 µL aliquot of every culture was diluted on 10 mL of ddH<sub>2</sub>O and placed on a test tube-like structure. Thus, particles are driven via negative pressure from the beaker into the instrument in order to measure the particle size. After that, a distribution of the clusters volume within the sample was obtained.



### III.2.2. Experimental design

#### III.2.2.1. Effect of selection pressure and genetic diversity on the transition towards multicellularity and its reversal

To understand the contingency of the appearance and reversal of multicellularity, several experiments of directional selection have been performed. Thus, we evaluated the roles of the genetic diversity within a population and the selection pressure in the achievement and loss of multicellularity. We investigated different eco-evolutionary scenarios in order to test both the capacity and rates of gain and loss of snowflake multicellularity in *K. lactis*. To assess differences between morphologies, every protocol was tested on unicell and snowflake cultures at the same time. The eco-evolutionary scenarios differed in the genetic diversity of initial inocula at time  $t_0$ , and in the procedure followed before taking the 100  $\mu\text{L}$  aliquots used for transfers every 24 h, i. e., the selective pressure. Regarding the selective pressure, three different protocols were applied to mimic three types of selection (Fig. III.3): (i) selection for size increment through bottom selection (size +), i.e. for multicellularity; (ii) selection for size decrement through top selection (size -), i. e. for unicellularity; (iii) no or relaxed selection (size 0). These different selective pressures could be applied to populations founded by (iv) high, (v) medium and (vi) low genetic diversity.

However, we could not cross each category of size selection with each level of genetic diversity, since experimental tube management was non-viable. In particular, six out of 9 treatments, those that could be *a priori* more relevant were selected, including two opposite situations in the origin of multicellularity (high vs. low genetic diversity), and an intermediate one in the character reversal (medium genetic diversity). Eighteen replicates from both unicellular and multicellular cultures were submitted to size (+) selection (i.e. selection for multicellularity), but these replicates were found using three types of genetic variability: high ( $n = 4$ ), medium ( $n = 8$ ) and low variability ( $n = 6$ ; Table III.1). However, replicates that were submitted to the size (-) selection (i.e., selection for unicellularity), were founded using medium genetic richness ( $n = 8$ ), and replicates under size (0) selection were founded with high ( $n = 4$ ) and low ( $n = 6$ ) genetic diversity (Table III.1). Every protocol was performed once, was applied to both

unicellular and snowflake morphotypes, and lasted 15 d. Transfers to fresh medium were made every 24 h in all treatments.

**Table III.1.** Eco-evolutionary scenarios (crossing selection pressure and genetic diversity level) and number of replicates assigned to each treatment. (-): non-tested scenario

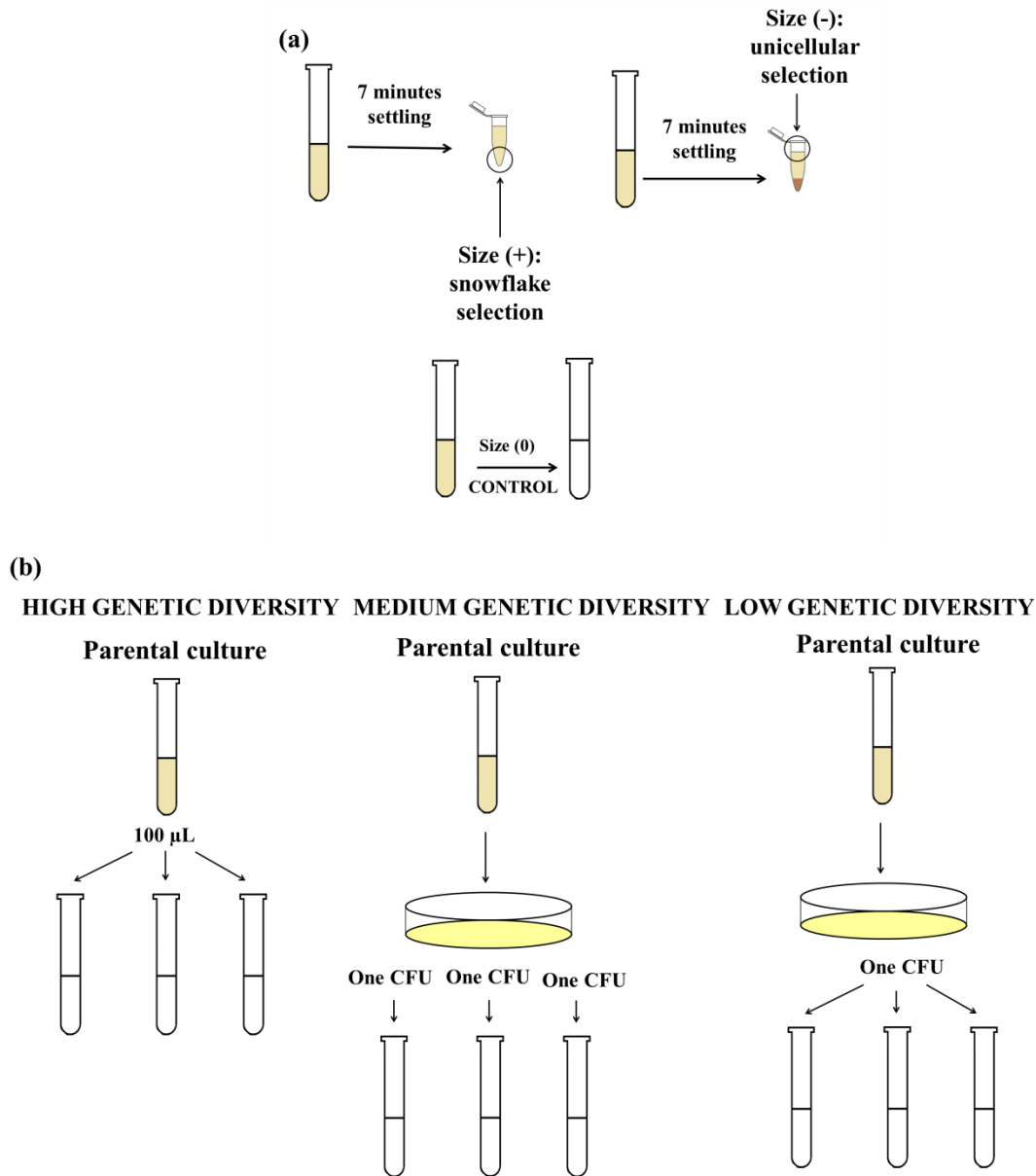
		Initial genetic diversity		
		High	Medium	Low
	Size (+)	$n = 4$	$n = 8$	$n = 6$
Selection pressure	Size (0)	$n = 4$	-	$n = 6$
	Size (-)	-	$n = 8$	-

Our procedure regarding the different selective pressure relies on Rattcliff *et al.* (2011) and Driscoll & Travisano (2017) sedimentation protocol (Fig. III.3a). Overnight cultures were carefully mixed, and 1.5 mL aliquots of every tube were transferred to 1.5 mL Eppendorf tubes. After 7 min of gravitational settling, the bottommost portion (100  $\mu$ L) was then removed with a pipette and transferred to a new tube containing 10 mL of fresh liquid YPD media. With this approach, the largest particles (snowflakes) are expected to be selected instead of the small ones (unicells), simulating multicellular selection in nature. Size (-) selection was imposed by preparing a 1.5 mL Eppendorf in the same way as explained for size (+), but taking a 100  $\mu$ L aliquot from the topmost, and placing it into 10 mL of YPD fresh media. This procedure simulates a natural selection against large particles, i. e., selection for unicellularity (or character reversal when using multicellular cultures). Size (0) was imposed by the transfer of a 100  $\mu$ L aliquot of the preexisting culture (without settling) to new YPD media. Transfers, both in selection (+), (-) and (0), were made every 24 h (~ 6.7 generations) for 15 d (~ 100 generations).

The three different levels of population genetic diversity were achieved by modifying the initial inocula used to found the replicates (Fig. III.3b). The scenario with high genetic variability was started taking 100  $\mu$ L aliquots directly from each unicellular or multicellular parental culture to found each replicate; populations showing medium genetic variability were started using one single colony to found each replicate, so there



was one single genotype in each population/replicate, but the genotype was different among replicates; and, finally, low genetic variability was simulated placing an inoculum from a culture founded by one single and identical colony on all the replicates. In this sense, and when necessary, ancestors cultures were plated in agar at room temperature for 24 h in order to obtain the number of desired colonies.



**Fig. III.3** Experimental procedures followed to apply different selection pressures (a) and genetic variability (b). The selection pressures applied were: size (+), selecting for bigger sizes; size (-), for smaller sizes; or size (0), control (no or relaxed selection), transferring an aliquot from a shaken culture. The genetic composition of the population was achieved inoculating a 100  $\mu$ L parental culture aliquot to each tube (high genetic variability); founding each replicate with one different colony (medium genetic variability); and, founding every replicate with the same colony (low genetic variability).



As explained before, once the experiment started, cultures were plated in Petri dishes every 5 d in order to measure the proportion of unicell or snowflakes CFUs along the experiment in each treatment and each ancestor (unicell/snowflake). Thus, we enumerated the relative frequencies of different morphotypes. Colonies were counted, and the number of CFUs belonging to snowflakes and unicells was used to calculate a percentage of both morphotypes per tube.

The overall mean of both morphotypes among replicates on 15 d cultures ( $t_{15}$ ) was established as the percentage of each morphotype after each applied treatment. Besides, the size distribution of  $t_{15}$  cultures of each replicate was measured using the Multisizer MS4, and we calculated the percentage of the particles in the ranges 3 - 9, 9 - 15 and 15 - 35  $\mu\text{m}$ .

### III.2.2.2. Competition and coexistence among strains

A competition experiment was performed in order to monitor how fast was the ratio of colonization of both morphotypes. We could simulate the fitness viability of each morphotype on an environment inhabited by the other one. For this purpose, two categories of populations were studied: unicells as hosts plus snowflakes acting as invaders ('multicellular colonization'), and *vice versa* ('unicellular colonization'). Consequently, both unicell and snowflake morphotypes played host and invader roles. Besides, we imposed a proportion of 99.9% of host CFUs, and 0.1% of invader CFUs. Finally, selection was acting in favor of invaders in both situations (Table III.2).

**Table III.2** Morphotype composition and selective pressure applied on competition environments under unicellular and multicellular colonization ( $n = 10$ ).

	Host (99.9% CFUs)	Invader (0.01% CFUs)	Selective pressure
Unicellular colonization	Snowflakes	Unicells	Size (-)
Multicellular colonization	Unicells	Snowflakes	Size (+)

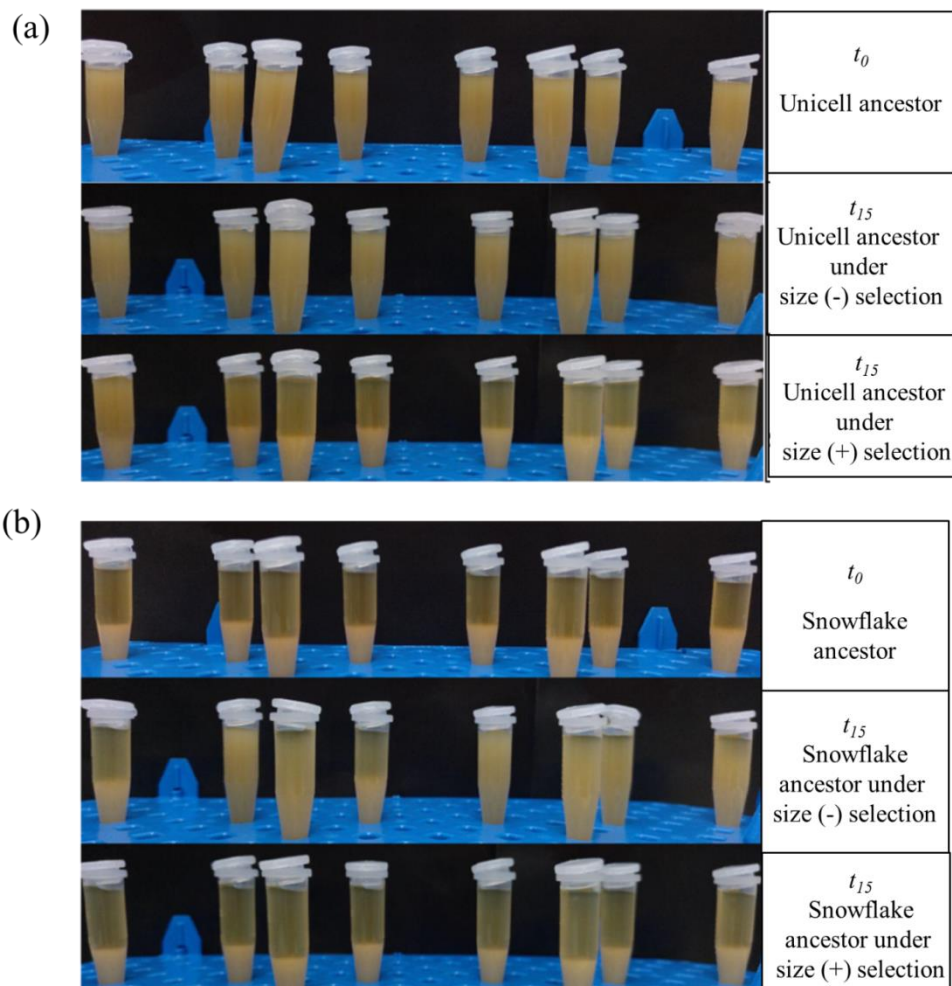


We used a 24 h uniclonal culture of each morphotype as parental culture to found every replicate. We measured the density of parental cultures using the Multisizer MS4. Once knowing the number of CFUs per mL in the parental cultures, we placed a known inoculum on every replicate. Thus, we inoculated  $10^6$  CFUs on every tube containing 10 mL of YPD media, being  $10^3$  CFUs of the invader (0.1%), and  $9.99 \times 10^5$  CFUs of the host (99.9%) morphotype. Therefore, ‘unicellular colonization’ was applied with 99.9% of snowflake CFUs acting as hosts, and a 0.1% of unicell CFUs acting as invaders, submitted to size (-) selection. On the other hand, the ‘multicellular colonization’ scenario was settled using a proportion of 99.9% of unicell CFUs acting as hosts, plus a 0.1% of snowflake CFUs acting as invaders, submitted to size (+) selection. Cultures were plated every day in order to measure both unicell and snowflake CFU proportion for 4 d (i. e. for  $\sim 27$  generations).

In order to calculate the invasion rate per day, a regression was made per each replicate in both scenarios. Thus, data were fitted to the equation which better explained their behavior. When unicells acted as invaders, we fitted the data from the two first days of colonization (from  $t_0$  to  $t_2$ ) to a linear regression. Nevertheless, we used all data when snowflakes were acting as invaders (from  $t_0$  to  $t_4$ ), fitting them to an exponential equation.

### III.3. RESULTS

Cultures underwent morphotype transitions from unicellular to multicellular snowflakes and *vice versa* when using the appropriate genetic population composition and selective pressure. We observed that, after 7 min settling, cultures belonging to  $t_0$  snowflake ancestor, and  $t_{15}$  unicells and snowflake replicates submitted to size (+) developed the characteristic pellet of multicellular cultures (Fig. III.4a). However,  $t_0$  unicells ancestors and  $t_{15}$  unicells and snowflake cultures under size (-) remained quite uniform, resembling unicellular cultures (Fig. III.4b).



**Fig. III.4** Visual comparison of medium genetic diversity cultures after 7 minutes settling of (a) unicellular and (b) snowflake ancestors before ( $t_0$ ) and after 15 days ( $t_{15}$ ) under size (-) and size (+) selection treatments ( $n = 8$ ).

III.3.1. Unicellular evolution towards multicellularity

We already knew that snowflake clusters formation from unicellular morphotypes was possible in *K. lactis* (Driscoll & Travisano, 2017) and in *S. cerevisiae* (Ratcliff *et al.*, 2012; Rebolleda-Gómez & Travisano, 2018, 2019). For this reason, we used size (+) selection as a proxy of multicellular selection.

On unicellular cultures, and applying size (+) selection, multicellularity was achieved quite easily regardless of the initial genetic diversity (Table III.3), as a percentage of CFUs around 20% was observed after 15 d of treatment at the three levels of genetic diversity (Table III.3). Interestingly, snowflakes developed in all replicates usually after 2 transfers (~ 13.4 generations) regardless the initial genetic diversity. However, no snowflake clusters were observed, neither in Petri dishes nor in liquid cultures, under size (0) or size (-) selection (Table III.3).

**Table III.3** Multicellular achievement in unicellular ancestor cultures in treatments crossing genetic diversity and size selection. Data are the percentage (mean ± SD) of snowflake CFUs observed after 15 d of treatment; *nd* = no snowflake CFU colonies detected; - = not analyzed.

Percentage of snowflakes CFUs			
Initial genetic diversity			
Selection pressure on	High	Med	Low
unicellular ancestors	( <i>n</i> = 4)	( <i>n</i> = 8)	( <i>n</i> = 6)
Size (+)	17 ± 3%	22 ± 22%	30 ± 10%
Size (0)	<i>nd</i>	-	<i>nd</i>
Size (-)	-	<i>nd</i>	-



## III.3.2. Reversal to unicellularity in multicellular cultures

Surprisingly, we found single cells on snowflake cultures after 15 transferences under size (-), size (0) and even size (+) selection (Table III.4). This result was unexpected.

When snowflake cultures were founded with high genetic diversity, single cells appeared in all replicates after 15 transferences, both in cultures under selection (0) with a percentage of ~ 98% unicell CFUs, and even when size (+) selection was carried out, but with a much lower percentage of colonies (~ 2%; Table III.4). When cultures were founded with medium genetic diversity, we found single cells only in 1 out of 8 replicates submitted to size (-) selection (Table III.4), with a 99.9% of unicells density within this particular culture. However, no reversal was achieved on cultures submitted to size (+) selection and medium genetic diversity. Furthermore, none of the snowflake cultures experienced morphotype reversal to single cells in cultures under low genetic diversity, regardless the selective pressure imposed (Table III.4).

**Table III.4** Snowflake reversion in multicellular ancestor cultures in treatments crossing genetic diversity and size selection. Data are the percentage (mean $\pm$  SD) of unicell CFUs observed after 15 d of treatment; *nd* = no unicell CFU colonies detected; - = not analysed.

Percentage of unicells CFUs (%)			
Initial genetic diversity			
Selection pressure on	High	Med	Low
multicellular ancestors	( <i>n</i> = 4)	( <i>n</i> = 8)	( <i>n</i> = 6)
Size (+)	2 $\pm$ 2	<i>nd</i>	<i>nd</i>
Size (0)	98 $\pm$ 1	-	<i>nd</i>
Size (-)	-	1 case out of 8	-

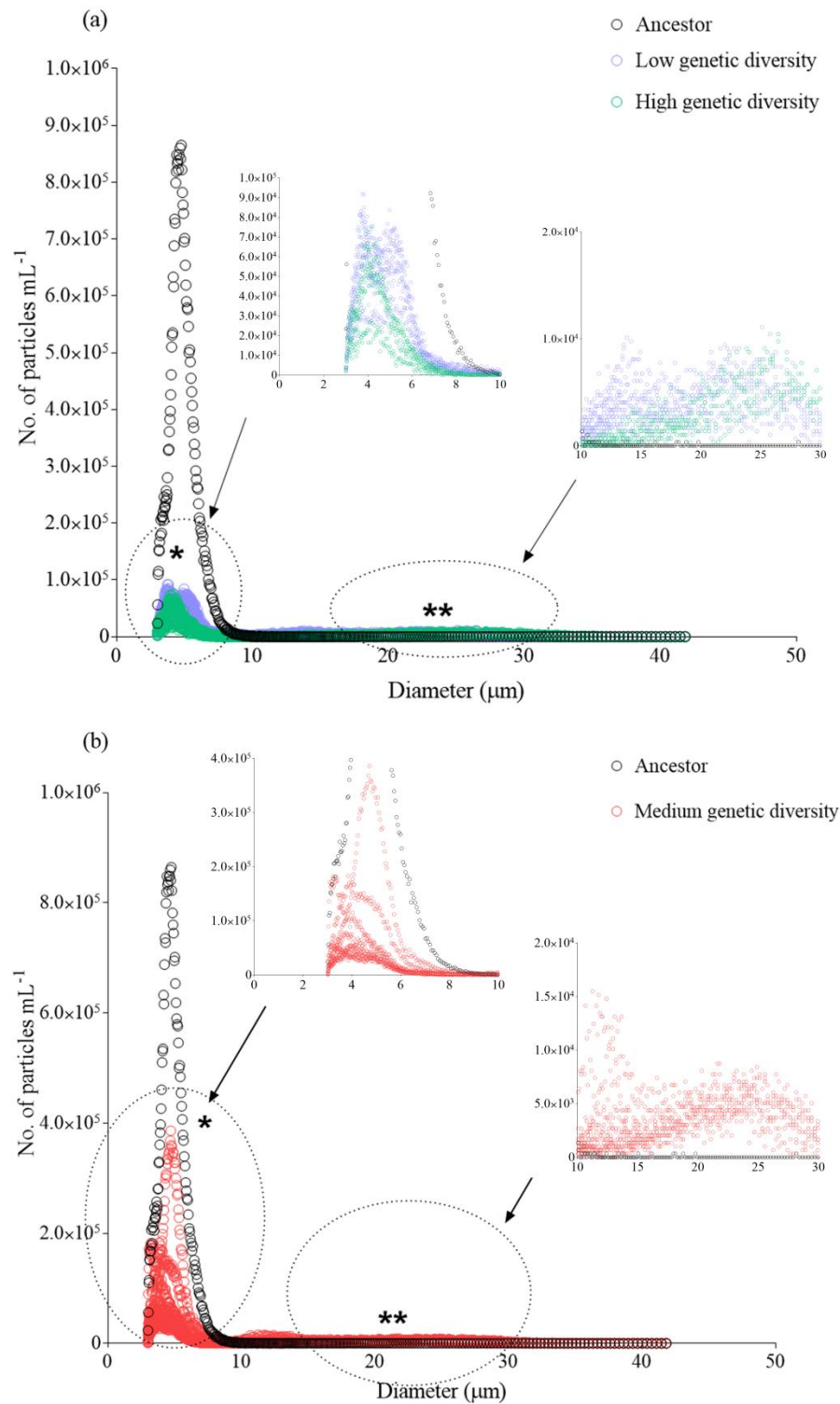


#### III.3.3. Changes on size distribution

Morphotype changes (from unicells to snowflakes and *vice versa*) were further analyzed comparing the size distribution of the population, before ( $t_0$ ) and after ( $t_{15}$ ) the selective pressure was applied (Figs. III.5 and III.6).

##### III.3.3.1. Changes on size distribution in the unicellular to multicellular transition

There was a change on the size distribution on unicellular ancestor cultures submitted to size (+), as can be observed when comparing  $t_0$  and  $t_{15}$  populations under this treatment (Fig. III.5). Unicellular cultures, founded either with high or low genetic diversity, experienced two phenomena (Fig. III.5a): a decrease in the number of particles of smaller size ( $\sim 6 \mu\text{m}$ , the most abundant size in the ancestor cultures), and an increase in the particle size attributable to a change in morphotype (a rise of the particle proportion belonging to  $\sim 15 - 35 \mu\text{m}$  range). The percentage of the cluster size ranging  $3 - 9 \mu\text{m}$ , under size (+) selection, decreased from 99.9% to  $87.9 \pm 1.7\%$  and  $80.1 \pm 19.9\%$  under high and low diversity, respectively (Fig. III.5a). But the interesting fact was found when analyzing the percentage of particles ranging  $15 - 35 \mu\text{m}$ , which increased from 0.01% to  $12.0 \pm 2.6\%$  and  $6.6 \pm 1.9\%$  under high and low diversity, respectively (Fig. III.5a). The effect of selection (+) on unicell cultures under medium genetic diversity (Fig. III.5b) followed the same pattern as observed under high and low genetic diversity (Fig. III.5a). The percentage of particles ranging  $3 - 9 \mu\text{m}$  decreased from 99.9% to  $80.4 \pm 20.0\%$ , whereas particles ranging  $15 - 35 \mu\text{m}$  increased from 0.01% to  $6.3 \pm 3.2\%$  (Fig. III.5b).

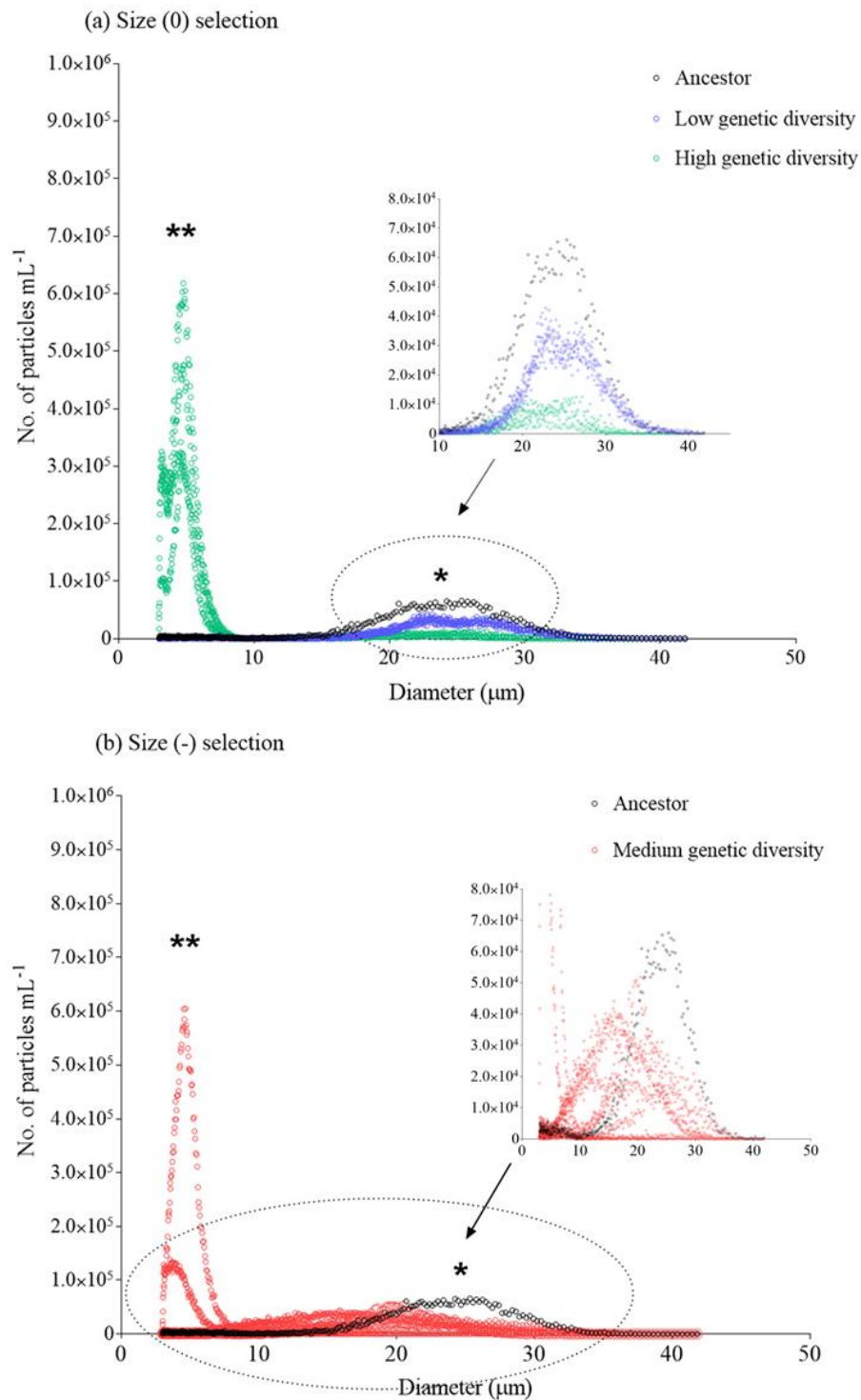


**Fig. III.5** Size distribution of unicell cultures before (ancestor population; black dots) and after 15 transfers under size (+) selection in populations with (a) low (blue dots,  $n = 6$ ) or high genetic diversity (green dots,  $n = 4$ ); or (b) medium genetic diversity (red dots,  $n = 8$ ). One asterisk (\*) indicates that a decrease on the number of particles showing the unicellular ancestor size occurred, whereas two asterisks (\*\*) points to a change in size attributable to a morphological change.

#### III.3.3.2. Changes on size distribution in the multicellular to unicellular transition

To further analyze the changes on size distribution of the snowflake ancestor population, we plotted the data obtained in the scenarios where multicellular reversal occurred massively after 15 d of selection, i. e., on size (0) under high genetic diversity (Fig. III.6a), and size (-) under medium genetic diversity (Fig. III.6b). In these cases, the proportion of unicells was enough to observe a size distribution change. The reversal events, while important, were so small under high diversity and size (+), that no changes in population size distribution were detected (data not shown). Nevertheless, we represented size (0) selection under low genetic diversity in order to compare the results obtained (Fig. III.6a).

Snowflake cultures under high genetic diversity after 15 transfers under size (0) selection showed a size distribution characterized by a peak in the number of clusters in the range 3 - 9  $\mu\text{m}$  diameter. That is, the percentage of this size range with respect to total particles increased from 8.8% in  $t_0$  population to  $98.3 \pm 0.4\%$  in  $t_{15}$  populations (Fig. III.6a), that is, it showed a typical unicell size distribution. Although there was no multicellular reversion on snowflakes cultures under minimum genetic diversity and size (0) selection (Table III.4), the Gauss bell formed by the particles ranging 15 - 35  $\mu\text{m}$  in diameter clearly decreased in height with respect to the ancestral population (Fig. III.6a, subset). The percentages of particles observed in the ranges 3 - 9, 9 - 15 and 15 - 35  $\mu\text{m}$  were  $10.5 \pm 1.3\%$ ,  $2.3 \pm 0.5\%$  and  $89.9 \pm 4.3\%$ , respectively, in low genetic diversity scenario.



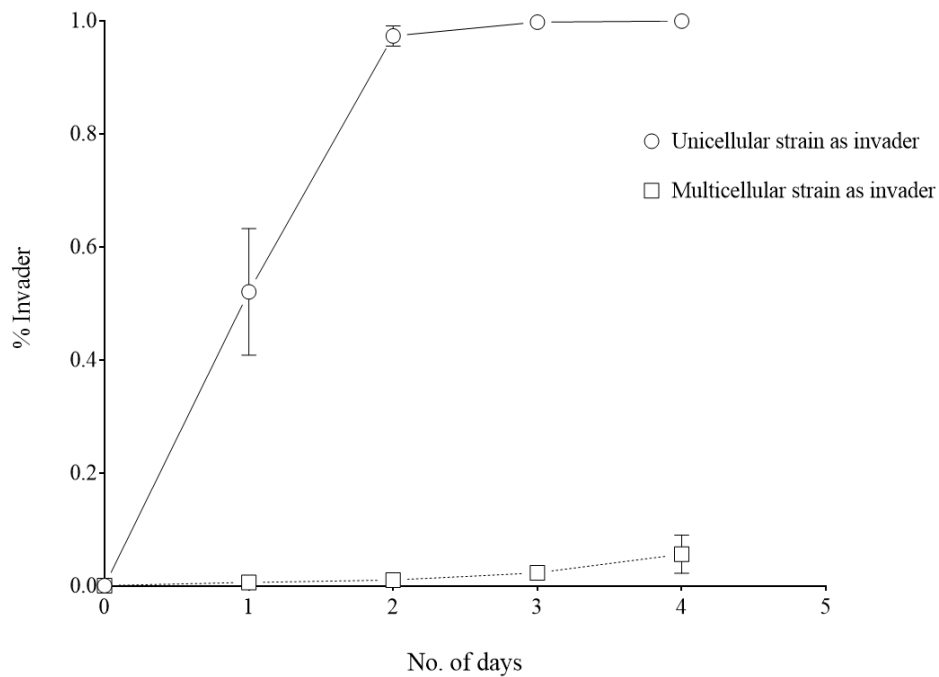
**Fig.III.6** Population size distribution of multicellular (snowflakes) cultures before (ancestor population; black dots) and after 15 transfers under (a) size (0) selection, in low (blue dots,  $n = 6$ ) or high genetic diversity populations (green dots,  $n = 4$ ); and (b) size (-) selection in medium genetic diversity populations (red dots,  $n = 8$ ). One asterisk (\*) indicates that a decrease on the number of particles showing the ancestor size occurred, whereas two asterisks (\*\*) points to a change in size attributable to a morphological change.

Nevertheless, submitting medium genetic diversity snowflakes cultures to size (-), and taking into account that replicates were genetically different among them, size distribution curves showed very diverse patterns (Fig. III.6b). We observed a great deviation among replicates. Two phenomena could be observed: trait reversal (as seen in high genetic diversity cultures) and a decrease in the height of the Gauss bell curve at the higher diameters, suggesting a decrease on snowflakes size, rather than morphotype reversal (similar to the effect observed at low genetic diversity). The percentages of particles observed in the ranges 3 - 9, 9 - 15 and 15 - 35  $\mu\text{m}$  were  $29.4 \pm 32.3\%$ ,  $23.7 \pm 25.9\%$  and  $47.9 \pm 31.5\%$ , respectively.

#### III.3.4. Colonization rate under favorable selection as invader

A second approach was applied in order to get deeper into the rate of colonization under favorable selection. We used single cells as invaders in snowflake cultures under size (-) selection, and snowflakes as invaders in unicellular cultures under size (+) selection (Fig. III.7).

We found differences between the speeds of colonization (or invasion rate) of the two morphotypes (Fig. III.7). When single cells were invading the snowflake environment, the percentage of CFUs increased from 0.1% to almost 100% within the first two days. Nevertheless, the snowflake colonization rate when this morphotype was acting as invader in the unicellular environment was much slower.



**Fig. III.7** Invader CFU's percentage along time. All replicates ( $n = 10$ ) started with 0.1% CFU of invaders. Single cells acted as invaders in multicellular cultures (open dots), submitted to size (-) selection; and snowflakes acted as invaders on unicellular cultures (open squares), submitted to size (+) selection.

A linear increment was found ( $R^2$  ranged from 0.94 and 0.99,  $n = 10$ ) when single cells were acting as invaders during the first two days with an invasion rate of  $48.6 \pm 0.9\% \text{ d}^{-1}$ . At this rate, all cultures were practically filled with single cells since the second day. However, when snowflakes were acting as invaders, we observed a very low invasion rate, showing a slight exponential increment ( $R^2$  ranged from 0.75 and 0.98,  $n = 10$ ), yielding an invasion rate of  $0.96 \pm 0.16\% \text{ d}^{-1}$ .

### III.4. DISCUSSION

Populations of the yeast *K. lactis* strain Y8 under settling or non-settling selection evolved multicellularity or unicellularity, respectively, under the studied conditions. The achievement of multicellularity depended on directional selective pressure, because the transition from unicells to snowflakes was only obtained under size (+) selection, but no snowflakes were detected under size (0) or size (-) selection (Table III.3). Snowflakes obtained under size (+) selection appeared regardless the initial genetic pool, i.e., the transition from uni- to multicellularity was not restricted by the genetic diversity. This rapid evolutionary response to selection towards multicellularity in unicellular yeasts supports the idea that the transition from uni- to multicellular organization along the history of evolution could have been quite easy, being a response to environmental stimuli and selection (Grosberg & Strathmann, 2007). Besides, this result is consistent with the hypothesis that the emergence of nascent multicellular organisms was motivated by a strong selection that favored this trait (Ratcliff et al., 2012). In this sense, the absence of positive selection cannot balance the evolutionary cost of the occurrence of cooperation among cells (Velicer et al., 1998).

Ratcliff et al. (2012) obtained snowflakes from single-celled *S. cerevisiae* cultures under settling selection for 60 d, whereas in *K. lactis* this process was observed after 15 d of selection. Thereby, the evolution of snowflakes in both *S. cerevisiae* and *K. lactis* occurred easily, suggesting that this phenomenon is not exclusive from Y8 *K. lactis* strain, although it seems to occur in a shorter period of time, as we often detected snowflakes in unicells cultures after only 2 d of settling selection (data not shown). *Saccharomyces cerevisiae* clusters studied by Ratcliff et al. (2012) developed by ‘stay together’ (ST) mechanism, rather than by ‘come together’ (CT). Under ST, the cluster guarantees a high relatedness among individual cells, ensuring that they will align their fitness altogether (Hamilton, 1964; Grosberg & Strathmann, 1998). Nevertheless, Driscoll & Travisano (2017) observed that both ST and CT mechanisms were involved in the formation of snowflakes clusters on Y8 *K. lactis* strain. Although these mechanisms were considered as separated ways in the development of multicellularity, Driscoll & Travisano (2017) suggested that both ST and CT could have been involved during this major evolutionary transition. In fact, the simultaneous operation of these

two mechanisms has been observed in nature, for example, in the formation of bacterial biofilms (Ereshefsky & Pedroso, 2015) and microalgal colonies (Wang et al., 2011).

Our results indicate that not only the appearance of multicelled organisms could be easy if positive selection is applied, but also that it is not constrained by genetic diversity. In fact, Prochnik et al. (2010), comparing the organismal complexity of the multicellular green alga *Volvox carteri* with the unicellular *Chlamydomonas reinhardtii* proposed that the evolution of multicellularity did not, necessarily, involve major changes on the genomic complexity of unicellular ancestors. Moreover, it has been widely assumed that multicellularity has evolved continually in unrelated phylogenetic groups (Medina et al., 2003; Grosberg & Strathmann, 2007; Rossetti et al., 2010; Schirmer et al., 2011), so the origin and evolution of multicellularity may be less constrained than it has been previously proposed, as indicated by Ratcliff et al. (2012).

The transition from snowflakes to single cells was possible in Y8 *K. lactis*, being influenced by both genetic diversity and selective pressure. We obtained an unexpected result in snowflakes cultures in the high genetic variability scenario, as all replicates under size (0) selection underwent multicellular trait reversal. Moreover, unicells constituted ~ 98% of the total population (Table III.4). This means that, even under an environmental scenario with no selective pressure, reversal could be constantly occurring if the genetic diversity is high enough. But, more interestingly, multicellular reversal occurred under size (+) selection and high genetic diversity as well, although in a much lower percentage of the population, ~ 2% (Table III.4). Therefore, we could hypothesize that in *K. lactis* Y8 populations with high genetic diversity, unicells could appear not only when no selection processes are acting, i.e., at size (0), but also when selection pressure favors snowflake clusters, i.e., at size (+). It has been generally considered that there are multiple genetic constraints involved in the maintenance of multicellularity (Chen et al., 2015), like complex regulatory pathways that imply genetic mechanisms suppressing the viability of individual cells (Grosberg & Strathmann, 2007; Hammerschmidt et al., 2014). That is, it has been proposed that when modifications involving numerous genes occur, changes on the new adaptive landscape reduce the potential of reversibility (Bajić et al., 2018). However, Driscoll & Travisano (2017) analyzed the persistence of unicellular lineages in environments composed mainly by multicellular individuals. They observed that unicells benefited from this extended cooperation, promoting the survival of unicellularity in *K. lactis*.



Moreover, Queller (2000) suggests that genetic diversity promotes competition within a multicellular group, which eventually could lead to the appearance of unicellular ‘cheaters’ that take advantage from cooperation without working for the group. This could explain the appearance of unicells in populations with high genetic diversity, where they could appear and spread even under no (size 0) or opposite (size +) selection. Nevertheless, we could not differentiate between “cheaters” and “free-riders” in our experiment. Further work would be necessary to determine if unicells enter in competition with snowflake populations.

No reversal to unicellularity was detected at low genetic diversity under size (0) and (+) selection. Nevertheless, under medium genetic diversity and size (-) selection, i.e., in favor of unicellularity, we observed that 1 out of 8 replicates suffered a trait reversal towards unicellularity (Table III.4). However, in replicates in which reversal did not occur, snowflake clusters decreased in size (Fig. III. 6b), probably due to the selection of particles of smaller size. In addition, we observed differences in the size population distribution among these replicates.

Rebolleda-Gómez & Trivisano (2019) also observed a rapid phenotypic shift from snowflakes to unicells in *S. cerevisiae*. These authors placed several multicellular populations on a structured environment in which they expected multicellularity to be disadvantageous, as we tried to mimic using size (-). The scenario against multicellularity was simulated by plating the cultures on agar, because the larger a cluster, the higher the costs related to local competition and access to nutrients. After ~200 generations, Rebolleda-Gómez & Trivisano (2019) discovered that all replicates were dominated by unicells. Besides, they observed that different populations exhibited different patterns of transitions snowflake-unicell (i.e., going straight from multi- to single cells vs. a slow reduction in size). This variation was explained by the simultaneous effects of history (genetic background) and chance (random variation among replicates from the same ancestor). They observed that, as clusters became smaller, the influence of selection decreased and the contribution of chance and history were more important. Trivisano et al. (1995) already measured the contributions of adaptation, history and chance to the evolution of fitness and cell size in *E. coli*, finding that the fitness was not constrained by the previous history. Moreover, the phenotypic changes in toxin cell quota in *Alexandrium minutum* (a toxic dinoflagellate) were modulated by historical contingency and chance (Flores-Moya et al., 2012). In this



sense, we could also explain our results throughout the effect of both history and chance. The effect of history can be observed as opposite results were obtained in populations with high and low genetic diversity under size (0) and (+) selection. The role of chance could be inferred by the different responses, among replicates under size (-) and medium genetic diversity, regarding population densities and size distribution.

Multicellularity provides multiple benefits, like avoiding predation (Stanley 1973; Boraas et al., 1998), the enablement of new adaptive niches or the ability for a more efficient exploitation of the preexisting ones (Maynard-Smith & Szathmary, 1995; Ispolatov et al., 2012), division of labor (Michod, 2007) and metabolic cooperation (Grosberg & Strathmann, 2007). Nevertheless, a bigger size limits dispersal and nutrient uptake (Sommer et al., 2017). Our results showed that unicells could invade a snowflake environment faster than snowflakes could proliferate in a unicellular culture, because snowflakes grow at lower rates than single cells (Driscoll & Travisano, 2017). Thus, even in an environment where the selection pressure favored an increase in size, i.e., size (+), the rate of invasion by snowflakes was lower enough to maintain the predominance of the unicellular morphotype. Besides, unicells consume resources at a faster rate than snowflakes, which allows them to grow and proliferate more rapidly. In *S. cerevisiae*, every transfer to fresh medium favored the growth of single-cells and the fitness of snowflakes decreased as the clusters average size increased, due to the higher surface-to-volume ratio in unicells compared to snowflakes (Rebolleda-Gómez & Travisano, 2018, 2019).

Multicellularity appears to irrevocably entail an increase in biological organization levels (Grosberg & Strathmann, 2007). Nevertheless, it has already been demonstrated that reversal can occur in the laboratory (Rebolleda-Gómez & Travisano, 2018), as it has been observed in the present work. Furthermore, this phenomenon is likely to be continually occurring in nature. A perfect example has been observed in mussels. Several investigations have documented the transmission of cancer cells among individuals of different species of the genus *Mytilus* through the transmission of single infectious cells (Hamede et al., 2013; Strakova & Murchinson, 2015; Yonemitsu et al., 2019). It has recently been observed that these tumor single-cells can even colonize individuals of related but different species (Yonemitsu et al., 2019). This situation perfectly shows how a multicellular cluster leads to the production of individual cells than can travel between individuals, creating new tumors in different hosts.

Our experimental analysis of the gain and loss of multicellularity under the manipulation of the selective forces and the genetic diversity of the population allowed us to get closer to the understanding on how the first multicellular organisms developed and settled. We observed that both selective pressure and genetic variability played a fundamental role on the origin and maintenance of these first incipient multicellular organisms, in agreement with Rebolleda-Gómez & Travisano (2019). Thus, we conclude that the reversal of the multicellular trait is much more genetically dependent than its gain on Y8 *K. lactis* strain. Nonetheless, this assertion must be made with caution. Multicellular evolution may be critically dependent on the DNA ‘toolkits’ available in unicellular ancestors (Rokas, 2008; Bowman, 2013; Niklas & Newman 2013; Smolarkiewicz & Dhonukshe 2013). For that reason, the scope of this conclusion should be carefully made, and the generalizability of our results may depend upon the genetic similarities in the mechanisms of multicellular evolution. Besides, we are aware that this study involves two morphotypes sharing a very close ancestor. We remain careful in our conclusions, noting that multicellular reversals are likely to be genetically constrained. Strong selection favoring gain and loss of multicellularity in budding yeast may not be general across all living organisms. Some of the observed results may be general rules, while others could be exceptions. New researches, exploring the origins of multicellularity across diverse lineages, will help us to understand our multicellular heritage.

# CONCLUSIONS

---



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



1. The sulfide-sensitive cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* Ma1Vc strain could adapt to the lethal sulfide levels of La Hedionda spa by rare spontaneous mutations, with a rate of  $2.1 \times 10^{-7}$  mutants per generation. The mutation-selection equilibrium was ca. 1 sulfide - resistant mutant cell per  $10^6$  wild type cells, that could be enough to achieve adaptation and, therefore, for the survival of populations suddenly exposed to lethal concentrations of sulfide.
2. Evolutionary rescue was possible in *M. aeruginosa* Ma1Vc strain populations under selection by sulfide and was modulated by their previous eco-evolutionary history. The dispersal mode (i. e., a proxy of the genetic variation) and the speed of environmental deterioration (i. e., the increment on the sulfide level) determined the probability of ER, but the effect of the former was greater than the later. In particular, the highest ER events scores were recorded under global dispersal, regardless of the environmental deterioration rate. This suggests that a high genetic variation in *M. aeruginosa* populations is crucial for adaptation and it could be enough to overcome sulfide stress (in the range we examined) under any speed of environmental change.
3. Maximum resistance to sulfide in *M. aeruginosa* increased from 1.3 up to 4 times the initial tolerance limit, depending on the strain considered. The lowest resistance increment was achieved by acclimation in the MaAVc strain (from 0.2 to 0.27 mM sulfide), whereas the maximum increase in tolerance was a consequence of adaptation in Ma1Vc (from 0.1 to 0.4 mM sulfide) and Ma5Vc (from 0.2 to 0.4 mM sulfide) strains.
4. The O1LH strain of *Oscillatoria* sp. isolated from La Hedionda spa showed a higher tolerance to sulfide than *M. aeruginosa*, with maximum growth rates at 0.1 – 0.35 mM sulfide and a tolerance limit of 0.9 mM sulfide. Nevertheless, a derived experimental population (O1R strain) was able to acclimate, rather than adapt, to 2 mM sulfide exposure. Previous culture conditions modulated the highest tolerance achievement in *Oscillatoria*, being greater when cultures were initially exposed to higher sulfide levels.



5. A physiological cost of the mutation conferring sulfide tolerance was observed in *M. aeruginosa* Ma1R sulfide-resistant strain, which showed, in sulfide-free medium, lower growth and maximum photosynthetic rates than the wild-type Ma1Vc strain. The cost was also detected by a reduction of the cell volume, and of Chl *a* and carotenoid contents. Therefore, in non-sulfurous waters, the sulphide-resistant cells would be displaced by the wild-type strain due to this physiological cost.
6. Maximum quantum yield measurements indicated that PSII tolerance to sulfide was higher in Ma1R and O1R strains than in their wild-type ancestors Ma1Vc and O1LH strains. Besides, PSII resistance to sulfide was greater in O1LH than in Ma1R, suggesting that the degree of tolerance of PSII was positively correlated with sulfide levels in the environment where the strains proliferate.
7. Neither *M. aeruginosa* nor *Oscillatoria* strains, both wild-type and sulfide-resistant, were able to perform anoxygenic photosynthesis. Nevertheless, both *Oscillatoria* strains, in contrast to *M. aeruginosa*, maintained oxygenic photosynthetic activity at 0.5 mM sulfide. Then, the mechanism that allows O1LH to thrive at La Hedionda spa is the possession of a sulfide resistant oxygenic photosynthesis. Besides, the presence of sulfide promoted the growth of this cyanobacterium, as observed both in experimental conditions and at La Hedionda spa, where sulfide seems to trigger the annual cycle of this species.
8. The transition from unicellularity to multicellularity in the yeast *Kluyveromyces lactis* (Y8 strain) was observed as long as a selective pressure towards multicellularity was applied, and was not restricted by the pre-existing genetic diversity. Nevertheless, the reversal from multicellularity to unicellularity was strongly dependent both on the genetic diversity of the populations and the selective pressure, appearing not only when no selection processes were acting, but also when selection pressure favored multicellularity. Therefore, reversal to unicellularity might happen more easily than initially proposed.
9. In a scenario of competition among morphotypes, and when the selective pressure was always favoring invaders, unicells proliferated in multicellular



environments at a faster rate than the multicellular morphotype did in unicell environments. Thus, the higher growth rate of unicells ensured their persistence in multicellular environments, even when the selection pressure was in favor of multicellularity.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



# BIBLIOGRAFÍA

---



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



- Abrams, P. A. (1987).** Alternative models of character displacement and niche shift. I. Adaptive shifts in resource use when there is competition for nutritionally nonsubstitutable resources. *Evolution*, 41(3): 651 - 661.
- Ackermann, M., Stearns, S. C., Jenal, U. (2003).** Senescence in a bacterium with asymmetric division. *Science*, 300(5627): 1920 - 1920.
- Adams, D. G. (1997).** *Cyanobacteria. Bacteria as Multicellular Organism.* eds Shapiro JA, Dworkin M Oxford Univ Press, New York, (USA), pp 109 – 148.
- Aktipis, C. A., Boddy, A. M., Jansen, G., Hibner, U., Hochberg, M. E., Maley, C. C., Wilkinson, G. S. (2015).** Cancer across the tree of life: cooperation and cheating in multicellularity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1673): 20140219.
- Allen, J. F. (2005).** A redox switch hypothesis for the origin of two light reactions in photosynthesis. *FEBS letters*, 579(5): 963 - 968.
- Amard, B., Bertrand-Sarfati, J. (1997).** Microfossils in 2000 Ma old cherty stromatolites of the Franceville Group, Gabon. *Precambrian Research*, 81(3-4): 197 - 221.
- Anderson, D.J., Levin, B. R. (1999).** The biological cost of antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology*, 2: 489 – 493.
- Andersson, B., Barber, J. (1996).** *Mechanisms of photodamage and protein degradation during photoinhibition of photosystem II.* In: Photosynthesis and the Environment. Springer, Dordrecht, (The Netherlands), pp. 101-121.
- Andersson, D. I. (2006).** The biological cost of mutational antibiotic resistance: any practical conclusions? *Current opinion in microbiology*, 9(5): 461 - 465.
- Angert, E. R. (2005).** Alternatives to binary fission in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 3(3): 214 - 224.
- APHA-AWWA-WPCF. (1992).** Métodos Normalizados Para El Análisis de Aguas Potables y Residuales. Madrid, España: Díaz de Santos.
- Armijo, F., Corvillo, I., Vázquez, I., Carbajo, J. M., Maraver, F. (2017).** Las aguas sulfuradas de los balnearios españoles. Aplicaciones e indicaciones. *Medicina naturista*, 11(2).
- Archibald, J. M. (2015).** Genomic perspectives on the birth and spread of plastids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(33): 10147 - 10153.

- Arieli, B., Padan, E., Shahak, Y. (1991).** Sulfide-induced sulfide-quinone reductase activity in thylakoids of *Oscillatoria limnetica*. *Journal of Biological Chemistry*, 266: 104 - 111.
- Arieli, B., Shahak, Y., Taglicht, D., Hauska, G., Padan, E. (1994).** Purification and characterization of sulfide-quinone reductase, a novel enzyme driving anoxygenic photosynthesis in *Oscillatoria limnetica*. *Journal of Biological Chemistry*, 269(8): 5705 - 5711.
- Armijo, F., Corvillo, I., Vázquez, I., Carbajo, J. M., Maraver, F. (2017).** Las aguas sulfuradas de los balnearios españoles. Aplicaciones e indicaciones. *Medicina naturista*, 11(2).
- Bagarinao, T. (1992).** Sulphide as an environmental factor and toxicant: tolerance and adaptations in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*, 24: 21 – 62.
- Bajic, D., Vila, J. C. C., Blount, Z. D., Sanchez, A. (2018).** On the deformability of an empirical fitness landscape by microbial evolution. *PNAS* 115: 11286 – 11291.
- Baker, N. R. (2008).** Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *The Annual Review of Plant Biology*, 59: 89 - 113.
- Bañares-España, E., López-Rodas, V., Salgado, C., Costas, E., Flores-Moya, A. (2006).** Inter-strain variability in the photosynthetic use of inorganic carbon, exemplified by the pH compensation point, in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic Botany*, 85: 159 - 162.
- Bañares-España, E., López-Rodas, V., Costas, E., Salgado, C., Flores-Moya, A. (2007).** Genetic variability associated with photosynthetic pigment concentration, and photochemical and nonphotochemical quenching, in strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *FEMS Microbiology Ecology*, 60: 449 - 455.
- Bañares-España, E., Kromkamp, J. C., López-Rodas, V., Costas, E., Flores-Moya, A. (2013).** Photoacclimation of cultured strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to high-light and low-light conditions. *FEMS Microbiology Ecology*, 83(3): 700 - 710.
- Bañares-España, E., Fernández-Arjona, M. M., García-Sánchez, M. J., Hernández-López, M., Reul, A., Mariné, M. H., Flores-Moya, A. (2016).** Sulphide resistance in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*: a comparative study of morphology and photosynthetic performance between the sulphide-resistant mutant and the wild-type strain. *Microbial ecology*, 71: 860 - 872.



- Barker, G. L., Handley, B. A., Vacharapiyasophon, P., Stevens, J. R., Hayes, P. K. (2000).** Allele-specific PCR shows that genetic exchange occurs among genetically diverse *Nodularia* (cyanobacteria) filaments in the Baltic Sea. *Microbiology*, 146: 2865 – 2875.
- Barrick, J. E., Yu, D. S., Yoon, S. H., Jeong, H., Oh, T. K., Schneider, D., Lenski, R. E., Kim, J. F. (2009).** Genome evolution and adaptation in a long-term experiment with *Escherichia coli*. *Nature*, 461(7268): 1243 - 1247.
- Barrick, J. E., Kauth, M. R., Strelisoff, C. C., Lenski, R. E. (2010).** *Escherichia coli* rpoB mutants have increased evolvability in proportion to their fitness defects. *Molecular Biology and Evolution*, 27: 1338 – 1347.
- Baselga-Cervera, B., Cordoba-Diaz, M., García-Balboa, C., Costas, E., López-Rodas, V., Cordoba-Diaz, D. (2019).** Assessing the effect of high doses of ampicillin on five marine and freshwater phytoplankton species: a biodegradation perspective. *Journal of Applied Phycology*, 31(5): 2999 - 3010.
- Baselga-Cervera, B., López-Rodas, V., Balboa, G., Huertas, I. E., Costas, E. (2016).** Mechanisms of rapid adaptation to environmental stressors in phytoplankton. *Journal of Environmental & Analytical Toxicology*, 6: 5.
- Battistuzzi, F. U., Feijao, A., Hedges, S. B. (2004).** A genomic timescale of prokaryote evolution: insights into the origin of methanogenesis, phototrophy, and the colonization of land. *BMC Evolutionary Biology*, 4(1): 44.
- Beatty, J. (2006).** Replaying life's tape. *The Journal of Philosophy*, 103(7): 336 - 362.
- Beauchamp, R. O., Bus, J. S., Popp, J. A., Boreiko, C. J., Andjelkovich, D. A. Leber, P. (1984).** A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, 13: 25 – 97
- Beer, S., Eshel, A. (1985).** Determining phycoerythrin and phycocyanin concentrations in aqueous crude extracts of red algae. *Marine and Freshwater Research*, 36(6): 785-792.
- Bekker, A., Holland, H. D., Wang, P. L., Rumble, D., Stein H. J., Hannah, J. L., Coetzee, L. L., Beukes, N. J. (2004).** Dating the rise of atmospheric oxygen. *Nature*, 427: 117 – 120
- Belfiore, N. M., Anderson, S. L. (2001).** Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review. *Mutation Research*, 489: 97 – 122.

- Belkin, S., Padan, E. (1983).** Low redox potential promotes sulphide- and light-dependent hydrogen evolution in *Oscillatoria limnetica*. *Microbiology*, 129: 3091 - 3098.
- Bell, G. (2008).** *Selection, the Mechanism of Evolution*. 2nd ed. Oxford University Press, Oxford, (UK), pp. 553.
- Bell, G., Collins, S. (2008).** Experimental evolution and global change. *Evolutionary Applications*, 1: 3 - 16.
- Bell, G. (2012).** Evolutionary rescue of a green alga kept in the dark. *Biology letters*, 9(1): 20120823.
- Bell, G., Gonzalez, A. (2009).** Evolutionary rescue can prevent extinction following environmental change. *Ecology letters*, 12: 942 - 948.
- Bell, G., Gonzalez, A. (2011).** Adaptation and evolutionary rescue in metapopulations experiencing environmental deterioration. *Science*, 332: 1327 - 1330.
- Bendall, D. S., Manasse, R. S. (1995).** Cyclic photophosphorylation and electron transport. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1229: 23 - 38.
- Bennett, A. F., Lenski, R. E. (1997).** Evolutionary adaptation to temperature. VI. Phenotypic acclimation and its evolution in *Escherichia coli*. *Evolution*, 51(1): 36 - 44.
- Berk, V., Fong, J. C., Dempsey, G. T., Develioglu, O. N., Zhuang, X., Liphardt, J., Yildiz, F. H. Chu, S. (2012).** Molecular architecture and assembly principles of *Vibrio cholerae* biofilms. *Science*, 337(6091): 236 - 239.
- Beutler, M., Wiltshire, K. H., Meyer, B., Moldaenke, C., Lüring, C., Meyerhöfer, M., Hansen, U. P., Dau, H. (2002).** A fluorometric method for the differentiation of algal populations in vivo and in situ. *Photosynthesis research*, 72(1): 39 - 53.
- Björkman, O., Demmig, B. (1987).** Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta*, 170(4): 489 - 504.
- Blank, C. E., Sánchez-Baracaldo, P. (2010).** Timing of morphological and ecological innovations in the cyanobacteria—a key to understanding the rise in atmospheric oxygen. *Geobiology* 8:1 - 23
- Blount, Z. D., Borland, C. Z., Lenski, R. E. (2008).** Historical contingency and the evolution of a key innovation in an experimental population of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(23): 7899 - 7906.

- Bonasio, R., Tu, S., Reinberg, D. (2010).** Molecular signals of epigenetic states. *Science* 330: 612 – 616.
- Bonner, J. T. (1998).** The origins of multicellularity. *Integrative Biology: Issues, News, and Reviews: Published in Association with The Society for Integrative and Comparative Biology*, 1(1): 27 - 36.
- Bonner, J. T. (2000).** *First signals: the evolution of multicellular development*. Princeton University Press, Princeton, NJ, (USA), pp. 147.
- Boomsma, J. J. (2007).** Kin selection versus sexual selection: why the ends do not meet. *Current Biology*, 17: R673 – R683.
- Boomsma, J. J. (2009).** Lifetime monogamy and the evolution of eusociality. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 364: 3191 – 3207.
- Boomsma, J. J. (2013).** Beyond promiscuity: mate-choice commitments in social breeding. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 368: 20120050.
- Boraas, M. E., Seale, D. B., Boxhorn, J. E. (1998).** Phagotrophy by a flagellate selects for colonial prey: a possible origin of multicellularity. *Evolutionary Ecology*, 12(2): 153 - 164.
- Bourke, A. F. (2011).** *Principles of social evolution*. Oxford University Press, London (UK).
- Bowman, J. L. (2013).** Walkabout on the long branches of plant evolution. *Current Opinion in Plant Biology*, 16(1): 70 - 77.
- Bradshaw, A. D., Hardwick, K. (1989).** Evolution and stress – genotype and phenotype components. *Biological Journal of the Linnean Society*, 37: 137 – 155.
- Brandon, R. N. (1978).** Adaptation and evolutionary theory. *Studies in History and Philosophy of Science*, 9: 181 - 206.
- Bräutigam, K., Vining, K. J., Lafon-Placette, C., Fossdal, C. G., Mirouze, M., Marcos, J. G., ... Johnsen, Ø. (2013).** Epigenetic regulation of adaptive responses of forest tree species to the environment. *Ecology and evolution*, 3(2): 399 - 415.
- Brooke, J. S., Koval, S. F., Beveridge, T. J. (1995).** Unusually stable spinae from a freshwater *Chlorobium* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(1): 130 - 137.



- Bull, J. J., Charnov, E. L. (1985).** On irreversible evolution. *Evolution*, 39(5): 1149 - 1155.
- Bull, J. J., Wichman, H. A. (2001).** Applied evolution. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 32(1): 183 - 217.
- Buss, L. W. (1987).** *The evolution of individuality*. Princeton University Press, Princeton, NJ, (USA).
- Bussell, A. N., Kehoe, D. M. (2014).** *Chromatic acclimation: a many-coloured mechanism for maximizing photosynthetic light harvesting efficiency*. In: The cell biology of cyanobacteria. Caister Academic Press, Wymondham, (UK).
- Camacho, A., Garcia-Pichel, F., Vicente, E., Castenholz, R. W. (1996).** Adaptation to sulfide and to the underwater light field in three cyanobacterial isolates from Lake Arcas (Spain). *FEMS Microbiology Ecology*, 21: 293 - 301.
- Camacho, A., Vicente, E., Miracle, M. R. (2000).** Ecology of a deep-living *Oscillatoria* (= *Planktothrix*) population in the sulphide-rich waters of a Spanish karstic lake. *Archiv für Hydrobiologie*, 148: 333 - 355.
- Camacho, A., Rochera, C., Silvestre, J.J., Vicente, E., Martin, W. H. (2005).** Spatial dominance of inorganic carbon assimilation by conspicuous autotrophic biofilms in a physical and chemical gradient of a cold sulphurous spring: the role of different ecological strategies. *Microbial Ecology*, 50: 172 – 184.
- Campbell, D., Hurry, V., Clarke, A. K., Gustafsson, P., Öquist, G. (1998).** Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3): 667 - 683.
- Campisi, J., Kim, S. H., Lim, C. S., Rubio, M. (2001).** Cellular senescence, cancer and aging: The telomere connection. *Experimental Gerontology*, 36: 1619 – 1637.
- Canfield, D. E. (1998).** A new model for Proterozoic ocean chemistry. *Nature*, 396(6710): 450 - 453.
- Cardona, T. (2017).** Photosystem II is a chimera of reaction centers. *Journal of Molecular Evolution*, 84: 149 – 151.
- Cardona, T. (2018).** Early Archean origin of heterodimeric Photosystem I. *Heliyon* 4: e00548.
- Cardona, T. (2019).** Thinking twice about the evolution of photosynthesis. *Open Biology*, 9: 180246.

- Cardona, T., Sánchez-Baracaldo, P., Rutherford, A. W., Larkum, A. W. D. (2019).** Early Archean origin of Photosystem II. *Geobiology* 17: 127 – 150.
- Cardona, T., Rutherford, A. W. (2019).** Evolution of photochemical reaction centres: more twists? *Trends in Plant Science*, 24: 1008 – 1021
- Carja, O., Plotkin, J. B. (2019).** Evolutionary rescue through partly heritable phenotypic variability. *Genetics*, 211(3): 977 - 988.
- Carroll, R. L. (1997).** *Patterns and processes of vertebrate evolution*. Cambridge University Press, Cambridge, (UK), pp. 448.
- Carroll, R. L. (2000).** Towards a new evolutionary synthesis. *Trends in Ecology & Evolution*, 15: 27 – 32.
- Carroll, S. B. (2001).** Chance and necessity: the evolution of morphological complexity and diversity. *Nature*, 409: 1102 – 1109.
- Carroll, R. L. (2002).** Evolution of the capacity to evolve. *Journal of Evolutionary Biology*, 15: 911 – 921.
- Castenholz, R. W. (1977).** The effect of sulfide on the blue-green algae of hot springs II. Yellowstone National Park. *Microbial Ecology*, 3: 79 – 105.
- Castenholz, R. W., Utkilen, H. C. (1984).** Physiology of sulfide tolerance in a thermophilic *Oscillatoria*. *Archives of Microbiology*, 138: 299 – 305
- Castenholz, R. W., Jørgensen, B. B., D'Amelio, E., Bauld, J. (1991).** Photosynthetic and behavioral versatility of the cyanobacterium *Oscillatoria boryana* in a sulfide-rich microbial mat. *FEMS Microbiology Letters*, 86(1): 43 - 57.
- Castenholz, R. W., Wilmotte, A., Herdman, M., Rippka, R., Waterbury, J. B., Iteman, I., Hoffmann, L. (2001).** *Phylum BX. cyanobacteria*. In: Bergey's manual® of systematic bacteriology, Springer, New York, (USA). pp. 473-599.
- Castle, W. E., Allen, G. M. (1903).** Contributions from the zoological laboratory of the museum of comparative zoology at Harvard College - No. 142. *American Academy of Arts and Sciences, Boston Proceedings* (1846-1906), 38: 601.
- Cavalier-Smith, T. (1991).** Cell diversification in heterotrophic flagellates. *The Biology of Free-living Heterotrophic Flagellates*, 113-131.
- Cavalier-Smith, T., Brasier, M., Embley, T. M. (2006).** Introduction: how and when did microbes change the world? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361(1470): 845 - 850.

- Chai, Y., Norman, T., Kolter, R., Losick, R. (2010).** An epigenetic switch governing daughter cell separation in *Bacillus subtilis*. *Genes & development*, 24(8): 754 - 765.
- Chao, L., Levin, B. R. (1981).** Structured habitats and the evolution of anticompetitor toxins in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78: 6324 – 6328.
- Chen, H., Lin, F., Xing, K., He, X. (2015).** The reverse evolution from multicellularity to unicellularity during carcinogenesis. *Nature communications*, 6: 6367.
- Clayton, R. K. (1980).** *Photosynthesis: physical mechanisms and chemical patterns*. Cambridge University Press, Cambridge, (UK), pp. 283.
- Cline, J. D. (1969).** Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnology and Oceanography*, 14(3), 454 - 458.
- Cloud, P. (1972).** A working model of the primitive Earth. *American Journal of Science*, 272(6): 537 - 548.
- Cohen, Y., Jørgensen, B. B., Paden, E., Shilo, M. (1975a).** Sulfide dependent anoxygenic photosynthesis in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*. *Nature*, 257: 489 – 492.
- Cohen, Y., Paden E., Shilo M. (1975b).** Facultative anoxygenic photosynthesis in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*. *Journal of Bacteriology*, 123: 855 – 861.
- Cohen, Y., M. Goldberg, W. E. Krumbein, M. Shilo. (1977).** Solar Lake (Sinai).1. Physical and chemical limnology. *Limnology and Oceanography*, 22: 597 – 607.
- Cohen, Y., Jørgensen, B. B., Revsbech, N. P., Poplawski, R. (1986).** Adaptation to hydrogen sulfide of oxygenic and anoxygenic photosynthesis among cyanobacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 51: 398 – 407.
- Cohen, Y., Castenholz, R. W., Halvorson, H. O. (1984).** *Microbial mats: stromatolites*. Alan R. Liss. Inc., New York, (USA).
- Cohen, Y., Gurevitz, M. (1991).** *The cyanobacteria-ecology, physiology, and molecular genetics*. The prokaryotes, 2nd ed., Springer-Verlag, New York, (USA) pp. 2079–2104.
- Collins, S., De Meaux, J. (2009).** Adaptation to different rates of environmental change in *Chlamydomonas*. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 63: 2952 - 2965.
- Connell, J. H. (1961).** The influence of interspecific competition and other factors on the distribution of the barnacle *Chthamalus stellatus*. *Ecology*, 42(4): 710 - 723.

- Conway, M. S. (2010).** Evolution: like any other science it is predictable. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1537): 133 - 145.
- Cooper, S. (1991).** *Bacterial growth and division. Biochemistry and Regulation of Prokaryotic and Eukaryotic Division Cycles.* Academic Press INC, San Diego, (USA), pp. 501.
- Cooper, C. E., Brown, G. C. (2008).** The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: chemical mechanism and physiological significance. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 40(5): 533.
- Cooper, T.F., Remold, S. K., Lenski, R. E., Schneider, D. (2008).** Expression profiles reveal parallel evolution of epistatic interactions involving the CRP regulon in *Escherichia coli*. *PLoSGenet*, 4: e35.
- Cooper, V. S., Lenski, R. E. (2000).** The population genetics of ecological specialization in evolving *Escherichia coli* populations. *Nature*, 407(6805): 736 - 739.
- Costas, E., Carrillo, E., Ferrero, L.M., Agrelo, M., García-Villada, L., Juste, J., López-Rodas, V. (2001).** Mutation of algae from sensitivity to resistance against environmental selective agents: the ecological genetics of *Dictyosphaerium chlorelloides* (Chlorophyceae) under lethal doses of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea herbicide. *Phycologia*, (40): 391 – 398.
- Costas, E., Flores-Moya, A., Perdígones, N., Maneiro, E., Blanco, J. L., García, M. E., López-Rodas, V. (2007).** How eukaryotic algae can adapt to the Spain's Rio Tinto: a neo-Darwinian proposal for rapid adaptation to an extremely hostile ecosystem. *New Phytologist*, (175): 334 - 339.
- Costas, E., Flores-Moya, A., López-Rodas, V. (2008).** Rapid adaptation of phytoplankters to geothermal waters is achieved by single mutations: were extreme environments 'Noah's Arks' for photosynthesizers during the Neoproterozoic 'snowball Earth'? *New Phytologist*, (180): 922-932.
- Costas, E., Huertas, I. E., Baselga-Cervera, B., García-Balboa, C., López-Rodas, V. (2014).** Phytoplankton ability to physiological acclimatization and genetic adaptation to global warming. *International Journal of Biology*, 6(4): 24 – 36.
- Couce, A., Tenailon, O. A. (2015).** The rule of declining adaptability in microbial evolution experiments. *Frontiers in genetics*, (6): 99.

- Coulter, W. H. (1956).** High speed automatic blood cell counter and cell size analyzer. *Proceedings of the National Electronics Conference (12)*: 1034 – 1040.
- Coustau, C., Chevillon, C., Ffrench-Constant, R. (2000).** Resistance to xenobiotics and parasites: can we count the cost? *Trends in Ecology and Evolution*, (15): 378 - 383.
- Crow, J. F., Kimura, M. (1970).** *Introduction to Population Genetics Theory*. Harper & Row, New York, (USA), pp. 591.
- Culver, D. A., Brunskill, G. J. (1969).** Fayetteville Green Lake, New York. 5. Studies of primary production and zooplankton grazing in a meromictic marl lake. *Limnology and Oceanography*, 14: 862 - 873.
- Czczuga, B. (1968).** An attempt to determine the primary production of the green sulfur bacteria, *Chlorobium limicola*, Nads, (Chlorobacteriaceae). *Hydrobiology*, 31: 317 - 333.
- Darwin, C. (1859).** *On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life*. John Murray, London, (UK).
- Darwin, C. (1972).** *The origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life*. John Murray, London, (UK).
- Dawkins, R. (1996).** *The Blind Watchmaker*. Norton & Company, New York, (USA).
- Dawkins, R. (2002).** The reading of the Darwin - Wallace papers commemorated – in the Royal Academy of Arts. *Linnean*, 18: 17 – 24.
- Demmig-Adams, B., Adams III, W. W. (1992).** Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual review of plant biology*, 43(1): 599 - 626.
- Dettman, J. R., Anderson, J. B., Kohn, L. M. (2008).** Divergent adaptation promotes reproductive isolation among experimental populations of the filamentous fungus *Neurospora*. *BMC Evolutionary Biology*, 8(1): 35.
- Dick, G. J., Grim, S. L., Klatt, J. M. (2018).** Controls on O<sub>2</sub> production in cyanobacterial mats and implications for Earth's oxygenation. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, (46): 123 - 147.
- Dobzhansky, T. (1937).** *Genetics and the origin of species*. Columbia University Press, New York, (USA).
- Dobzhansky, T. (1970).** *Genetics of the evolutionary process*. Columbia University Press, New York, (USA).

- Dobzhansky, T. (1973).** Nothing in biology makes sense except in the light of evolution. *The American Biology Teacher*, 35: 125 – 129.
- Dodds, W. K., Castenholz, R. W. (1990).** Sulfide and pH effects on variable fluorescence of photosystem II in two strains of the cyanobacterium *Oscillatoria amphigranulata*. *Photosynthesis Research*, 24: 265 – 271.
- Douglas, S., Douglas, D. D. (2000).** Environmental scanning electron microscopy studies of colloidal sulfur deposition in a natural microbial community from a cold sulfide spring near Ancaster, Ontario, Canada. *Geomicrobiology Journal*, 17(4): 275 - 289.
- Drews, G. (2011).** *The evolution of cyanobacteria and photosynthesis*. In: Bioenergetic Processes of Cyanobacteria. Springer, Dordrecht, (The Netherlands), pp. 265 - 284.
- Dring, M. J. (1982).** *The biology of marine plants. Contemporary Biology Series*. Edward Arnold, Maryland (USA), pp. 199.
- Driscoll, W. W., Travisano, M. (2017).** Synergistic cooperation promotes multicellular performance and unicellular free-rider persistence. *Nature communications*, 8(1): 1-10.
- Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, I., ...& Goffard, N. (2004).** Genome evolution in yeasts. *Nature*, 430(6995): 35.
- Dykhuisen, D.E., Hartl, D.L. (1983).** Selection in chemostats. *Microbiological Review*, 47: 150 – 168.
- Edwards, G., Walker, D. (1983).** *C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> Mechanisms, Cellular and Environmental Regulation of Photosynthesis*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, (UK), pp. 552.
- Elena, S. F., de Visser, J. A. G. (2003).** Environmental stress and the effects of mutation. *Journal of biology*, 2(2): 12.
- Elena, S. F., Lenski, R. E. (2003).** Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation. *Nature Reviews Genetics*, 4(6): 457 – 469.
- Ereshefsky, M., Pedroso, M. (2015).** Rethinking evolutionary individuality. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(33): 10126 - 10132.
- Fernández-Arjona, M. M., Bañares-España, E., García-Sánchez, M.J., Hernández-López, M., López-Rodas, V., Costas, E., Flores-Moya, A. (2013).** Disentangling mechanisms involved in the adaptation of photosynthetic microorganisms to the

- extreme sulphureous water from Los Baños de Vilo (S Spain). *Microbial Ecology*, 66: 742 – 751.
- Ferris, M. J., Ruff-Roberts, A. L., Kopezynski, E. D., Bateson, M. M., Ward, D. M. (1996).** Enrichment culture and microscopy conceal diverse thermophilic *Synechococcus* population in single hot spring microbial mat habitat. *Applied and Environmental Microbiology*, (62), 1045 – 1050.
- Finnerty, J. R., Martindale, M. Q. (1999).** Ancient origins of axial patterning genes: Hox genes and ParaHox genes in the Cnidaria. *Evolution & development*, 1(1): 16 - 23.
- Finnerty, J. R. (2003).** The origins of axial patterning in the metazoa: how old is bilateral symmetry? *International Journal of Developmental Biology*, 47(7 - 8): 523 - 529.
- Fisher, A. T. (2005).** Marine hydrogeology: recent accomplishments and future opportunities. *Hydrogeology Journal*, 13(1): 69 - 97.
- Fisher, R. M., Cornwallis, C. K., West, S. A. (2013).** Group formation, relatedness, and the evolution of multicellularity. *Current Biology*, 23(12): 1120 - 1125.
- Fleagle, J. G. (2001).** The unfused synthesis. *Evolutionary Anthropology*, (10): 191.
- Flores, E., Herrero, A. (2014).** *The cell biology of cyanobacteria*. Caister Academic Press, Norfolk, (UK), pp. 308.
- Flores-Moya, A., Costas, E., Bañares-España, E., García-Villada, L., Altamirano, M., López-Rodas, V. (2005).** Adaptation of *Spirogyra insignis* (Chlorophyta) to an extreme natural habitat environment (sulphureous waters) through preselective mutations. *New Phytologist*, 166: 655 - 661.
- Flores-Moya, A., Costas, E., López-Rodas, V. (2008).** Roles of adaptation, chance and history in the evolution of the dinoflagellate *Prorocentrum triestinum*. *Naturwissenschaften*, 95: 697 - 703.
- Flores-Moya, A., Rouco, M., García-Sánchez, M. J., García-Balboa, C., González, R., Costas, E., López-Rodas, V. (2012).** Effects of adaptation, chance and history on the evolution of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* under selection of increased temperature and acidification. *Ecology and Evolution*, 2: 1251 - 1259.
- Foster, P. L. (2006).** Methods for determining spontaneous mutation rates. *Methods in Enzymology*, 409: 195 – 213.

- Frigaard, N. U., Dahl, C. (2008).** Sulfur metabolism in phototrophic sulfur bacteria. *Advances in microbial physiology*, (54): 103 - 200.
- Furusawa, C., Kaneko, K. (1998).** Emergence of multicellular organisms with dynamic differentiation and spatial pattern. *Artificial life*, 4(1): 79 - 93.
- Futuyma, D. J. (1995).** The uses of evolutionary biology. *Science-AAAS-Weekly Paper Edition*, 267(5194): 41 - 42.
- García-Pichel, F. (2008).** Molecular ecology and environmental genomics of cyanobacteria. In: *The Cyanobacteria. Molecular biology, genomics and evolution*. Caister Academic Press, Norfolk, (UK), pp. 59 - 87.
- García-Pichel, F., Castenholz, R. W. (1990).** Comparative anoxygenic photosynthetic capacity in 7 strains of a thermophilic cyanobacterium. *Archives of Microbiology*, 153: 344 - 351.
- García-Villada, L., Rico, M., Altamirano, M., Sánchez-Martín, L., López-Rodas, V., Costas, E. (2004).** Occurrence of copper resistant mutants in the toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*: characterisation and future implications in the use of copper sulphate as algacide. *Water research*, 38(8): 2207 - 2213.
- Garland, T. Jr., Rose, M. R. (2009).** *Experimental Evolution: Concepts, Methods, and Applications of Selection Experiments*. University of California Press, Berkeley, (USA), pp. 730.
- Genty, B., Briantais, J. M., Baker, N. R. (1989).** The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 990(1): 87 - 92.
- Van Gestel, J., Tarnita, C. E. (2017).** On the origin of biological construction, with a focus on multicellularity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(42): 11018 - 11026.
- Giner, M., Montoya, M. J., Vázquez, M. A., Miranda, C., Miranda, M. J., Pérez-Cano, R. (2016).** ¿Qué son los microARNs? Posibles biomarcadores y dianas terapéuticas en la enfermedad osteoporótica. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 8(1): 40 - 44.
- Goddard, M. R., Godfray, C. J., Burt, A. (2005).** Sex increases the efficacy of natural selection in experimental yeast populations. *Nature*, 434: 636 - 640.
- Goldschmidt, R. (1940).** *The material basis of evolution*. Yale University Press, New Haven, (USA).



- Gomulkiewicz, R., Holt, R. D. (1995).** When does evolution by natural selection prevent extinction? *Evolution*, 49(1): 201 - 207.
- Gonzalez, A., Ronce, O., Ferriere, R., Hochberg, M. E. (2013).** Evolutionary rescue: an emerging focus at the intersection between ecology and evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 368: 20120404.
- Good, B. H., Desai, M. M. (2015).** The impact of macroscopic epistasis on long - term evolutionary dynamics. *Genetics*, 199(1): 177 - 190.
- Gould, J. L. (1989).** *Sexual selection*. Scientific American Library, New York, (USA).
- Gould, N. E. S. J., Eldredge, N. (1972).** Punctuated equilibria: an alternative to phyletic gradualism. *Essential readings in evolutionary biology*, 82 - 115.
- Gould, S. J. (1970).** Dollo on Dollo's law: irreversibility and the status of evolutionary laws. *Journal of the History of Biology*, 3(2): 189-212.
- Gould, S. J. (1985).** *The flamingo's smile: Reflections in natural history*. WW Norton & Company, New York, (USA).
- Gould, S. J. (2002).** *The structure of evolutionary theory*. Harvard University Press, Cambridge, (USA).
- Griesbeck, C., Hauska, G., Schütz, M. (2000).** Biological sulfide oxidation: sulfide-quinone reductase (SQR), the primary reaction. *Recent research Developments in Microbiology*, 4: 179 - 203.
- Griffin, A. S., West, S. A., Buckling, A. (2004).** Cooperation and competition in pathogenic bacteria. *Nature*, 430(7003): 1024 - 1027.
- Grim, S. L., Dick, G. J. (2016).** Photosynthetic versatility in the genome of *Geitlerinema* sp. PCC 9228 (formerly *Oscillatoria limnetica* 'Solar Lake'), a model anoxygenic photosynthetic cyanobacterium. *Frontiers in microbiology*, 7: 1546.
- Grosberg, R. K., Strathmann, R. R. (1998).** One cell, two cell, red cell, blue cell: The persistence of a unicellular stage in multicellular life histories. *Trends in Ecology and Evolution*, 13(3): 112 – 116.
- Grosberg, R. K., Strathmann, R. R. (2007).** The evolution of multicellularity: a minor major transition? *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 38: 621 - 654.
- Hagerman, L. (1998).** Physiological flexibility; a necessity for life in anoxic and sulphidic habitats. *Hydrobiologia*, 375(0): 241 - 254.

- Haldane, J. B. S. (1956).** The relation between density regulation and natural selection. *Proceedings of the Royal Society of London B, Biological Sciences*, 145: 306 - 308.
- Hamede, R. K., McCallum, H., Jones, M. (2013).** Biting injuries and transmission of Tasmanian devil facial tumour disease. *Journal of Animal Ecology*, 82(1), 182 - 190.
- Hamilton, T. L., Bryant, D. A., Macalady, J. L. (2016).** The role of biology in planetary evolution: cyanobacterial primary production in low-oxygen Proterozoic oceans. *Environmental microbiology*, 18(2): 325 - 340.
- Hamilton, T. L., Klatt, J. M., De Beer, D., Macalady, J. L. (2018).** Cyanobacterial photosynthesis under sulfidic conditions: insights from the isolate *Leptolyngbya* sp. strain hensonii. *The ISME Journal*, 12(2): 568 - 584.
- Hamilton, W. D. (1964).** The genetical evolution of social behaviour. *Journal of Theoretical Biology*, 7: 1 – 16.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., Ryan, P. D. (2001).** PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontological Association*, 4: 1 - 9. [http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm)
- Hammerschmidt, K., Rose, C. J., Kerr, B., Rainey, P. B. (2014).** Life cycles, fitness decoupling and the evolution of multicellularity. *Nature*, 515(7525): 75 - 79.
- Hayes, J. M., Waldbauer, J. R. (2006).** The carbon cycle and associated redox processes through time. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 361: 931 – 950.
- Herron, M. D., Michod, R. E. (2008).** Evolution of complexity in the volvocine algae: Transitions in individuality through Darwin's eye. *Evolution*, 62: 436 - 451.
- Ho, M. W., Saunders, P. T. (1979).** Beyond neo-Darwinism - an epigenetic approach to evolution. *Journal of theoretical Biology*, 78(4): 573 - 591.
- Hofmann, H. J. (1976).** Precambrian microflora, Belcher Islands, Canada: significance and systematics. *Journal of Paleontology*, 50: 1040 - 1073.
- Hohmann-Marriott, M. F., Blankenship, R. E. (2011).** Evolution of photosynthesis. *Annual review of plant biology*, 62: 515 - 548.
- Holland, H. D. (1984).** *The Chemical Evolution of the Atmosphere and Oceans*. Princeton University Press, Princeton, N. J. (USA), pp. 585.
- Hölscher, T., Bartels, B., Lin, Y. C., Gallegos-Monterrosa, R., Price-Whelan, A., Kolter, R., Dietrich, L. E. P., Kovács, Á. T. (2015).** Motility, chemotaxis and



- aerotaxis contribute to competitiveness during bacterial pellicle biofilm development. *Journal of molecular biology*, 427(23): 3695 - 3708.
- Hopf, F. A., Valone, T. J., Brown, J. H. (1993).** Competition theory and the structure of ecological communities. *Evolutionary Ecology*, 7(2): 142 - 154.
- Horton, P., Ruban, A. V., Walters, R. G. (1996).** Regulation of light harvesting in green plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47(1): 655 – 684.
- Housecroft, C. E., Constable, E. C. (2001).** *Chemistry: An Introduction to Organic, Inorganic, and Physical Chemistry*, 2nd ed. Prentice Hall, New Jersey, (USA).
- Howsley, R., Pearson, H. W. (1979).** pH dependent sulphide toxicity to oxygenic photosynthesis in cyanobacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 6(5): 287 - 292.
- Huertas, I. E., Rouco, M., López-Rodas, V., Costas, E. (2010).** Estimating the capability of different phytoplankton groups to adapt to contamination: herbicides will affect phytoplankton species differently. *New Phytologist*, 188(2): 478 - 487.
- Huertas, I. E., Rouco, M., López-Rodas, V., Costas, E. (2011).** Warming will affect phytoplankton differently: evidence through a mechanistic approach. *Proceedings of the Royal Society B*, 278(1724): 3534 - 3543.
- Hughes, A. L. 1999.** *Adaptive evolution of genes and genomes*. Oxford University Press, New York, (USA).
- Huxley, J. S. (1942).** *Evolution: the modern synthesis*. Allen and Unwin, London, (UK), pp. 645.
- IGME-JA. (1991).** Evaluación del Estado Actual de las Aguas Minerales en la Comunidad Autónoma de Andalucía (Convenio Marco de asistencia técnica entre el Instituto Tecnológico y Geominero de España y la Consejería de Economía y Hacienda de la Junta de Andalucía) Disponible online: [http://info.igme.es/SidPDF%5C034000%5C671%5CMemoria%5C34671\\_0001.pdf](http://info.igme.es/SidPDF%5C034000%5C671%5CMemoria%5C34671_0001.pdf)
- Ispolatov, I., Ackermann, M., Doebeli, M. (2012).** Division of labour and the evolution of multicellularity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1734): 1768 - 1776.
- Jablonski, D. (1986).** Background and mass extinctions: The alternation of macroevolutionary regimes. *Science*, 231(4724): 129 - 133.
- Jacob, F. (1977).** Evolution and tinkering. *Science*, 196(4295): 1161 - 1166.

- Jiménez-Sánchez, J., De la Hera Portillo, A.; Rubio Campos, J. C., Hueso-Quesada, L. M. (2011).** *Informe de caracterización hidrogeológica y propuesta de protección de manantiales y lugares de interés hidrogeológico (Málaga).*
- Jodłowska, S., Latała, A. (2010).** Photoacclimation strategies in the toxic cyanobacterium *Nodularia spumigena* (Nostocales, Cyanobacteria). *Phycologia* (49): 203 - 211.
- Johnsen, G., Sakshaug, E. (1993).** Bio-optical characteristics and photoadaptive responses in the toxic and bloom-forming dinoflagellates *Gyrodinium aureolum*, *Gymnodinium galatheanum*, and two strains of *Prorocentrum minimum*. *Journal of Phycology*, 29(5): 627 - 642.
- Jørgensen, B. B., Cohen, Y., Revsbech, N. P. (1986).** Transition from anoxygenic to oxygenic photosynthesis in a *Microcoleus chthonoplastes* cyanobacterial mat. *Applied and Environmental Microbiology*, (51): 408 – 417.
- Jørgensen, B. B., Revsbech, N. P., Blackburn, T. H., Cohen, Y. (1979).** Diurnal cycle of oxygen and sulfide microgradients and microbial photosynthesis in a cyanobacterial mat sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, 38(1): 46 - 58.
- Joyce, G. F. (2002).** The antiquity of RNA-based evolution. *Nature*, 418(6894): 214 - 221.
- Kabil, O., Banerjee, R. (2010).** Redox biochemistry of hydrogen sulfide. *Journal of Biological Chemistry*, 285(29): 21903 - 21907.
- Kaiser, D. (2001).** Building a multicellular organism. *Annual review of genetics*, 35(1): 103 - 123.
- Kaltz, O., Bell, G. (2002).** The ecology and genetics of fitness in *Chlamydomonas*. XII. Repeated sexual episodes increase rates of adaptation to novel environments. *Evolution*, 56(9): 1743 - 1753.
- Karathia, H., Vilaprinyo, E., Sorribas, A., Alves, R. (2011).** *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism: a comparative study. *PLoS ONE*, 6(2).
- Karhu, J. A., Holland, H. D. (1996).** Carbon isotopes and the rise of atmospheric oxygen. *Geology*, 24(10): 867 - 870.
- Kato, T., Watanabe, M. F., Watanabe, M. (1991).** Allozyme divergence in *Microcystis* (Cyanophyceae) and its taxonomic inference. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes*, 129 - 140.

- Kawecki, T. J., Lenski, R. E., Ebert, D., Hollis, B., Olivieri, I., Whitlock, M. C. (2012).** Experimental evolution. *Trends in ecology and evolution*, 27(10): 547 - 560.
- Khare, A., Santorelli, L. A., Strassmann, J. E., Queller, D. C., Kuspa, A., Shaulsky, G. (2009).** Cheater - resistance is not futile. *Nature*, 461(7266): 980 - 982.
- Kimura, M., Maruyama, T. (1966).** The mutational load with epistatic gene interactions in fitness. *Genetics*, 54(6): 1337.
- King, N. (2004).** The unicellular ancestry of animal development. *Developmental cell*, 7(3): 313 - 325.
- Kirk, D. L. (2005).** A twelve - step program for evolving multicellularity and a division of labor. *Bioassays*, 27(3): 299 - 310.
- Kirschvink, J. L., Gaidos, E. J., Bertani, L. E., Beukes, N. J., Gutzmer, J., Maepa, L. N., Steinberger, R. E. (2000).** Paleoproterozoic snowball Earth: Extreme climatic and geochemical global change and its biological consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(4): 1400 - 1405.
- Klatt, J. M., Al-Najjar, M. A., Yilmaz, P., Lavik, G., de Beer, D., Polerecky, L. (2015a).** Anoxygenic photosynthesis controls oxygenic photosynthesis in a cyanobacterium from a sulfidic springs. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(6): 2025 - 2031.
- Klatt, J. M., Haas, S., Yilmaz, P., de Beer, D., Polerecky, L. (2015b).** Hydrogen sulfide can inhibit and enhance oxygenic photosynthesis in a cyanobacterium from sulfidic springs. *Environmental microbiology*, 17(9): 3301 - 3313.
- Klatt, J. M., de Beer, D., Häusler, S., Polerecky, L. (2016).** Cyanobacteria in sulfidic spring microbial mats can perform oxygenic and anoxygenic photosynthesis simultaneously during an entire diurnal period. *Frontiers in microbiology*, 7: 1973.
- Klironomos, F. D., Berg, J., Collins, S. (2013).** How epigenetic mutations can affect genetic evolution: model and mechanism. *BioEssays*, 35(6), 571 - 578.
- Knoll, A. H. (1992).** The early evolution of eukaryotes - a geological perspective. *Science*, 256: 622 - 627.
- Knoll, A. H., Bambach, R. K. (2000).** Directionality in the history of life: diffusion from the left wall or repeated scaling of the right? *Paleobiology*, 26(S4): 1 - 14.
- Knoll, A.H. (2003).** *Life on a Young Planet*. Princeton University Press, Princeton, (USA), pp. 276.

- Koerselman, W., Meuleman, A. F. (1996).** The vegetation N: P ratio: a new tool to detect the nature of nutrient limitation. *Journal of applied Ecology*, 1441 - 1450.
- Komárek, J., Anagnostidis, K. (2005).** *Cyanoprokaryota, Part 2: Oscillatoriales, Süßwasserflora von Mitteleuropa, Bd19/2*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, (Germany).
- Komárek, J., Kaštovský, J. (2003).** Adaptability in diversification processes of cyanobacteria; the example of *Synechococcus bigranulatus*. *Algological Studies*, 109(1): 299 - 304.
- Koonin, E. V., Wolf, Y. I. (2012).** Evolution of microbes and viruses: a paradigm shift in evolutionary biology? *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2: 119.
- Kopp, R. E., Kirschvink, J. L., Hilburn, I. A., Nash, C. Z. (2005).** The Paleoproterozoic snowball Earth: a climate disaster triggered by the evolution of oxygenic photosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(32): 11131 - 11136.
- Koschwanez, J. H., Foster, K. R., Murray, A. W. (2011).** Sucrose utilization in budding yeast as a model for the origin of undifferentiated multicellularity. *PLoS biology*, 9(8).
- Koschwanez, J. H., Foster, K. R., Murray, A. W. (2013).** Improved use of a public good selects for the evolution of undifferentiated multicellularity. *Elife*, 2: e00367.
- Kristensen, E., Andersen, F. Ø. (1987).** Determination of organic carbon in marine sediments: a comparison of two CHN-analyzer methods. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 109(1): 15 - 23.
- Kryazhimskiy, S., Rice, D. P., Jerison, E. R., Desai, M. M. (2014).** Global epistasis makes adaptation predictable despite sequence-level stochasticity. *Science*, 344(6191): 1519 - 1522.
- Kuranda, M. J., Robbins, P. W. (1991).** Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 266(29): 19758 - 19767.
- Kutschera, U. (2003).** A comparative analysis of the Darwin - Wallace papers and the development of the concept of natural selection. *Theory in Biosciences*, 122(4): 343 - 359.
- Kutschera, U., Niklas, K. J. (2004).** The modern theory of biological evolution: an expanded synthesis. *Naturwissenschaften*, 91(6): 255 - 276.

- Lachapelle, J., Bell, G. (2012).** Evolutionary rescue of sexual and asexual populations in a deteriorating environment. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 66(11): 3508 - 3518.
- Lawrence, N. S., Davis, J., Compton, R. G. (2000).** Analytical strategies for the detection of sulfide: a review. *Talanta*, 52(5): 771 - 784.
- Laws, E. A. (1991).** Photosynthetic quotients, new production and net community production in the open ocean. Deep Sea Research Part A. *Oceanographic Research Papers*, 38(1): 143 - 167.
- Leigh, E. G. (1995).** The major transitions of evolution. *Evolution*, 49: 1302 – 1306.
- Leister, D. (2017).** Experimental evolution in photoautotrophic microorganisms as a means of enhancing chloroplast functions. *Essays in biochemistry*, 62(1): 77 - 84.
- Lemons, D., McGinnis, W. (2006).** Genomic evolution of Hox gene clusters. *Science*, 313(5795): 1918 - 1922.
- Lenski, R. E. (1991).** Quantifying fitness and gene stability in microorganisms. *Biotechnology*, 15: 173 - 192.
- Lenski, R. E., Rose, M. R., Simpson, S. C., Tadler, S. C. (1991).** Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. I. Adaptation and divergence during 2,000 generations. *The American Naturalist*, 138(6): 1315 - 1341.
- Lenski, R. E. (1998).** Bacterial evolution and the cost of antibiotic resistance. *International Microbiology*, 1(4): 265 - 270.
- Lenski, R. E., Travisano, M. (1994).** Dynamics of adaptation and diversification: a 10,000 - generation experiment with bacterial populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(15): 6808 - 6814.
- Leboulanger, C., Bouvy, M., Carré, C., Cecchi, P., Amalric, L., Bouchez, A., Pagano, G., Sarazin, G. (2011).** Comparison of the effects of two herbicides and an insecticide on tropical freshwater plankton in microcosms. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 61(4): 599 - 613.
- Leroi, A. M., Koufopanou, V., Burt, A. (2003).** Cancer selection. *Nature Reviews Cancer*, 3(3): 226 - 231.
- Leu, J. Y., Murray, A.W. (2006).** Experimental evolution of mating discrimination in budding yeast. *Current Biology*, 16(3): 280 - 286.
- Lewontin, R. C. (1966).** Is nature probable or capricious? *BioScience*, 16: 25 - 27.

- Lewontin, R.C. (1974).** *The Genetic Basis of Evolutionary Change*, Columbia University Press, New York, (USA).
- Lindsey, H. A., Gallie, J., Taylor, S., Kerr, B. (2013).** Evolutionary rescue from extinction is contingent on a lower rate of environmental change. *Nature*, 494(7438): 463 - 467.
- Liu, M., Li, J., Wang, W., Jiang, X. (2019).** Immigration shapes evolutionary tolerance to toxic cyanobacteria in two cladoceran grazers. *Hydrobiologia*, 826: 397 - 409.
- Loomis, W. F. (2014).** Cell signaling during development of *Dictyostelium*. *Developmental biology*, 391(1): 1 - 16.
- López-Rodas, V., Agrelo, M., Carrillo, E., Ferrero, L. M., Larrauri, A., Martín-Otero, L., Costas, E. (2001).** Resistance of microalgae to modern water contaminants as the result of rare spontaneous mutations. *European Journal of Phycology*, 36(2): 179 – 190.
- López-Rodas, V., Costas, E., Bañares-España, E., García-Villada, L., Altamirano, M., Rico, M., Salgado, C., Flores-Moya, A. (2006a).** Analysis of polygenic traits of *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) strains by Restricted Maximum Likelihood (REML) procedures: 2. Microcystin net production, photosynthesis and respiration. *Phycologia*, 45(3): 243 - 248.
- López-Rodas, V., Costas, E., García-Villada, L., Flores-Moya, A. (2006b).** Phenotypic evolution in microalgae: a dramatic morphological shift in *Dictyosphaerium chlorelloides* (Chlorophyta) after exposure to TNT. *Acta Botánica Malacitana*, 31: 141 - 147.
- López-Rodas, V., Flores-Moya, A., Maneiro, E., Perdigones, N., Marvá, F., García, M.E., Costas, E. (2007).** Resistance to glyphosate in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* as result of pre-selective mutations. *Evolutionary Ecology*, 21(4): 535 - 547.
- López-Rodas, V., Marvá, F., Costas, E., Flores-Moya, A. (2008a).** Microalgal adaptation to a stressful environment (acidic, metal-rich mine waters) could be due to selection of pre-selective mutants originating in non-extreme environments. *Environmental and Experimental Botany*, 64(1): 43 - 48.
- López-Rodas, V., Marvá, F., Rouco, M., Costas, E., Flores-Moya, A. (2008b).** Adaptation of the chlorophycean *Dictyosphaerium chlorelloides* to stressful acidic,



- mine metal-rich waters as result of pre-selective mutations. *Chemosphere*, 72(5): 703 - 707.
- López-Rodas, V., Costas, E., Maneiro, E., Marvá, F., Rouco, M., Delgado, A., Flores-Moya, A. (2009).** Living in Vulcan's forge: Algal adaptation to stressful geothermal ponds on Vulcano Island (southern Italy) as a result of pre-selective mutations. *Phycological Research*, 57(2): 111 - 117.
- López-Rodas, V., Rouco, M., Sánchez-Fortún, S., Flores-Moya, A., Costas, E. (2011).** Genetic adaptation and acclimation of phytoplankton along a stress gradient in the extreme waters of the Agrio River - Caviahue Lake (Argentina). *Journal of Phycology*, 47(5): 1036 - 1043.
- Luria, S. E., Delbrück, M. (1943).** Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics*, 28: 491.
- Luther, G. W., Findlay, A. J., MacDonald, D. J., Owings, S. M., Hanson, T. E., Beinart, R. A., Girguis, P. R. (2011).** Thermodynamics and kinetics of sulfide oxidation by oxygen: a look at inorganically controlled reactions and biologically mediated processes in the environment. *Frontiers in microbiology*, 2: 62.
- Malmberg, R. L. (1977).** The evolution of epistasis and the advantage of recombination in populations of bacteriophage T4. *Genetics*, 86(3): 607 - 621.
- Mani, G. S., Clarke, B. C. (1990).** Mutational order: a major stochastic process in evolution. *Proceedings of the Royal Society of London. B. Biological Sciences*, 240(1297): 29 - 37.
- Martin, W., Baross, J., Kelley, D., Russell, M. J. (2008).** Hydrothermal vents and the origin of life. *Nature Reviews Microbiology*, 6(11): 805 – 814.
- Martin, W. F., Bryant, D. A., Beatty, J. T. (2018).** A physiological perspective on the origin and evolution of photosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*, 42: 205–231.
- Martín-Clemente, E., Melero-Jiménez, I. J., Bañares-España, E., Flores-Moya, A., García-Sánchez, M. J. (2019).** Adaptation dynamics and evolutionary rescue under sulfide selection in cyanobacteria: a comparative study between *Microcystis aeruginosa* and *Oscillatoria* sp. (cyanobacteria). *Journal of Phycology*, 55(6): 1348 - 1360.
- Masojídek, J., Grobbelaar, J. U., Pechar, L., Koblížek, M. (2001).** Photosystem II electron transport rates and oxygen production in natural waterblooms of freshwater cyanobacteria during a diel cycle. *Journal of Plankton Research*, 23(1): 57 - 66.

- Maynard-Smith, J. Szathmáry, E. (1995).** *The Major Transitions in Evolution*. Oxford University Press, Oxford, (UK).
- Maynard-Smith, J. (1975).** *The Theory of Evolution*. 3rd edn. Penguin Press, London, (UK).
- Mayr, E. (1942).** *Systematics and the origin of species*. Columbia University Press, New York, (USA).
- Mayr, E. (1963).** *Animal species and evolution*. Harvard University Press, Cambridge, (UK).
- Mayr, E. (1982).** *The growth of biological thought: diversity, evolution and inheritance*. Harvard University Press, Cambridge, (UK).
- Mayr, E. (1991).** *One long argument: Charles Darwin and the genesis of modern evolutionary thought*. Harvard University Press, Cambridge, (UK).
- Mayr, E. (1994).** The advance of science and scientific revolutions. *Journal of the History of the Behavioral Sciences*, 30(4): 328 - 334.
- McGregor-Shaw, J. B., Easterbrook, K. B., McBride, R. P. (1973).** A bacterium with echinuliform (nonprosthecate) appendages. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 23(3): 267 - 270.
- Meagher, T. J. (2007).** Is evolutionary biology strategic science? *Evolution*, 61(1): 239 – 244.
- Medina, M., Collins, A. G., Taylor, J. W., Valentine, J. W., Lipps, J. H., Amaral-Zettler, L., Sogin, M. L. (2003).** Phylogeny of Opisthokonta and the evolution of multicellularity and complexity in Fungi and Metazoa. *International Journal of Astrobiology*, 2(3): 203 - 211.
- Melack, J. M., Kilham, P. (1974).** Photosynthetic rates of phytoplankton in East African alkaline, saline lakes 1. *Limnology and oceanography*, 19(5): 743 - 755.
- Melero-Jiménez, I. J, Martín-Clemente, E., García-Sánchez, M. J., Flores-Moya, A., Bañares-España, E. (2019).** Adaptation of the toxic freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to salinity is achieved by the selection of spontaneous mutants. *Phylogenetical Research*, 67(3): 192 - 201.
- Merlo, L. M., Pepper, J. W., Reid, B. J., Maley, C. C. (2006).** Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nature reviews cancer*, 6(12): 924 - 935.
- Metzger, M. J., Reinisch, C., Sherry, J., Goff, S. P. (2015).** Horizontal transmission of clonal cancer cells causes leukemia in soft-shell clams. *Cell*, 161(2): 255 - 263.

- Metzger, M. J., Villalba, A., Carballal, M. J., Iglesias, D., Sherry, J., Reinisch, C., Muttray, A. F., Baldwin, S. A, Goff, S. P. (2016).** Widespread transmission of independent cancer lineages within multiple bivalve species. *Nature*, 534(7609): 705.
- Meyer, J. R., Dobias, D. T., Weitz, J. S., Barrick, J. E., Quick, R. T., Lenski, R. E. (2012).** Repeatability and contingency in the evolution of a key innovation in phage lambda. *Science*, 335(6067), 428 - 432.
- Michaelis, L., Menten, M. L. (1913).** The kinetics of the inversion effect. *Biochem Z*, 49: 333 - 369.
- Michod, R. E. (1997).** Cooperation and conflict in the evolution of individuality. I. Multilevel selection of the organism. *The American Naturalist*, 149(4): 607 - 645.
- Michod, R. E. (2007).** Evolution of individuality during the transition from unicellular to multicellular life. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(suppl. 1): 8613 - 8618.
- Michod, R. E. (1996).** Cooperation and conflict in the evolution of individuality. II. Conflict mediation. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 263(1372), 813 - 822.
- Migdisov, A. A., Williams-Jones, A. E., Lakshtanov, L. Z., Alekhin, Y. V. (2002).** Estimates of the second dissociation constant of H<sub>2</sub>S from the surface sulfidation of crystalline sulfur. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 66(10): 1713 - 1725.
- Miller, S. R., Bebout, B. M. (2004).** Variation in sulfide tolerance of photosystem II in phylogenetically diverse cyanobacteria from sulfidic habitats. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2): 736 - 744.
- Miloshova, M., Baltes, D., Bychkov, E. (2003).** New chalcogenide glass chemical sensors for S<sup>2-</sup> and dissolved H<sub>2</sub>S monitoring. *Water science and technology*, 47(2): 135 - 140.
- Moore, F. B. G., Rozen, D. E., Lenski, R. E. (2000).** Pervasive compensatory adaptation in *Escherichia coli*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 267(1442): 515 - 522.
- Mulkidjanian, A. Y., Koonin, E. V., Makarova, K. S., Mekhedov, S. L., Sorokin, A., Wolf, Y. I., Dufresne, A., Partensky, F., Burd, H., Kaznadzey, D., Haselkorn, R. (2006).** The cyanobacterial genome core and the origin of photosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(35): 13126 - 13131.

- Muller, H. J. (1939).** Reversibility in evolution considered from the standpoint of genetics 1. *Biological Reviews*, 14(3): 261 - 280.
- Murgia, C., Pritchard, J. K., Kim, S. Y., Fassati, A., Weiss, R. A. (2006).** Clonal origin and evolution of a transmissible cancer. *Cell*, 126: 477 - 487.
- Myers, J. L., Richardson, L. L. (2009).** Adaptation of cyanobacteria to the sulfide-rich microenvironment of black band disease of coral. *FEMS microbiology ecology*, 67(2): 242 - 251.
- Nadell, C. D., Drescher, K., Foster, K. R. (2016).** Spatial structure, cooperation and competition in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9): 589.
- Nath, A., Vajpayee, G., Dixit, K., Rahman, A., Kannaujiya, V. K., Sundaram, S. (2017).** Micro-algal consortia complexity enhances ecological biomass stability through CO<sub>2</sub> sequestration. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 8: 19 - 34.
- Neese, R. M., Stearns, S. C. (2008).** The great opportunity: evolutionary applications to medicine and public health. *Evolutionary Applications*, 1(1): 28 - 48.
- Neilan, B. A., Burns, B. P., Relman, D. A., Lowe, D. R. (2002).** Molecular identification of cyanobacteria associated with stromatolites from distinct geographical locations. *Astrobiology*, 2(3): 271 - 280.
- Nichols, S. A., Dirks, W., Pearse, J. S., King, N. (2006).** Early evolution of animal cell signaling and adhesion genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(33): 12451 - 12456.
- Niklas, K. J., Newman, S. A. (2013).** The origins of multicellular organisms. *Evolution & development*, 15(1): 41 - 52.
- Nunney, L. (1985).** Group selection, altruism, and structured-deme models. *The American Naturalist*, 126(2): 212 - 230.
- Ogawa, T., Misumi, M., Sonoike, K. (2017).** Estimation of photosynthesis in cyanobacteria by pulse-amplitude modulation chlorophyll fluorescence: problems and solutions. *Photosynthesis research*, 133(1 - 3): 63 - 73.
- Olson, K. R. (2005).** Vascular actions of hydrogen sulfide in non-mammalian vertebrates. *Antioxid Redox Signal*, 7: 804 - 812.
- Olson, K. R., Straub, K. D. (2016).** The role of hydrogen sulfide in evolution and the evolution of hydrogen sulfide in metabolism and signaling. *Physiology*, 31(1): 60 - 72.
- Oren, A. (1978).** Oxygenic and anoxygenic photosynthesis in *Oscillatoria limnetica*. PhD Thesis, Hebrew University, Jerusalem (Israel).

- Oren, A., E. Padan. (1978).** Induction of anaerobic photoautotrophic growth in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*. *Journal of Bacteriology*, 133: 558 - 563.
- Oren, A., Padan, E., Avron, M. (1977).** Quantum yields for oxygenic and anoxygenic photosynthesis in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(5): 2152 - 2156.
- Oren, A., Padan, E., Malkin, S. (1979).** Sulfide inhibition of photosystem II in cyanobacteria (blue - green algae) and tobacco chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 546(2): 270 - 279.
- Orr, H. A., Unckless, R. L. (2014).** The population genetics of evolutionary rescue. *PLoS Genetics*, 10: e1004551.
- Ostrowski, E. A., Katoh, M., Shaulsky, G., Queller, D. C., Strassmann, J. E. (2008).** Kin discrimination increases with genetic distance in a social amoeba. *PLoS Biology*, 6(11): 2376 – 2383.
- Pachmayr, F. (1960).** Vorkommen und Bestimmung von Schwefel- verbindungen im Mineralwasser. PhD Thesis, Universität München, München, (Germany).
- Padan E. (1979).** Facultative anoxygenic photosynthesis in cyanobacteria. *Annual Review of Plant Physiology*, 30: 27 – 40.
- Pande, S., Shitut, S., Freund, L., Westermann, M., Bertels, F., Colesie, C., Bischofs, I. B. Kost, C. (2015).** Metabolic cross-feeding via intercellular nanotubes among bacteria. *Nature communications*, 6(1): 1 - 13.
- Parida, A., Das, A. B., Das, P. (2002).** NaCl stress causes changes in photosynthetic pigments, proteins, and other metabolic components in the leaves of a true mangrove, *Bruguiera parviflora*, in hydroponic cultures. *Journal of Plant Biology*, 45(1): 28 - 36.
- Parida, A. K., Dagaonkar, V. S., Phalak, M. S., Umalkar, G. V., Aurangabadkar, L. P. (2007).** Alterations in photosynthetic pigments, protein and osmotic components in cotton genotypes subjected to short-term drought stress followed by recovery. *Plant Biotechnology Reports*, 1(1): 37 - 48.
- Pentz, J., Travisano, M., Ratcliff, W. (2014).** Clonal development is evolutionarily superior to aggregation in wild-collected *Saccharomyces cerevisiae*. *Artificial Life Conference Proceedings*, (14): 550 - 554.
- Perkins, F. O., Haas, L. W., Phillips, D. E., Webb, K. L. (1981).** Ultrastructure of a marine *Synechococcus* possessing spinae. *Canadian Journal of Microbiology*, 27(3): 318 - 329.

- Perron, G. G., Gonzalez, A., Buckling, A. (2008).** The rate of environmental change drives adaptation to an antibiotic sink. *Journal of evolutionary biology*, 21(6): 1724 - 1731.
- Prochnik, S. E., Umen, J., Nedelcu, A. M., Hallmann, A., Miller, S. M., Nishii, I., ... Hellsten, U. (2010).** Genomic analysis of organismal complexity in the multicellular green alga *Volvox carteri*. *Science*, 329(5988): 223 - 226.
- Pye, R. J., Pemberton, D., Tovar, C., Tubio, J. M., Dun, K. A., Fox, S., ... Siddle, H. V. (2016).** A second transmissible cancer in Tasmanian devils. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(2): 374 - 379.
- Queller, D. C. (2000).** Relatedness and the fraternal major transitions. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 355(1403): 1647 - 1655.
- R Core Team. (2013).** *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>
- Rainey, P. B., Rainey, K. (2003).** Evolution of cooperation and conflict in experimental bacterial populations. *Nature*, 425(6953): 72 - 74.
- Rainey, P. B., Travisano, M. (1998).** Adaptive radiation in a heterogeneous environment. *Nature*, 394(6688): 69 - 72.
- Ramsing, N. B., Köhl, M., Jørgensen, B. B. (1993).** Distribution of sulfate-reducing bacteria, O<sub>2</sub>, and H<sub>2</sub>S in photosynthetic biofilms determined by oligonucleotide probes and microelectrodes. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(11): 3840 - 3849.
- Ratcliff, W. C., Denison, R. F., Borrello, M., Travisano, M. (2012).** Experimental evolution of multicellularity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(5): 1595 - 1600.
- Ratcliff, W. C., Travisano, M. (2014).** Experimental evolution of multicellular complexity in *Saccharomyces cerevisiae*. *BioScience*, 64(5): 383 - 393.
- Raymond, J., Zhaxybayeva, O., Gogarten, J. P., Gerdes, S. Y., Blankenship, R. E. (2002).** Whole-genome analysis of photosynthetic prokaryotes. *Science*, 298(5598): 1616 - 1620.
- Rebeck, C. A., Thomas, R., Breen, M., Leroi, A. M., Burt, A. (2009).** Origins and evolution of a transmissible cancer. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 63(9): 2340 - 2349.

- Rebolleda-Gómez, M., Travisano, M. (2018).** The Cost of Being Big: Local Competition, Importance of Dispersal, and Experimental Evolution of Reversal to Unicellularity. *The American Naturalist*, 192(6): 731 - 744.
- Rebolleda-Gómez, M., Travisano, M. (2019).** Adaptation, chance, and history in experimental evolution reversals to unicellularity. *Evolution*, 73(1): 73 - 83.
- Reboud, X., Majerus, N., Gasquez, J., Powles, S. (2007).** *Chlamydomonas reinhardtii* as a model system for pro-active herbicide resistance evolution research. *Biological Journal of the Linnean Society*, 91(2): 257 - 266.
- Reid, R. P., Visscher, P. T., Decho, A., Stolz, J. K., Bebout, B. M., Dupraz, C., Macintyre, I. G., Paerl, H. W., Pinckney, J. L., Prufert-Bebout, L., Steppe T. F., DesMarais, D. J. (2000).** The role of microbes in accretion, lamination and early lithification of modern marine stromatolites. *Nature*, 406(6799): 989 - 992.
- Reif, W-E., Junker, T., Hoßfeld, U. (2000).** The synthetic theory of evolution: general problems and the German contribution to the synthesis. *Theory in Biosciences*, 119(1): 41 - 91.
- Reinartz, M., Tschäpe, J., Brüser, T., Trüper, H. G., Dahl, C. (1998).** Sulfide oxidation in the phototrophic sulfur bacterium *Chromatium vinosum*. *Archives of Microbiology*, 170(1): 59 - 68.
- Rensch, B. (1947).** Neuere Probleme der Abstammungslehre. Die transspezifische Evolution. Enke, Stuttgart, (Germany).
- Reul, A., Muñoz, M., Bautista, B., Neale, P. J., Sobrino, C., Mercado, J. M., ... Van de Poll, W. H. (2014).** Effect of CO<sub>2</sub>, nutrients and light on coastal plankton. III. Trophic cascade, size structure and composition. *Aquatic Biology*, (2): 59 - 76.
- Reul, A., Martín-Clemente, E., Melero-Jiménez, I. J., Bañares-España, E., Flores-Moya, A., García-Sánchez, M. J. (2020).** What Triggers the Annual Cycle of Cyanobacterium *Oscillatoria* sp. in an Extreme Environmental Sulfide-Rich Spa? *Water*, 12(3): 883.
- Richardson, L. L., Castenholz, R. W. (1987).** Diel vertical movements of the cyanobacterium *Oscillatoria terebriformis* in a sulfide-rich hot spring microbial mat. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(9): 2142 - 2150.
- Rogers, D.W., Greig, D. (2009).** Experimental evolution of a sexually selected display in yeast. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1656): 543 – 549.

- Rokas, A. (2008).** The molecular origins of multicellular transitions. *Current opinion in genetics & development*, 18(6): 472 - 478.
- Romero, J., López-Rodas, V. Costas, E. (2012).** Estimating the capability of microalgae to physiological acclimatization and genetic adaptation to petroleum and diesel oil contamination. *Aquatic Toxicology*, 124: 227 - 37.
- Rosche, W. A., Foster, P. L. (2000).** Determining mutation rates in bacterial populations. *Methods*, 20: 4 - 17.
- Rossetti, V., Schirrmeister, B. E., Bernasconi, M. V., Bagheri, H. C. (2010).** The evolutionary path to terminal differentiation and division of labor in cyanobacteria. *Journal of Theoretical Biology*, 262: 23 - 34.
- Rouco, M., López-Rodas, V., González, R., Huertas, I. E., García-Sánchez, M. J., Flores-Moya A., Costas, E. (2014).** The limit of the genetic adaptation to copper in freshwater phytoplankton. *Oecologia*, 175(4): 1179 - 1188.
- Ruangsomboon, S. (2015).** Enhanced Production of Polysaccharide and Protein content in cyanobacterium *Oscillatoria limnetica* as a defense mechanism against low pH and Pb<sup>+2</sup>. *Chiang Mai Journal of Science*, 42: 34 - 43.
- Rudi, K., Skulberg, O. M., Jakobsen, K. S. (1998).** Evolution of cyanobacteria by exchange of genetic material among phylogenetically related strains. *Journal of bacteriology*, 180(13): 3453 - 3461.
- Ruiz-Trillo, I., Burger, G., Holland, P. W., King, N., Lang, B. F., Roger, A. J., Gray, M. W. (2007).** The origins of multicellularity: a multi-taxon genome initiative. *Trends in Genetics*, 23(3): 113 - 118.
- Sachs, J. L., Mueller, U. G., Wilcox, T. P., Bull, J. J. (2004).** The evolution of cooperation. *The Quarterly review of biology*, 79(2): 135 - 160.
- Sachs, J. L. (2008).** Resolving the first steps to multicellularity. *Trends in ecology & evolution*, 23(5): 245 - 248.
- Sagan, L. (1967).** On the origin of mitosing cells. *Journal of Theoretical Biology*, 14: 225 - 275.
- Sánchez-Baracaldo, P., Cardona, T. (2020).** On the origin of oxygenic photosynthesis and Cyanobacteria. *New Phytologist*, 225(4): 1440 - 1446.
- Sanchez-Baracaldo, P., Hayes, P. K., Blank, C. E. (2005).** Morphological and habitat evolution in the Cyanobacteria using a compartmentalization approach. *Geobiology*, 3(3): 145 - 165.





- Sanjuan, R., Cuevas, J. M., Moya, A., Elena, S. F. (2005).** Epistasis and the adaptability of an RNA virus. *Genetics*, 170(3): 1001 - 1008.
- Santorelli, L. A., Thompson, C. R., Villegas, E., Svetz, J., Dinh, C., Parikh, A., ... Shaulsky, G. (2008).** Facultative cheater mutants reveal the genetic complexity of cooperation in social amoebae. *Nature*, 451(7182): 1107 - 1110.
- Sathe, S., Durand, P. M. (2016).** Cellular aggregation in *Chlamydomonas* (Chlorophyceae) is chimaeric and depends on traits like cell size and motility. *European Journal of Phycology*, 51(2): 129 - 138.
- Schirrmeister, B. E., Antonelli, A., Bagheri, H. C. (2011).** The origin of multicellularity in cyanobacteria. *BMC evolutionary biology*, 11(1): 45.
- Schirrmeister, B. E., de Vos, J. M., Antonelli, A., Bagheri, H. C. (2013).** Evolution of multicellularity coincided with increased diversification of cyanobacteria and the Great Oxidation Event. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(5): 1791 - 1796.
- Schopf, J. W. (1993).** Microfossils of the Early Archean Apex chert: new evidence of the antiquity of life. *Science*, 260: 640 - 646.
- Schopf, J. W. (1999).** *Cradle of life: the discovery of earth's earliest fossils*. Princeton University Press, Princeton, (USA), pp. 347.
- Schopf, J. W. (2011).** The paleobiological record of photosynthesis. *Photosynthesis research*, 107(1): 87 - 101.
- Schopf, J. W., Haugh, B. N., Molnar, R. E., Satterthwait, D. F. (1973).** On the development of metaphytes and metazoans. *Journal of Paleontology*, 1-9.
- Schoustra, S., Rundle, H. D., Dali, R., Kassen, R. (2010).** Fitness - associated sexual reproduction in a filamentous fungus. *Current Biology*, 20(15): 1350 - 1355.
- Schuster, P. (2001).** Evolution in silico and in vitro: the RNA model. *Biological Chemistry*, 382: 1301 - 1314.
- Sebé-Pedrós, A., Chomsky, E., Pang, K., Lara-Astiaso, D., Gaiti, F., Mukamel, Z., ... Tanay, A. (2018).** Early metazoan cell type diversity and the evolution of multicellular gene regulation. *Nature ecology & evolution*, 2(7), 1176 - 1188.
- Sessions, A. L., Doughty, D. M., Welander, P. V., Summons, R. E., Newman, D. K. (2009).** The continuing puzzle of the great oxidation event. *Current Biology*, 19(14): R567 - R574.

- Shahak, Y., Arieli, B., Binder, B., Padan, E. (1987).** Sulfide - dependent photosynthetic electron flow coupled to proton translocation in thylakoids of the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 259: 605 - 615.
- Simpson, G. G. (1944).** *Tempo and mode in evolution* (No. 15). Columbia University Press, N.J., (USA).
- Simpson, C. (2012).** The evolutionary history of division of labour. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1726): 116 - 121.
- Sivaraja, M., Hunziker, D., Dismukes, G. C. (1988).** The reaction of H<sub>2</sub>S with the photosynthetic water - oxidizing complex and its lack of reaction with the primary electron acceptor in spinach. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 936(2): 228 - 235.
- Slawyk, G., MacIsaac, J. J. (1972).** Comparison of two automated ammonium methods in a region of coastal upwelling. *Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts*, 19(7): 521 - 524.
- Smith, T. B., Bernatchez, L. (2008).** Evolutionary change in human - altered environments. *Molecular Ecology*, 17(1): 1 - 8.
- Smolarkiewicz, M., Dhonukshe, P. (2013).** Formative cell divisions: principal determinants of plant morphogenesis. *Plant and Cell Physiology*, 54(3): 333 - 342.
- Sniegowski, P. D., Lenski, R. E. (1995).** Mutation and adaptation: the directed mutation controversy in evolutionary perspective. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 26(1): 553 - 578.
- Sniegowski P. D. (2005).** Linking mutation to adaptation: overcoming stress at the spa. *New Phytologist*, 166(2): 330 - 362.
- Sommer, U., Charalampous, E., Genitsaris, S., Moustaka-Gouni, M. (2017).** Benefits, costs and taxonomic distribution of marine phytoplankton body size. *Journal of Plankton Research*, 39(3): 494 - 508.
- Soo, R. M., Hemp, J., Parks, D. H., Fischer, W. W., Hugenholtz, P. (2017).** On the origins of oxygenic photosynthesis and aerobic respiration in Cyanobacteria. *Science*, 355(6332): 1436 - 1440.
- Sousa, F. M., Pereira, J. G., Marreiros, B. C., Pereira, M. M. (2018).** Taxonomic distribution, structure/function relationship and metabolic context of the two families

- of sulfide dehydrogenases: SQR and FCSD. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1859(9): 742 - 753.
- Souza, V., Turner, P., Lenski, R. (1997).** Long-term experimental evolution in *Escherichia coli* IV: effects of recombination with exogenous genotypes on evolutionary dynamics. *Journal of Evolutionary Biology*, 10: 743 - 769.
- Souza, V., Castillo, A., Eguiarte, L. E. (2002a).** Evolutionary ecology of *Escherichia coli*. *American Scientist*, 90: 332 - 341.
- Souza, V., Travisano, M., Turner, P., Eguiarte, L. E. (2002b).** Does experimental evolution reflect patterns in natural populations? Comparison of *E. coli* strains from long-term studies to those from wild isolates. *Antoine van Leeuwenhoek*, 81: 143 - 153.
- Spiess, E. B. (1989).** *Genes in populations*. Wiley, New York, (USA), pp. 774.
- Stal, L. J. (1995).** Physiological ecology of cyanobacteria in microbial mats and other communities. *New Phytologist*, 131: 1 – 32.
- Stal, L. J. (2012).** *Cyanobacterial mats and stromatolites*. In: Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time. Springer, Dordrecht, (The Netherlands), pp. 65-125.
- Stanley, S. M. (1973).** An explanation for Cope's rule. *Evolution*, 27(1): 1 - 26.
- Stebbins, G. L. (1950).** *Variation and Evolution in Plants*. Columbia University Press, New York, (USA).
- Stebbins, G. L. (1971).** *Process of organic evolution* (2nd edn). Prentice-Hall, New Jersey, (USA).
- Stewart, P. S., Franklin, M. J. (2008).** Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 6(3): 199 - 210.
- Stirbet, A., Lazár, D., Papageorgiou, G. C. (2019).** Chlorophyll *a* fluorescence in cyanobacteria: relation to photosynthesis. In *Cyanobacteria*, Academic Press, pp. 79-130.
- Stockwell, C. A., Hendry, A. P., Kinnison, M. T. (2003).** Contemporary evolution meets conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 18(2): 94 - 101.
- Strakova, A., Murchison, E. P. (2015).** The cancer which survived: insights from the genome of an 11 000 year - old cancer. *Current opinion in genetics & development*, (30): 49 - 55.

- Sullivan, D. S., Huffaker, T. C. (1992).** Astral microtubules are not required for anaphase B in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*, 119(2): 379 - 388.
- Summons, R. E., Bradley, A. S., Janke, L. L., Waldbauer, J. R. (2006).** Steroids, triterpenoids and molecular oxygen. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 361: 951 – 968.
- Tabassum, D. P., Polyak, K. (2015).** Tumorigenesis: it takes a village. *Nature Reviews Cancer*, 15(8): 473 - 483.
- Tanaka, A., Tanaka, R. (2006).** Chlorophyll metabolism. *Current opinion in plant biology*, 9(3): 248 - 255.
- Case, T. J., Taper, M. L. (2000).** Interspecific competition, environmental gradients, gene flow, and the coevolution of species' borders. *The American Naturalist*, 155(5): 583 - 605.
- Tarnita, C. E., Taubes, C. H., Nowak, M. A. (2013).** Evolutionary construction by staying together and coming together. *Journal of theoretical biology*, 320: 10 - 22.
- Technau, U., Rudd, S., Maxwell, P., Gordon, P. M., Saina, M., Grasso, L. C., David C. Hayward, D. C., Sensen, C. W., Saint, R., Holstein, T. W., Ball, E. E. (2005).** Maintenance of ancestral complexity and non-metazoan genes in two basal cnidarians. *Trends in Genetics*, 21(12): 633 - 639.
- Theissen, U., Hoffmeister, M., Grieshaber, M., Martin, W. (2003).** Single eubacterial origin of eukaryotic sulfide: quinone oxidoreductase, a mitochondrial enzyme conserved from the early evolution of eukaryotes during anoxic and sulfidic times. *Molecular Biology and Evolution*, 20(9): 1564 - 1574.
- Thornton, D. C. (2002).** Diatom aggregation in the sea: mechanisms and ecological implications. *European Journal of Phycology*, 37(2): 149 - 161.
- Tomitani, A., Knoll, A. H., Cavanaugh, C. M., Ohno, T. (2006).** The evolutionary diversification of cyanobacteria: molecular - phylogenetic and paleontological perspectives. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(14): 5442 - 5447.
- Travisano, M. (2009).** *Long-term experimental evolution and adaptive radiation*. In *Experimental evolution: Concepts, methods, and applications of selection experiments*, California University Press, Berkley, (USA), pp. 111 - 132.

- Travisano, M., Mongold, J. A., Bennett, A. F., Lenski, R. E. (1995).** Experimental tests of the roles of adaptation, chance, and history in evolution. *Science*, 267(5194): 87 - 90.
- Turner, P.E. Chao, L. (1999).** Prisoner's dilemma in an RNA virus. *Nature*, 398: 441 – 443
- Van Gestel, J., Tarnita, C. E. (2017).** On the origin of biological construction, with a focus on multicellularity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(42): 11018 - 11026.
- Van Gestel, J., Tarnita, C. E. (2017).** On the origin of biological construction, with a focus on multicellularity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(42): 11018 - 11026.
- Velicer, G. J., Kroos, L., Lenski, R. E. (1998).** Loss of social behaviors by *Myxococcus xanthus* during evolution in an unstructured habitat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 12376 – 12380.
- Velicer, G. J., Kroos, L., Lenski, R. (2000).** A family of candidate taste receptors in human and mouse. *Nature*, 404: 598 – 601.
- Velicer, G. J., Yuen-Tsu, N. Y. (2003).** Evolution of novel cooperative swarming in the bacterium *Myxococcus xanthus*. *Nature*, 425(6953): 75 - 78.
- Vermaas, W. F. (2001).** Photosynthesis and respiration in cyanobacteria. *Encyclopedia of life sciences, John Wiley & Sons*: 1 - 7.
- Vermeij, G. J. (2006).** Historical contingency and the purported uniqueness of evolutionary innovations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(6): 1804 - 1809.
- de Visser, J. M., de Jong, G. A., Robertson, L. A., Kuenen, J. G. (1997).** A novel membrane-bound flavocytochrome c sulfide dehydrogenase from the colourless sulfur bacterium *Thiobacillus* sp. W5. *Archives of Microbiology*, 167(5): 295 - 301.
- de Visser, M., Zeyl, C. W., Gerrish, P. J., Blanchard, J. L., Lenski, R. E. (1999).** Diminishing returns from mutation supply rate in asexual populations. *Science*, 283(5400): 404 - 406.
- de Vries, J., Stanton, A., Archibald, J. M., Gould, S. B. (2016).** Streptophyte terrestrialization in light of plastid evolution. *Trends in plant science*, 21(6): 467 - 476.

- Von Bertalanffy, L. (1957).** Quantitative laws in metabolism and growth. *The quarterly review of biology*, 32(3): 217 - 231.
- Wade, M. J., Breden, F. (1980).** The evolution of cheating and selfish behavior. *Behavioral ecology and sociobiology*, 7(3): 167 - 172.
- Wahl, L. M. Gerrish, P. J. (2001).** The probability that beneficial mutations are lost in populations with periodic bottlenecks. *Evolution*, 55: 2606 - 2610.
- Wallace, A. R. (1889).** *A narrative of travels on the Amazon and Rio Negro: with an account of the native tribes, and observations on the climate, geology, and natural history of the Amazon valley.* Read Books Ltd, Redditch, (UK).
- Walter, J. M., Coutinho, F. H., Dutilh, B. E., Swings, J., Thompson, F. L., Thompson, C. C. (2017).** Ecogenomics and taxonomy of Cyanobacteria phylum. *Frontiers in Microbiology*, 8: 2132.
- Wang, Y. W., Zhao, J., Li, J. H., Li, S. S., Zhang, L. H., Wu, M. (2011).** Effects of calcium levels on colonial aggregation and buoyancy of *Microcystis aeruginosa*. *Current Microbiology*, 62(2): 679 - 683.
- Ward, D. M., Castenholz, R. W., Miller, S. R. (2012).** *Cyanobacteria in geothermal habitats.* In Ecology of cyanobacteria II, Springer, Dordrecht (Germany), pp. 39 - 63.
- Weinreich, D. M., Watson, R. A., Chao, L. (2005).** Sign epistasis and genetic constraint on evolutionary trajectories. *Evolution*, 59: 1165 - 1174.
- Weinreich, D. M., Delaney, N. F., DePristo, M. A., Hartl, D. L. (2006).** Darwinian evolution can follow only very few mutational paths to fitter proteins. *Science*, 312: 111 - 114.
- Weismann, A. (1892).** *Das Keimplasma. Eine Theorie der Vererbung.* Fischer, Jena, (Germany).
- Wellburn, A. R. (1994).** The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144(3): 307 - 313.
- West, S. A., Fisher, R. M., Gardner, A., Kiers, E. T. (2015).** Major evolutionary transitions in individuality. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(33): 10112 - 10119.
- West-Eberhard, M. J. (1989).** Phenotypic plasticity and the origins of diversity. *Annual review of Ecology and Systematics*, 20(1): 249 - 278.

- de Wit, R., van Gernerden, H. (1987).** Oxidation of sulfide to thiosulfate by *Microcoleus chthonoplastes*. *FEMS Microbial Ecology*, 45: 7 – 13.
- Wherley, B. G., Gardner, D. S., Metzger, J. D. (2005).** Tall fescue photomorphogenesis as influenced by changes in the spectral composition and light intensity. *Crop science*, 45(2): 562 - 568.
- Wiser, M. J., Ribeck, N., Lenski, R. E. (2013).** Long-term dynamics of adaptation in asexual populations. *Science*, 342(6164): 1364 – 1367.
- Wolpert, L. (1994).** The evolutionary origin of development: cycles, patterning, privilege and continuity. *Development*, 1994(Supplement): 79 - 84.
- Woods, R. J., Barrick, J. E., Cooper, T. F., Shrestha, U., Kauth, M. R., Lenski, R. E. (2011).** Second - order selection for evolvability in a large *Escherichia coli* population. *Science*, 331(6023): 1433 - 1436.
- Wright, S. (1932).** The roles of mutation, inbreeding, crossbreeding, and selection in evolution. *Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Congress of Genetics*, 1: 356 – 366.
- Wright, S. (1982).** The shifting balance theory and macroevolution. *Annual Review of Genetics*, 16: 1 - 16.
- Wright, S. (1988).** Surfaces of selective value revisited. *The American Naturalist*, 131: 115 - 123.
- Yang, Z., Kong, F., Shi, X., Zhang, M., Xing, P., Cao, H. (2008).** Changes in the morphology and polysaccharide content of *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) during flagellate grazing. *Journal of Phycology*, 44(3): 716 - 720.
- Yang, Z., Liu, Y., Ge, J., Wang, W., Chen, Y., Montagnes, D. (2010).** Aggregate formation and polysaccharide content of *Chlorella pyrenoidosa* Chick (Chlorophyta) in response to simulated nutrient stress. *Bioresource technology*, 101(21): 8336 - 8341.
- Yedid, G., Bell, G. (2002).** Macroevolution simulated with autonomously replicating computer programs. *Nature*, 420(6917): 810 – 812.
- Yonemitsu, M. A., Giersch, R. M., Polo-Prieto, M., Hammel, M., Simon, A., Cremonte, F., ...Sherry, J. (2019).** A single clonal lineage of transmissible cancer identified in two marine mussel species in South America and Europe. *eLife*, 8: e47788.
- Zar, J. H. (1999).** *Biostatistical Analysis*. 4th edn. Prentice Hall, Upper Saddle River, N. J., (USA), pp. 960.

- Zhu, Y., Graham, J. E., Ludwig, M., Xiong, W., Alvey, R. M., Shen, G., Bryant, D. A. (2010).** Roles of xanthophyll carotenoids in protection against photoinhibition and oxidative stress in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *Archives of biochemistry and biophysics*, 504(1): 86 - 99.
- Zufall, R. A., Rausher, M. D. (2004).** Genetic changes associated with floral adaptation restrict future evolutionary potential. *Nature*, 428(6985): 847 - 850.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



# ÍNDICE DE FIGURAS

---



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



	<b>Página</b>
<b>Fig. II.1.</b> Representación esquemática de las rutas de transporte de electrones, fotosintética y respiratoria, presentes en las membranas tilacoidales en cianobacterias	25
<b>Fig. II.2.</b> Vista de los Baños de La Hedionda	34
<b>Fig. II.3.</b> Equilibrio químico entre diferentes especies de sulfuro en función del pH	37
<b>Fig. II.4.</b> Desaparición de sulfuro tras su adición en el medio de cultivo	43
<b>Fig. II.5.</b> Diagrama del experimento de análisis de fluctuación y posibles resultados.	50
<b>Fig. II.6.</b> Esquema del protocolo de trinquete.	54
<b>Fig. II.7</b> Diagrama del experimento de rescate evolutivo en <i>M. aeruginosa</i> .	58
<b>Fig. II.8</b> Concentración de sulfuro total en ALH a lo largo de un año.	71
<b>Fig. II.9</b> <i>Oscillatoria</i> sp. presente en el tapete microbiano de La Hedionda.	74
<b>Fig. II.10</b> Algunos géneros de cianobacterias y diatomeas observados en los baños de La Hedionda.	74
<b>Fig. II.11</b> Ciclo anual de la abundancia de <i>Oscillatoria</i> en los baños de La Hedionda.	75
<b>Fig. II.12</b> Tasa de crecimiento ( $m$ ) en función de la irradiancia de las cepas silvestres de <i>M. aeruginosa</i>	76
<b>Fig. II.13</b> Efecto del sulfuro sobre la tasa de crecimiento ( $m$ ) de las cepas Ma1Vc, Ma5Vc y MaAVc de <i>M. aeruginosa</i> .	77
<b>Fig. II.14</b> Efecto del sulfuro sobre la tasa de crecimiento ( $m$ ) de la cepa silvestre O1LH de <i>Oscillatoria</i> .	78
<b>Fig. II.15.</b> Experimento de trinquete de <i>M. aeruginosa</i> .	81
<b>Fig. II.16.</b> Experimento de trinquete de <i>Oscillatoria</i> .	83
<b>Fig. II.17.</b> Efecto del deterioro ambiental y del modo de dispersión en el número de eventos de rescate evolutivo (RE).	86
<b>Fig. II.18.</b> Evolución de la tasa de crecimiento ( $m$ ) en las poblaciones de <i>M. aeruginosa</i> durante el experimento de rescate evolutivo, sometidas a dispersión global en un escenario sin deterioro del medio.	88



<b>Fig. II.19.</b> Efecto del sulfuro sobre la tasa de crecimiento ( $m$ ) de las cepas silvestres (Ma1Vc, Ma5Vc) y resistentes a sulfuro (Ma1R, Ma5R) de <i>M. aeruginosa</i> .	90
<b>Fig. II.20.</b> Efecto del sulfuro sobre la tasa de crecimiento ( $m$ ) de las cepas silvestre (O1LH) y resistente (O1R) de <i>Oscillatoria</i> .	91
<b>Fig. II.21.</b> Tasa de fotosíntesis neta (TFN) en función de la irradiancia en la cepa silvestre Ma1Vc y la cepa resistente Ma1R de <i>M. aeruginosa</i> .	93
<b>Fig. II.22.</b> Tasa de fotosíntesis neta (TFN) en función de la irradiancia en la cepa silvestre O1LH y la cepa resistente O1R de <i>Oscillatoria</i> .	95
<b>Fig. II.23</b> Frecuencia relativa del número de agregados de filamentos en las cepas de <i>Oscillatoria</i> en función del tamaño	98
<b>Fig. II.24</b> Rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ ) de las cepas silvestres y resistentes de <i>M. aeruginosa</i> y <i>Oscillatoria</i> con respecto al control (en ausencia de sulfuro).	101
<b>Fig. II.25</b> Tasa de transporte de electrones (ETR) a irradiancias crecientes ( $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) en las cepas de <i>M. aeruginosa</i> silvestre y resistente	103
<b>Fig. II.26</b> Tasa de transporte de electrones (ETR) en función de la irradiancia en las cepas de <i>Oscillatoria</i> silvestre y resistente	105
<b>Fig. III.1</b> Visual comparison of overnight subcultures and colony morphology.	145
<b>Fig. III.2</b> Size distribution of unicell and snowflake morphotypes in <i>K. lactis</i> Y8 strain.	146
<b>Fig. III.3</b> Experimental procedures followed to apply different selection pressures and genetic variability	150
<b>Fig. III.4.</b> Visual comparison of medium genetic diversity cultures before and after the selection pressure	153
<b>Fig. III.5.</b> Size distribution of unicell cultures before and after size (+) selection in populations	157
<b>Fig. III.6.</b> Size distribution of snowflakes cultures before and after the selection pressure	159
<b>Fig. III.7</b> Invader CFU's percentage along time.	161

# ÍNDICE DE TABLAS

---



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



	Página
<b>Tabla II.1.</b> Concentración de iones (mM) presentes en el manantial de La Hedionda.	72
<b>Tabla II.2.</b> Concentración de nitrógeno y fósforo inorgánico ( $\mu\text{M}$ ) en el manantial de La Hedionda.	72
<b>Tabla II.3.</b> Análisis de fluctuación de la transformación de la sensibilidad a la resistencia al ALH en la cepa Ma1Vc de <i>M. aeruginosa</i> .	79
<b>Tabla II.4.</b> Tasa de crecimiento de las cepas resistentes a sulfuro de <i>M. aeruginosa</i> (cepas Ma1R, Ma5R y MaAR) y <i>Oscillatoria</i> (O1R) a la concentración control de sulfuro ( $m_1$ ) y bajo la concentración de sulfuro más alta tolerada ( $m_2$ ).	85
<b>Tabla II.5.</b> ANOVA de dos vías para la comparación de los eventos de RE de la cepa Ma1Vc de <i>M. aeruginosa</i> en condiciones letales de sulfuro.	87
<b>Tabla II.6.</b> Parámetros fotosintéticos derivados del ajuste de las curvas TFN-I de las cepas silvestre y resistente de <i>M. aeruginosa</i>	94
<b>Tabla II.7.</b> Parámetros fotosintéticos derivados del ajuste al modelo de Edwards y Walker (1983) de las curvas TFN-I de las cepas silvestre y resistente de <i>Oscillatoria</i>	96
<b>Tabla II.8.</b> Contenido de pigmentos fotosintéticos en las cepas silvestres y resistentes de <i>M. aeruginosa</i> (Ma1Vc y Ma1R) y <i>Oscillatoria</i> sp. (O1LH y O1R).	97
<b>Tabla II.9.</b> Contenido de pigmentos fotosintéticos de las cepas <i>Microcystis aeruginosa</i> silvestre (Ma1Vc) y resistente al sulfuro (Ma1R) por célula ( $\text{fg cel}^{-1}$ ) y por unidad de volumen ( $\text{fg } \mu\text{m}^{-3}$ ).	97
<b>Tabla II.10.</b> Contenido en C, N e índice C:N en cepas silvestres y resistentes al sulfuro de <i>M. aeruginosa</i> y <i>Oscillatoria</i> .	99
<b>Tabla II.11.</b> Rendimiento cuántico máximo ( $F_v/F_m$ ) de las cepas silvestres y resistentes a sulfuro de <i>M. aeruginosa</i> y de <i>Oscillatoria</i> .	100
<b>Tabla II.12.</b> Parámetros fotosintéticos ( $\text{ETR}_{\text{max}}$ y $\alpha^{\text{ETR}}$ ) derivados de la relación ETR-I en las cepas silvestres (Ma1Vc) y resistentes (Ma1R) de <i>M. aeruginosa</i> .	104
<b>Tabla II.13.</b> Parámetros derivados de la relación ETR-I ( $\text{ETR}_{\text{max}}$ , y $\alpha^{\text{ETR}}$ ) de las cepas silvestres y resistentes de <i>Oscillatoria</i> .	106





<b>Tabla II.14.</b> Tasa de fijación de carbono ( $\text{nmol C } \mu\text{g Chl } a^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) de las cepas de <i>M. aeruginosa Oscillatoria</i>	107
<b>Tabla II.15.</b> Nivel de sulfuro necesario para inhibir el valor de $F_v/F_m$ en un 50% en cepas de <i>Oscillatoria</i> estudiadas por Miller y Bebout (2004), y las cepas de este estudio.	126
<b>Table III.1.</b> Eco-evolutionary scenarios	149
<b>Table III.2</b> Morphotype composition and selective pressure applied on competition environments under unicellular and multicellular colonization.	151
<b>Table III.3.</b> Multicellular achievement in unicellular ancestor cultures in treatments crossing genetic diversity and size selection.	154
<b>Table III.4.</b> Snowflake reversion in multicellular ancestor cultures in treatments crossing genetic diversity and size selection	155

# ANEXO: PUBLICACIONES


---



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



## ADAPTATION DYNAMICS AND EVOLUTIONARY RESCUE UNDER SULFIDE SELECTION IN CYANOBACTERIA: A COMPARATIVE STUDY BETWEEN *MICROCYSTIS AERUGINOSA* AND *OSCILLATORIA* SP. (CYANOBACTERIA)<sup>1</sup>

Elena Martín-Clemente<sup>2</sup> , Ignacio J. Melero-Jiménez, Elena Bañares-España, Antonio Flores-Moya, and María J. García-Sánchez

Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos s/n, E-29071 Málaga, Spain

Experimental evolution studies using cyanobacteria as model organisms are scarce despite the role of cyanobacteria in the evolution of photosynthesis. Three different experimental evolution approaches have been applied to shed light on the sulfide adaptation process, which played a key role in the evolution of this group. We used a *Microcystis aeruginosa* sulfide-sensitive strain, unable to grow above ~0.1 mM, and an *Oscillatoria* sp. strain, isolated from a sulfurous spa (~0.2 mM total sulfide). First, performing a fluctuation analysis design using the spa waters as selective agent, we proved that *M. aeruginosa* was able to adapt to this sulfide level by rare spontaneous mutations. Second, applying a ratchet protocol, we tested if the limit of adaptation to sulfide of the two taxa was dependent on their initial sulfide tolerance, finding that *M. aeruginosa* adapted to 0.4 mM sulfide, and *Oscillatoria* sp. to ~2 mM sulfide, twice its highest tolerance level. Third, using an evolutionary rescue approach, we observed that both speed of exposure to increasing sulfide concentrations (deterioration rate) and populations' genetic variation determined the survival of *M. aeruginosa* at lethal sulfide levels, with a higher dependence on genetic diversity. In conclusion, sulfide adaptation of sensitive cyanobacterial strains is possible by rare spontaneous mutations and the adaptation limits depend on the sulfide level present in strain's original habitat. The high genetic diversity of a sulfide-sensitive strain, even at fast environmental deterioration rates, could increase its possibility of survival even to a severe sulfide stress.

**Key index words:** evolutionary rescue; fluctuation analysis; *Microcystis aeruginosa*; *Oscillatoria* sp.; ratchet protocol; sulfide

**Abbreviations:** A<sub>750</sub>, absorbance at  $\lambda = 750$  nm; CD, cell density; ER, evolutionary rescue; FM, fresh mass; LHW, La Hedionda waters; *m*, acclimated growth rate; P<sub>0</sub>, first term of the Poisson

**distribution; *q*, frequency of the LHW-resistant allele; *s*, coefficient of selection;  $\mu$ , mutation rate**

Acclimation is the mechanism allowing tolerance at low levels of selective pressure, but when the limit of acclimation is exceeded, survival is only possible by the selection of new mutations conferring resistance or genetic adaptation (Hughes 1999). Previous studies on the adaptation of photosynthetic micro-organisms to extreme environments showed that in most cases survival was due to the selection of new genetic variants originated by mutation (Costas et al. 2007, 2008, López-Rodas et al. 2007, 2008a,b, 2009, 2011, Fernández-Arjona et al. 2013, Melero-Jiménez et al. 2019). Although these studies revealed that the coupled interplay of mutation and selection allowed organisms to surpass a given level of selection pressure, experimental assays evaluating the maximum capacity of an organism to adapt to a selective agent have not been reported until recently. In particular, it was found that the maximum adaptation capacity for the same selective agent varied among different taxonomic and ecological groups of photosynthetic micro-organisms, and that this capacity differed depending on the selective agent used (Huertas et al. 2010, 2011, Rouco et al. 2014, Melero-Jiménez et al. 2019). It must be taken into account that all the studies previously cited were performed with strains having a homogeneous eco-evolutionary history (i.e., all the experimental culture cells were founded from inocula having a similar history, and they were exposed to a similar selection pressure). However, it is known that evolutionary processes are contingent, closely dependent on the previous history (Gould 1989, Travisano et al. 1995, Blount et al. 2008, Flores-Moya et al. 2008, 2012). Thus, the possibility that natural populations exposed to lethal conditions may adapt through natural selection, a process known as “evolutionary rescue” (ER), could depend on the previous eco-evolutionary history (Gonzalez et al. 2013). In fact, in experimental populations of bacteria and yeasts, it has been found that greater genetic variation favors the possibility of ER events

<sup>1</sup>Received 3 April 2019. Accepted 22 July 2019. First Published Online 8 August 2019. Published Online 26 September 2019, Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

<sup>2</sup>Author for correspondence: e-mail elena.mc@uma.es.  
Editorial Responsibility: B. Palenik (Associate Editor)



Article

# What Triggers the Annual Cycle of Cyanobacterium *Oscillatoria* sp. in an Extreme Environmental Sulfide-Rich Spa?

Andreas Reul <sup>1,\*</sup> , Elena Martín-Clemente <sup>2</sup> , Ignacio J. Melero-Jiménez <sup>2</sup>,  
Elena Bañares-España <sup>2</sup>, Antonio Flores-Moya <sup>2</sup>  and María J. García-Sánchez <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ecología y Geología, Universidad de Málaga, 29010 Málaga, Spain

<sup>2</sup> Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal, Universidad de Málaga, 29010 Málaga, Spain; elena.mc@uma.es (E.M.-C.); imelero@uma.es (I.J.M.-J.); elbaes@uma.es (E.B.-E.); floresa@uma.es (A.F.-M.); mjgs@uma.es (M.J.G.-S.)

\* Correspondence: areul@uma.es

Received: 4 February 2020; Accepted: 13 March 2020; Published: 21 March 2020



**Abstract:** A seasonal cycle of sulfide, nitrate, phosphate, ammonium, chlorophyll *a* (Chl *a*) and *Oscillatoria* sp. abundance (<100 µm), as well as the relative contribution of taxonomic phytoplanktonic groups (cyanobacteria, green algae, cryptomonads, diatoms and dinoflagellates) to total Chl *a* were measured by fluorometric measurements at La Hedionda sulfide-rich spa (southern Spain). Fluorometry determined that cyanobacteria Chl *a* concentration correlated positively with the abundance of *Oscillatoria* sp. Aggregates at 45–100 µm equivalent spherical diameter (ESD) and was used as an indicator of *Oscillatoria* sp. Abundance, including for aggregates <45 and >100µm (ESD). In addition, air temperature, radiation and precipitation were downloaded from meteorological databases. In agreement with the meteorological annual cycle observed in air temperature, radiation and precipitation, sulfide concentration at La Hedionda Spa shows an annual cycle with concentrations around 40 µM in winter and up to 200 µM in the dry summer period. Phytoplankton composition was dominated by cyanobacteria (mainly *Oscillatoria* sp.), but other groups were also represented (green algae, cryptomonads, diatoms and dinoflagellates), although they remained constant throughout the year (median Chl *a* < 0.2 µg L<sup>-1</sup>). Cyanobacteria, in contrast, showed an annual cycle with a significantly higher median in summer (Chl *a* = 1.6 µg L<sup>-1</sup>) than in winter (Chl *a* = 0.4 µg L<sup>-1</sup>). No linear relationship between nutrients and cyanobacteria concentration was observed, but an optimum curve of cyanobacteria concentration to sulfide concentration was fitted through a general additive model (GAM). The four-fold increase of cyanobacteria concentration under exposition of an elevated sulfide concentration can be due to higher growth rates at elevated sulfide concentrations reported for an *Oscillatoria* sp. strain isolated during the same annual cycle at La Hedionda and we suggest that the selective agent, sulfide, positively triggers *Oscillatoria* sp. proliferation in summer. According to our findings, the *Oscillatoria* sp. population of La Hedionda not only is sulfide-resistant, but requires sulfide in its optimal niche.

**Keywords:** La Hedionda; nutrients; sulphide; phytoplankton composition; *Oscillatoria*

## 1. Introduction

La Hedionda is a sulfide-rich (200 µM) thermal (20 °C) spring outflow in southern Spain [1,2] (Figure 1). While the sulfide-rich water of La Hedionda has been appreciated in thermal baths since almost 61 before Christ [3,4], sulfide is also a biocide because it blocks photosystem II (PSII) and respiratory electron transport [5–9]. However, cyanobacteria strains inhabiting sulfurous habitats

