



Universidad Nacional Autónoma de México

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

Facultad de Medicina

Parámetros de crecimiento de
Bacillus aislados en el ecosistema
oligotrófico de Cuatro Ciénegas

TESIS

Que para obtener el título de:
Licenciado en Investigación Biomédica Básica

PRESENTA:

Pedro Márquez Zacarías

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Valeria Souza Saldivar
Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental,
Instituto de Ecología, UNAM

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2016

Facultad de Medicina

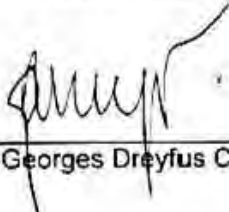


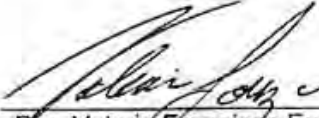


LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA
COORDINACIÓN

DR. GERMÁN ENRIQUE FAJARDO DOLCI
DIRECTOR
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
PRESENTE

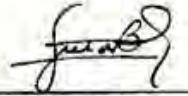
Por este conducto, le informamos que la tesis titulada: "**Parámetros de crecimiento de *Bacillus* aislados en el ecosistema oligotrófico de Cuatro Ciénegas**", que presenta el alumno **PEDRO MÁRQUEZ ZACARÍAS** con número de cuenta **41100255-6**, cumple con los requisitos establecidos en el Plan de Estudios de la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica. Por lo tanto, los suscritos Miembros del Jurado, otorgamos nuestro voto aprobatorio para que sea presentada en examen oral.


Dr. Georges Dreyfus Cortés


Dra. Valeria Francisca Eugenia
Leopoldina de María Guadalupe
Souza Saldivar


Dr. Arturo Carlos Il Becerra
Bracho


Dra. Rosa Laura Camarena
Mejia


Dra. Bertha González Pedrajo

Dedico este trabajo a mi madre

Alguna vez viajaba en un auto a través de carreteras polvorientas, llenas de un vacío que era capaz de llenarlo todo. Los ecos de un águila lejana eran capaces de estremecer el inmenso desierto en quietud. Aunque veía aquél mundo por la ventana, la imaginación de un oasis escondido me ofrecía mucho más que el paisaje que hacía pasarela. No sabía bien a dónde iba. Algunas paradas por un par de pueblitos no hacían sino alimentar la sospecha del carácter novelesco de aquél destino, pues al atravesarlos no se advertía la presencia humana. Pero en un rato y con un poco de atención, se podía divisar a los moradores, con las miradas como de búhos sofocados de duda, resguardándose en sus madrigueras para no desecarse bajo el astro despiadado.

En fin, que en algún momento todo se detuvo. Y se abrió el azul más cielo, y no se distinguía el final del horizonte del principio de aquél. Y familiares, conocidos y extraños empezaron a sonar bulliciosos en el fondo de aquélla imagen, y todo volvió a ser *normal*. Pero no me tomó mucho caminar sobre aquéllas aguas someras y creer que podía ir tan lejos como aquél francés enamorado; y creer que sí era posible caminar como el Yisus. Tan fue así que la tierra me abandonó, y de pronto me vi rodeado de algas como espaguetis translúcidos, peces psicodélicos y tortugas budistas. Y el sol atravesaba el agua como lanzas de cristal. Y el bullicio se hacía mudo de nuevo, y era otro idioma el que se hablaba en la pecera. En realidad, no sabía bien a dónde iba. Pero era un astronauta. Y, aun así, no tardó mucho el bullicio en regresar, y de pronto me vi extirpado de aquélla pecera, tan bruscamente que parecía que me habían dado a luz. Y allí estaba mi padre regresándome a la orilla, y todo mundo viéndome como si viniera de otro planeta (y es que tenían razón). De eso serán unos 18 años, pudo ser un 21 de mayo, no lo sé. Solo sé que fue el día en que me iba a morir sin saberlo, como a todos pasa.

Un buen día desperté de los años sucesores de aquél suceso, preguntándome qué hacer de mi vida académica. Lo bueno de biomédicas (de *la LIBB*, pues), es que uno puede perderse en la pecera que quiera, aunque no sea tan inesperada como alguna de la infancia. Y así, como si el mundo fuera redondo, regresé al inicio. Volví al valle de Cuatro Ciénegas, y comprobé que no era la infancia lo que hacía de lienzo la memoria. Es el valle. Y su cielo de azul atómico. Y la vida necia que no deja de colmar la mariposa del desierto.

Así sea, que la vida siga en *un avion de papier*.

“Lo más terrible se aprende enseguida y lo hermoso nos cuesta la vida”

Silvio Rodríguez.

Agradecimientos Académicos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México. Por ser la institución más importante en el país para el desarrollo científico, social y cultural de la juventud mexicana.

A la Dra. Valeria Souza, por todo el trabajo y la constancia para generar ciencia con conciencia. Porque liderar un grupo tan diverso y exitoso es admirable. Gracias por aceptarme como alumno y mostrarme que en México se hace ciencia de calidad.

A Jorge Valdivia, por la paciencia y la confianza durante la realización de esta tesis. A los numerosos compañeros de laboratorio, especialmente Ale y Mirna, quienes siempre anduvieron de buenas y gustaron de divagar sobre la vida y la ciencia.

A los miembros de mi jurado, Dr. Georges Dreyfus, Dr. Arturo Becerra, Dra. Laura Camarena y Dra. Bertha González. Por sus valiosos comentarios para mejorar sustancialmente mi tesis.

Al Dr. Julio César Carrero, pues no pude tener un mejor tutor en primer año, con quien aprendí mucho sobre trabajar en equipo y a la vez ser lo más independiente posible. Y a los miembros del laboratorio, sobre todo a Hugo Aguilar, Dulce Meneses, Milka Luna, José Navarrete, Julieth y Bárbara, pues siempre hubo buena vibra y ganas de hacer las cosas.

A quienes también fueron mis tutores de rotación de laboratorio, Dr. Adolfo García Sainz, y Dr. Santiago Ávila, con quienes aprendí valiosas experiencias.

A la Dra. Ana María Ibarra en el CIBNOR de la Paz, BCS., y a la Dra. Nadia Álvarez en la Universidad de Arizona, pues aprendí mucho en los veranos de investigación, de donde no me quedó duda de continuar con una carrera científica.

A la Lic. Cynthia Lima Cruz, por la asistencia en cada paso de la formación de biomédicos, y la gran paciencia con muchos biomédicos latosos como yo.

To Will Ratcliff, who is the best PhD advisor I could have gotten.

Al Programa Universitario México Nación Multicultural. Por el apoyo durante la mayor parte de mi carrera. Especialmente a Esther Carrillo, y Efrén Govea por su amistad.

Al Colegio Primitivo y Nacional de San Nicolás de Hidalgo, estandarte de la historia nacional, donde abrí un poco los ojos a la ciencia y la sociedad.

Agradecimientos personales.

A mi hermano Hugo y mi hermana Yoselin. Por abrir un camino muy grande que me han permitido seguir. Los admiro profundamente. A mis padres, por el valor Purhépecha de explorar la vida, y en el camino formar una familia. Gracias por sus ejemplos.

A mis amigos de andanzas varias, que no los borra el tiempo o la distancia. En particular agradezco a Jesús Córdova (*Chuyito*), Luis Raúl Rodríguez (*Lula*), Julio César Valles (*el Churches*), Chalbert Eduardo, Iván Marcelino, Javier Rodríguez (*Jimbo*), Cristian Zavala (*Caaaaar!!*), Ailexin Domínguez, y Jasón Bustos.

A mis olimpiamigos, sobre todo a los *cindarios* Coffee y Ramiro, imprescindibles. También a Mar, David, Paola, y Elisa. Por saber de qué lado masca la iguana.

A Ganesh Marín, por toda la amistad. Por lo que fue y lo que será. Mi admiración.

A los chicos de LASRP, con quienes me divertí mucho en Arizona. Especialmente a Carlos Landín, Andrés Torres, Nilo Queiroga (*el Marica*), y Adriana Cruz.

A Karlis Peña (*Búpidi!!*), Ahmed y Elisa Verde, porque son la ondita. Sin ustedes el inicio de la licenciatura hubiera sido un salto al vacío. Gracias por conservar la amistad.

A Blanca y Mariana. Por su amistad sin condiciones. Por crecer juntos como personas y científicos. Me ilusionan las aventuras venideras, que espero haya muchas.

A la comunidad de La Margarita, en Los Tuxtlas, Veracruz, y la Brigada Universitaria de Trabajo Comunitario. Porque me divertí como mono aullador. En especial a Samael, Marian y Melina, pues en los momentos más duros demostraron que la juventud no decepciona.

To Jenn, who is no doubt the best lab mate ever. I'm very happy to have you as a friend! You can count on me.

To Jennifer Rattray. Because you've shown me many ways to enjoy life and science. We've built something very that makes us stronger together. Thank you for your tender love and support. I'm with you, *a todas horas*.

A quien guste aludirse. "*Se admiten tarados, enfermos, gordos sin amor, tullidos, enanos, vampiros, y días sin Sol*".

Índice

RESUMEN.....	9
ABSTRACT.....	10
ABREVIATURAS.....	11
INTRODUCCIÓN.....	12
Cuatro Ciénegas: Un laboratorio natural para el estudio de la ecología microbiana.....	12
JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.....	14
OBJETIVOS.....	15
Objetivo General.....	15
Objetivos Particulares.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
Condiciones de crecimiento.....	16
Monitoreo de la densidad óptica de los cultivos.....	16
Toma de muestras de biomasa.....	17
Extracción y cuantificación de proteínas.....	17
Cuantificación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC).....	17
Análisis filogenético.....	18
Análisis de imágenes.....	18
Análisis estadísticos.....	19
RESULTADOS.....	20
Descripción de las cepas utilizadas y del sitio de estudio.....	20
Modelado del Crecimiento Microbiano.....	22
Determinación de las condiciones y parámetros de crecimiento de los bacilos estudiados.....	24
Cuantificación de la síntesis proteica en las tres fases de crecimiento.....	30
Estimación de la síntesis proteica a nivel celular.....	32
Análisis de la expresión diferencial de proteínas en las tres fases de crecimiento.....	35
Análisis de correlación y componentes principales del conjunto de variables determinadas para los <i>Bacillus</i> en estudio.....	40
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	46
Fisiología del crecimiento bacteriano.....	46
Comentario final.....	49

ADDENDUM. Un ambiente extremo en extremo peligro: “A [reiterated] plea for conservancy” ...	50
REFERENCIAS.....	51
Apéndice I.....	62
a) Determinación de las condiciones de cultivo de las cepas utilizadas.	62
b) Comparación del Medio Marino con otras combinaciones de nutrientes.	62
Apéndice II.....	63
Artículo.....	63
“Variabilidad del número de copias del operón rRNA y de la dinámica de las tasas de crecimiento de <i>Bacillus</i> aislados de un ambiente acuático oligotrófico extremo”	63

RESUMEN.

Las poblaciones bacterianas naturales están sujetas a diversas presiones selectivas que determinan sus trayectorias evolutivas y las adaptaciones que adquieren. La tasa de crecimiento celular y poblacional es una adaptación importante en la ecología microbiana y está determinado por diversos factores, entre ellos la disponibilidad de nutrientes. Las características del valle de Cuatro Ciénegas (VCC), en el estado de Coahuila, lo hacen un modelo idóneo para el estudio del crecimiento microbiano. El aislamiento geográfico y la naturaleza desértica del valle, así como sus condiciones de oligotrofía extrema, se reflejan en las adaptaciones inusuales de las bacterias que lo habitan. En este trabajo evaluamos el crecimiento en cultivo líquido de 15 cepas del género *Bacillus* del VCC para determinar sus parámetros de crecimiento. También cuantificamos la concentración de proteínas en las diferentes fases del crecimiento para saber en qué momento estas bacterias invierten la mayor parte de sus recursos energéticos. Al analizar el conjunto de valores de las variables en estudio, se encontró que dichos valores están determinados principalmente por el nicho ecológico en que fueron aisladas las cepas, así como la densidad celular máxima alcanzada. Estos resultados apoyan evidencia previa que muestra que la estructura de las comunidades bacterianas de Cuatro Ciénegas está determinada principalmente por las condiciones de sus nichos ecológicos, y además sugieren que la densidad celular máxima es un parámetro que agrupa las bacterias de este ecosistema en conjuntos discretos. Este trabajo contribuye a entender cómo las comunidades bacterianas en el valle de Cuatro Ciénegas tienen dinámicas de crecimiento particulares que podrían reflejar las adaptaciones que adquieren las comunidades bacterianas en otros ecosistemas oligotróficos similares.

ABSTRACT.

Natural bacterial populations are subject to various selective pressures that determine their evolutionary trajectories and the adaptations they acquire. The rate of population and cell growth is an important adaptation in microbial ecology and its determined by diverse factors, among them is the nutrient availability. The features of the Cuatro Ciénegas Basin (CCB), in the state of Coahuila, make it an ideal model for the study of microbial growth. The geographical isolation and the desert nature of the basin, along with its extreme oligotrophy, are reflected in the singular adaptations of the bacteria inhabiting it. In this work we evaluated the growth in liquid culture of 15 strains of the genus *Bacillus* from the CCB to determine their growth parameters. We also quantified the protein concentration at the different growth phases to know when these bacteria are investing the majority of their energetic resources. After analyzing the entire set of values of the variables under study, we found that these values are mainly determined by the ecological niche from where the strains were isolated, as well as by the maximum cell density reached. These results support previous evidence where is shown that the structure of bacterial communities at CCB are mainly determined by their ecological niches, and also suggest that the cell density is a parameter that cluster bacteria from this ecosystem in discrete groups. This work contributes to understand how bacterial communities at the Cuatro Ciénegas Basin have specific growth dynamics that could reflect the adaptations acquired by bacterial communities in similar ecosystems.

ABREVIATURAS.

VCC – Valle de Cuatro Ciénegas.

UFC – Unidades formadoras de colonias.

DO – Densidad óptica.

MM – Medio Marino.

CCBw – Medio de cultivo consistente en agua estéril de Cuatro Ciénegas + 5g/L de peptona.

λ – Duración de la fase de adaptación (h).

μ – Tasa máxima de crecimiento (h^{-1}).

A – Densidad máxima del cultivo.

ACP – Análisis de componentes principales.

INTRODUCCIÓN.

Cuatro Ciénegas: Un laboratorio natural para el estudio de la ecología microbiana.

El valle de Cuatro Ciénegas (VCC) es un humedal ubicado en el desierto chihuahuense del estado de Coahuila (Figura 1). Este ecosistema es un refugio de biodiversidad que alberga más de 70 especies endémicas de macroorganismos, sin contar su megadiversa microbiota,

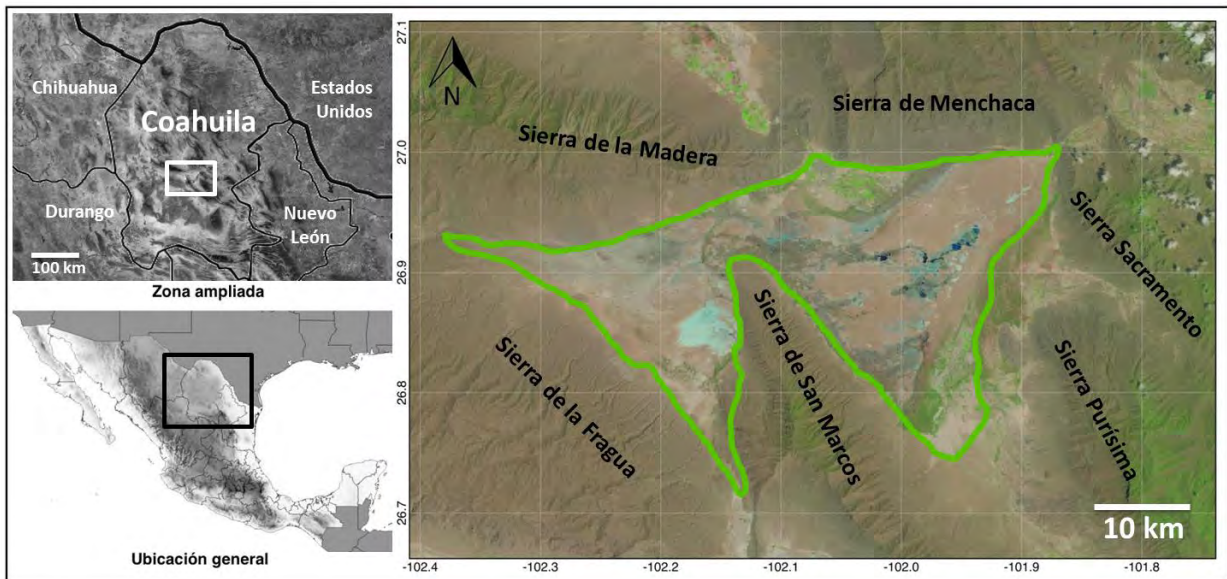


Figura 1. Ubicación del valle de Cuatro Ciénegas. El valle de Cuatro Ciénegas se encuentra en la región central del estado de Coahuila. Tiene un área aproximada de 200 km² (área verde, panel derecho) y está rodeado por diversas cadenas montañosas. (Imágenes satelitales LANDSAT, cortesía de U.S. Geological Survey).

por lo que se considera el ecosistema más biodiverso del norte de América (Stein *et al.*, 2000; Souza *et al.*, 2012). El VCC está rodeado por diversos sistemas montañosos de hasta 2500 msnm, que durante diversas eras geológicas han mantenido una barrera geográfica importante que pudo haber propiciado este alto nivel de endemismo (Meyer, 1973; Souza *et al.*, 2012).

Desde hace unos quince años se empezó a estudiar la biodiversidad bacteriana del VCC y se encontró que existe una gran diversidad, y que el ~50% de los grupos filogenéticos que lo

habitan están relacionados con organismos marinos (Souza et al., 2006), lo que en conjunto con el hecho de que el VCC contiene una gran abundancia y diversidad de estromatolitos ("fósiles vivientes" de comunidades microbianas complejas con origen en el Archaeano y muy abundantes durante el Precámbrico), sugiere que este ecosistema es una reliquia viva del periodo en el que océano ancestral de Phantalassa (ahora el Pacífico) entro a la región al abrirse Pangea y separarse el hemisferio Norte del Sur (Souza et al., 2006, 2012; Elser et al., 2005).

Además de las condiciones ambientales extremas inherentes al carácter desértico del valle, también se ha encontrado que Cuatro Ciénegas tiene una concentración de fosfatos menor a $1\mu\text{M}$, una de las más bajas del planeta (Elser et al., 2005; Peimbert et al., 2012). Esta limitación se refleja en las adaptaciones inusuales de las bacterias que habitan el valle, como en la especie endémica *Bacillus coahuilensis*, que ha sustituido significativamente sus lípidos de membrana por sulfolípidos y ha reducido su genoma (el más pequeño en el género), estrategias que podrían disminuir el requerimiento metabólico de fósforo (Elser et al., 2005; Alcaraz et al., 2008).

La existencia de una gran diversidad microbiana en un ambiente tan extremo en sus condiciones y tan limitado en sus recursos, como lo es el VCC, ha dado pie a la idea de que son precisamente estos factores los que promueven el endemismo y la diversidad (Souza et al., 2008). Por sus condiciones inusuales de aislamiento geográfico, de alta biodiversidad, y de condiciones ambientales extremas, Cuatro Ciénegas es un modelo ideal para estudiar procesos generales en ecología evolutiva, e incluso es un sitio de interés para la astrobiología (Souza et al., 2012).

JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.

Uno de los grupos microbianos cultivados más estudiados en Cuatro Ciénegas es el género *Bacillus*, del cual se ha descrito una especie endémica (Cerritos et al., 2008; Alcaraz et al., 2008) y se ha reconstruido la historia evolutiva (Moreno-Letelier et al., 2012). También se han descrito interacciones antagónicas entre distintas cepas y especies del género, y la influencia de estas interacciones en su estructura ecológica. (Pérez-Gutiérrez et al., 2013). Sin embargo, y a pesar de las investigaciones previas, aún carecemos de información sobre la fisiología del crecimiento bacteriano en los bacilos de Cuatro Ciénegas, que podría reflejar las condiciones ambientales de este ecosistema. En el presente trabajo recurrimos a la microbiología clásica para determinar los parámetros de crecimiento de cepas del género *Bacillus* para ampliar el conocimiento sobre la fisiología del crecimiento microbiano en ambientes oligotróficos.

OBJETIVOS.

Objetivo General.

Determinar parámetros relacionados al crecimiento de bacterias del género *Bacillus* aisladas en el Valle de Cuatro Ciénegas.

Objetivos Particulares.

- a) Realizar curvas de crecimiento de 15 aislados de *Bacillus* del valle de Cuatro Ciénegas mediante la técnica de conteo de unidades formadoras de colonias.
- b) Estimar la tasa máxima de crecimiento, la duración de la fase de adaptación, y la densidad máxima alcanzada a partir de las curvas de crecimiento generadas.
- c) Cuantificar la concentración de proteínas totales en las tres fases de crecimiento bacteriano: fase de adaptación, fase de crecimiento exponencial y fase estacionaria.
- d) Buscar asociaciones entre las variables calculadas y el ambiente de origen en que se aislaron las cepas.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Condiciones de crecimiento.

Todas las cepas utilizadas se encuentran en crioviales Eppendorf de 1.5 mL guardados a -80 °C en la colección del Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental (Dra. Valeria Souza) del Instituto de Ecología, y para su uso cotidiano y reducir riesgos de contaminación se mantienen alícuotas a -20 °C que consisten en 70% de bacterias cultivadas en Medio Marino Difco™ (BD and Company) y 30% de solución de glicerol. Para iniciar las curvas de crecimiento, se descongelaron las alícuotas a temperatura ambiente, y se transfirió con un asa estéril un inóculo en un matraz con 50 mL de Medio Marino que se incubó a 35 °C en agitación constante a 150 rpm durante toda la noche. Al día siguiente se tomó una muestra de este cultivo y se inoculó por triplicado en matraces con 50 mL de medio preparado con agua estéril obtenida del Valle de Cuatro Ciénegas y suplementada con 5 gL⁻¹ de peptona Bacto™ Tryptone (BD andCompany), que se incubaron en las mismas condiciones de temperatura y agitación.

Monitoreo de la densidad óptica de los cultivos.

Para saber en qué fase de crecimiento se encontraban los cultivos, se tomaron medidas de la densidad óptica corregida a 600 nm (DO600) tomando muestras de 1 mL cada hora en las tres réplicas de cada cepa cultivada, diluyendo la muestra si el valor era superior a 0.5, que es el valor aproximado en que la saturación del cultivo requiere esta corrección en la medida de la DO600. Las medidas se hicieron en un equipo BioPhotometer Eppendorf, y las diluciones y el control de absorción basal se hicieron con el medio correspondiente en que se encontraban cultivadas las muestras.

Toma de muestras de biomasa.

De acuerdo a las medidas de densidad óptica, se determinaron tres puntos para tomar muestras de biomasa de los cultivos, por cada fase de crecimiento (fase de adaptación, de crecimiento exponencial y estacionaria). Se tomaron 3 muestras de 1 mL por cepa, lavando tres veces con agua estéril desionizada mediante centrifugación a 5000 rpm y decantación del sobrenadante en cada paso de lavado, y resuspendiendo en agua estéril desionizada en el paso final de lavado para guardar finalmente las muestras en tubos estériles de 1.5 mL a -20 °C hasta su posterior uso.

Extracción y cuantificación de proteínas.

Las muestras de biomasa colectadas durante el crecimiento de los cultivos se descongelaron y se lavaron en solución búfer de fosfatos (PBS), para posteriormente diluirlas para alcanzar una DO600 de 0.3 unidades. En seguida se extrajeron las proteínas totales incubando las muestras por 30 minutos en hielo con las siguientes soluciones: 50mM de Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM de NaCl, 0.5% (volumen/peso) de desoxicolato de sodio, 0.5% (volumen/volumen) de detergente Triton X-100, 0.5% (volumen/volumen) de dodecil sulfato sódico, 5mM de EDTA, y 1mM de fluoruro fenilmetildulfonil. Los restos celulares fueron lavados con PBS mediante centrifugación a 10,000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Finalmente, los extractos proteicos se corrieron en geles de acrilamida, teñidos con Comassie, y también se determinó la concentración molar de proteínas mediante el método de Lowry.

Cuantificación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

Durante al menos 7 puntos a lo largo de las curvas de crecimiento, se tomaron muestras de las tres réplicas de cada cepa, y se diluyeron en una solución isoosmótica de 0.85% NaCl en

factores seriales de dilución 1:10, que dependiendo de la fase de crecimiento fueron de órdenes de dilución entre 10^{-3} a 10^{-9} . Al menos tres distintas diluciones se utilizaron en cada punto de este muestreo, y un volumen de 50 μ L de estas diluciones se inocularon en placas de Petri con Medio Marino Difco™ en (BD and Company) con agar (15 g/L, BD and Company), utilizando esferas estériles de vidrio de ~3 mm de diámetro para una distribución uniforme de las células. Posteriormente las cajas Petri se incubaron por 24 horas a 30 °C, y se contabilizaron las colonias individuales siguiendo los siguientes criterios: no se contabilizaron cajas con menos de 30 colonias o con más de 300, para disminuir los errores de muestreo. Finalmente, al conocer el volumen que se inoculó en la placa, y el factor de dilución utilizado, se pudo estimar el número de UFC en las muestras originales.

Análisis filogenético.

Se tomaron las secuencias de la región hipervariable 5' del gen ribosomal 16S que están reportadas en Valdivia *et al.* 2015, y que corresponden a las cepas utilizadas en este trabajo, para construir un árbol filogenético utilizando una cepa de *Staphylococcus* como grupo externo, mediante el algoritmo ClustalW implementado en el software MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011) y utilizando los parámetros recomendados por Hall (Hall, 2013).

Análisis de imágenes.

Las imágenes de los geles de acrilamida de los extractos proteicos fueron procesados mediante el software Fiji (Schindelin *et al.*, 2012). Los datos numéricos fueron después exportados al software estadístico R, versión 3.2.2.

Análisis estadísticos.

Todos los análisis estadísticos fueron hechos en el software estadístico R, versión 3.2.2. Se utilizaron diversos paquetes que se describen en seguida. "Grofit", para corroborar los parámetros de crecimiento hechos en el software CurveExpert. "Devtools", "FactoMineR", y "factoextra" para el análisis de componentes principales. "Base", para los análisis de ANOVA y t-Student. Finalmente se utilizó "ggplot2" para la visualización de los distintos análisis.

RESULTADOS

Descripción de las cepas utilizadas y del sitio de estudio.

Durante más de una década de estudios de campo en el VCC se han colectado miles de cepas bacterianas de distintas especies que forman parte de una colección conservada en el Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental (Instituto de Ecología, UNAM) y en Laboratorio de Bacteriología Molecular del CINVESTAV. Para la presente tesis se escogieron 16 cepas, 15 pertenecientes al género *Bacillus*, y una cepa del género *Staphylococcus* que se utilizó como grupo externo en la generación del árbol filogenético.

Estas cepas fueron aisladas en el sistema hidrológico Churince, perteneciente al VCC, cuya localización y aspecto se muestra en la **Figura 2A** y **2B**, y provienen de cuatro microambientes distintos, dos acuáticos y dos de suelo, como se ilustra en la **Figura 2C**. En la **Figura 2D** se muestra un árbol filogenético construido con las secuencias de la región hipervariable 5' del gen ribosomal 16S, reportadas por Valdivia (Valdivia-Anistro *et al.*, 2015). El árbol se realizó alineando las secuencias con el algoritmo ClustalW y utilizando el software MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011) según las recomendaciones de Hall (Hall, 2013).

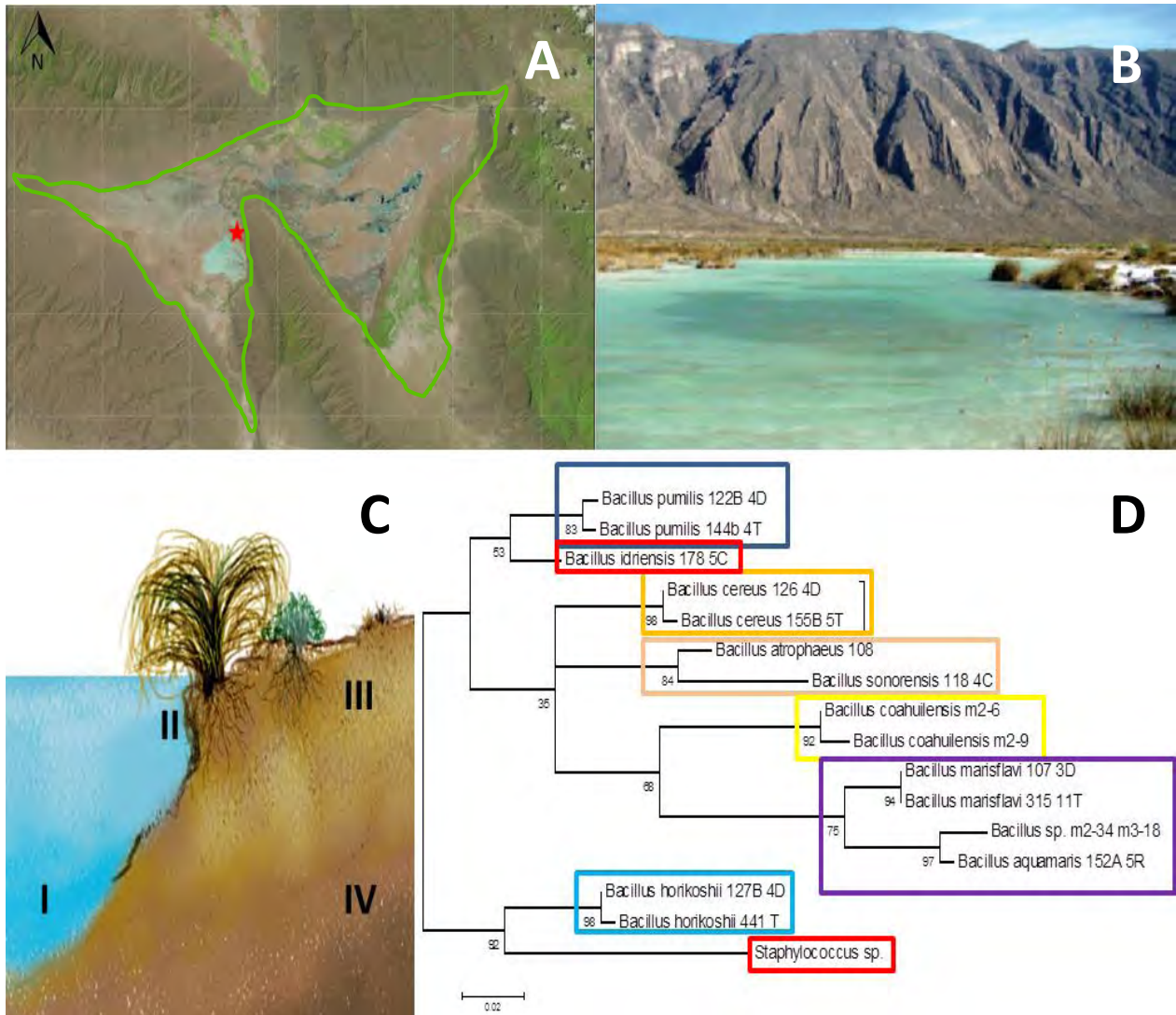


Figura 2. Descripción del sitio de aislamiento y características de las cepas utilizadas. El sistema hidrológico Churince (A, estrella roja) se encuentra al pie de la sierra de San Marcos (B). Las cepas de este estudio se aislaron de 4 microambientes distintos, columna de agua (C-I), muestra de agua próxima a la raíz de una planta (C-II), parte superficial del sedimento (C-III), y parte interna del sedimento (C-IV). Las cepas utilizadas se agrupan en 8 grupos filogenéticos (D), donde la cepa de *Staphylococcus* se utilizó como grupo externo. La imagen en (D) se tomó de la tesis doctoral de Eria Rebolgar (Rebolgar, 2012).

En la **Tabla 1** se muestra el nombre de las cepas, su especie, y el ambiente en que fueron aisladas.

Cepa	Especie	Sitio de aislamiento
169A_5R	<i>Staphylococcus</i>	AP
118_4C	<i>Bacillus sonorensis</i>	A
108	<i>Bacillus atrophaeus</i>	SS
152A_5R	<i>Bacillus aquamaris</i>	AP
m3-18	<i>Bacillus sp. m2-34</i>	A
441_T	<i>Bacillus horikoshii</i>	SS
m2-9	<i>Bacillus coahuilensis</i>	A
m2-6	<i>Bacillus coahuilensis</i>	A
315_11T	<i>Bacillus marisflavi</i>	SS
126_4D	<i>Bacillus cereus</i>	SB
144b_4T	<i>Bacillus pumilis</i>	SS
127B_4D	<i>Bacillus horikoshii</i>	SB
122B_4D	<i>Bacillus pumilis</i>	SB
107_3D	<i>Bacillus marisflavi</i>	SB
178_5C	<i>Bacillus idriensis</i>	A
155B_5T	<i>Bacillus cereus</i>	SS

Tabla 1. Identidad de las cepas y sitio de aislamiento. AP = Agua próxima a las raíces de una planta, A = Columna de agua, SS = Sedimento Superficial, SB = Sedimento basal o interno.

Modelado del Crecimiento Microbiano.

La técnica más utilizada de la microbiología es el crecimiento de los microorganismos en cultivos de laboratorio, pero no fue sino hasta finales de 1940 cuando Jaques Monod propuso una relación matemática formal para describir este proceso de expansión poblacional (Monod, 1949). En los cultivos discontinuos o en lote, en donde hay una cantidad finita de nutrientes, el incremento en la población microbiana se puede describir en una curva de crecimiento de tres fases: fase de adaptación, fase exponencial, y fase estacionaria o asintótica (Zwietering *et al.*, 1990).

En la fase de adaptación las bacterias se encuentran en una densidad baja, la población monitorea su nuevo ambiente y empieza la transcripción y preparación fisiológica para la siguiente fase (Rolfe *et al.*, 2012; Yates and Smotzer, 2007). En la fase de crecimiento exponencial las células modifican globalmente la expresión génica y hay un crecimiento poblacional constante y exponencial, proporcional al número de individuos y a los recursos disponibles (Matsumoto *et al.*, 2013; Scott and Hwa, 2011; Hagen, 2010). En la última fase de crecimiento, la fase estacionaria, se reduce la tasa de reproducción y se llega a un equilibrio en la población, además de que hay cambios metabólicos que permiten a las células resistir el estrés nutricional y ambiental (Yates and Smotzer, 2007; Navarro Llorens *et al.*, 2010; Ishihama, 1997). En la **Figura 3** se muestran las tres fases de crecimiento.



Figura 3. Fases del crecimiento microbiano. En un cultivo en lote (sistema cerrado) la población microbiana (N) crece siguiendo una función sigmoidea. El límite entre cada una de las fases depende de los parámetros de la curva (leer texto).

Determinación de las condiciones y parámetros de crecimiento de los bacilos estudiados.

Experimentalmente, los datos para generar curvas de crecimiento se obtienen a través de la determinación de la densidad óptica del cultivo (DO), o de la determinación del número de unidades formadoras de colonias (UFC). Cada método tiene sus ventajas prácticas, pero los datos producidos pueden ser sensiblemente distintos (Dalgaard and Koutsoumanis, 2001; Biesta-Peters *et al.*, 2010; Perni *et al.*, 2005a; Dalgaard *et al.*, 1994). Aunque la medición de DO puede automatizarse, lo que requiere menos esfuerzo por parte del experimentador, esta técnica subestima los valores de los parámetros de crecimiento (Biesta-Peters *et al.*, 2010), y además requiere iniciar los cultivos con una densidad celular alta ($>1 \times 10^7$ células mL⁻¹), lo cual limita el periodo en que se observan cambios en la densidad poblacional. Por esta razón se decidió utilizar el método de UFC para este estudio (ver Materiales y Métodos).

También se hicieron pruebas para determinar cuál sería el medio de cultivo, pues el Medio Marino (MM) que se utiliza normalmente para el crecimiento de estas cepas (Difco™ Marine Broth, BD and Company) resultó en curvas de crecimiento que tomaban mucho tiempo (>12 horas continuas) en llegar a la fase estacionaria y mantenían una densidad celular baja (ver **Apéndice I a**), lo cual hacía impráctico el monitoreo constante y prolongado de cada cultivo. Después de ensayos con diferentes combinaciones de nutrientes, decidimos utilizar un medio consistente en agua estéril extraída del sistema Churince de Cuatro Ciénegas suplementada con 5g L⁻¹ de peptona (Bacto™ Tryptone, BD and Company), que resultó mejor que el MM y otras combinaciones (ver **Apéndice I b**). Es notable el hecho de que solo el medio preparado con agua estéril de Cuatro Ciénegas es capaz de soportar un crecimiento bacteriano en altas densidades. Este tipo de medios de cultivos, en los que se busca reproducir las condiciones

naturales de crecimiento de los microorganismos, han sido utilizados ampliamente en el campo de la ecología microbiana a pesar de ser medios no definidos ni replicables (Kaeberlein *et al.*, 2002; Stewart, 2012; Zengler *et al.*, 2002).

Para cada cepa se siguió la siguiente estrategia experimental: se tomó un inóculo del vial de la cepa (las alícuotas conservadas a -20°C , en 70% glicerol) y se creció en un matraz con MM estéril por un periodo de 24 horas (**Figura 4A**), luego se transfirió un inóculo en tres nuevos matraces (réplicas) con medio CCBw que crecieron por 12 horas (**Fig. 4B**). Finalmente se inició un nuevo cultivo de cada réplica con una DO_{600} inicial de 0.05 unidades, que correspondieron a $\sim 1 \times 10^7$ UFC (**Fig. 4C**). Todos los cultivos se mantuvieron en incubación a 35°C con agitación constante a 150 rpm, monitoreando la DO_{600} hasta la saturación de los cultivos. En intervalos regulares se tomaron muestras para la determinación de UFC, y también muestras de biomasa en cada fase de la curva (asteriscos morados, **Fig. 4D**), que se utilizaron posteriormente en análisis de composición estequiométrica (grupo del profesor James Elser, Arizona State University), y para la cuantificación y análisis de expresión de proteínas totales. Los datos generados con la técnica de UFC pueden ajustarse a una función sigmoidea de crecimiento. Zwietering *et al.* (1990) revisaron extensivamente los modelos de crecimiento más utilizados, y determinaron que el modelo de Gompertz es el mejor para la mayoría de los casos que estudiaron (Zwietering *et al.*, 1990). Estos resultados se han confirmado y ampliado en otros trabajos (Zwietering *et al.*, 1992; Biesta-Peters *et al.*, 2010; Dalgaard *et al.*, 1994; Perni *et al.*, 2005).

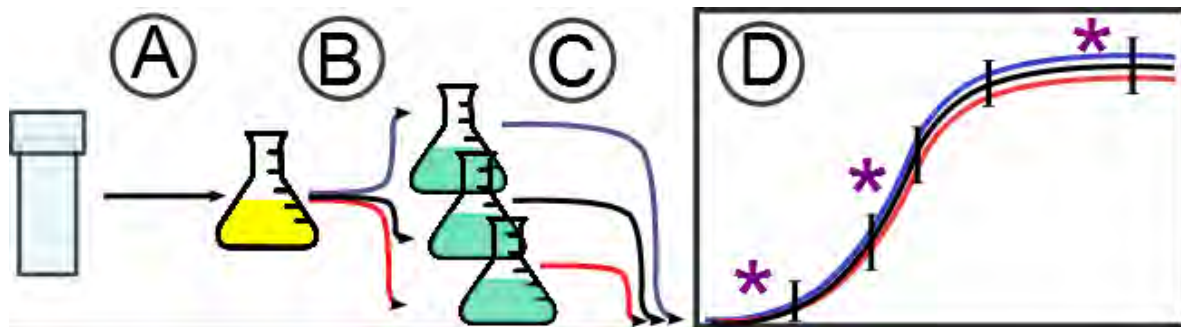


Figura 4. Estrategia seguida para generar curvas de crecimiento. Se tomó una muestra de la cepa (A) y se creció en medio marino (B) por 24 horas. Luego se hicieron tres cultivos nuevos en medio CCBw y crecieron por 12 horas (B). Finalmente estos cultivos se transfirieron a medio CCBw fresco (C), y se iniciaron las curvas de crecimiento (D). En intervalos regulares se tomaron muestras para realizar conteo de UFC, y también muestras de biomasa (asteriscos morados) para análisis posteriores.

Este modelo se implementó en el software CurveExpert Professional 2.0, y en el software estadístico R, versión 3.2.2, utilizando el paquete "grofit" (Kahm *et al.*, 2010). El procesamiento es simple: los datos experimentales (Figura 5 panel izquierdo, puntos rojos) se ajustan de manera iterada a la función buscando minimizar la diferencia entre la curva obtenida y los datos experimentales.

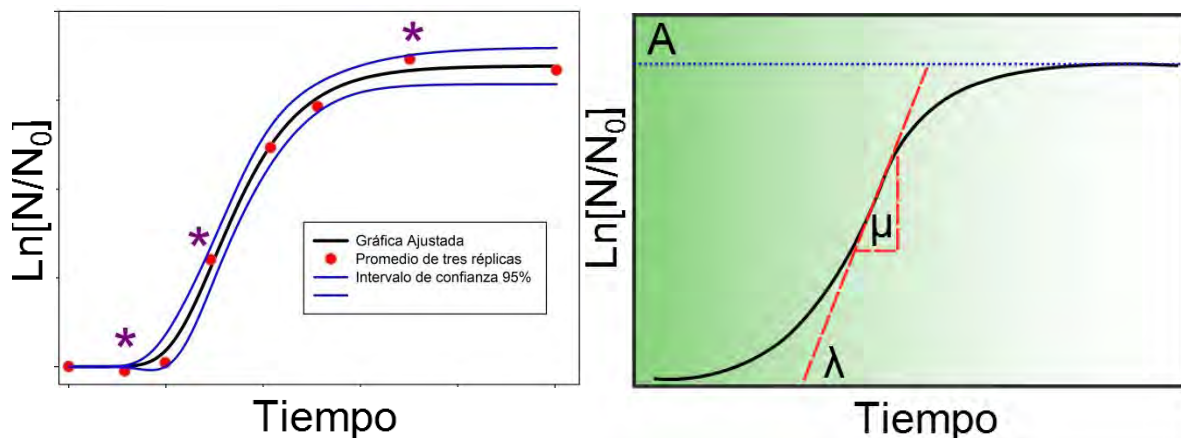


Figura 5. Ajuste de datos a una función sigmoidea. En el panel izquierdo se muestra cómo se ajustan los datos experimentales para generar una curva de crecimiento. En la derecha se muestra cómo se obtienen los tres parámetros de crecimiento (ver texto para más detalles).

El modelo Gompertz nos permite calcular tres parámetros: λ (h), μ (h^{-1}), y **A** (sin unidades), cuya representación gráfica se muestra en la **Figura 5** (panel derecho). En términos biológicos, λ representa la duración de la fase de adaptación, μ representa la tasa máxima de crecimiento que alcanza la población en la fase exponencial, y el término **A** representa la máxima densidad del cultivo en la fase estacionaria (Zwietering *et al.*, 1990). En términos matemáticos simples, μ representa la pendiente máxima que alcanza la curva, λ representa la intersección de μ en el eje del tiempo, y **A** representa el valor asintótico de la función, o su valor máximo (Zwietering *et al.*, 1990; Perni *et al.*, 2005b).

Las curvas de crecimiento obtenidas con este proceso se muestran en la **Figura 6**, donde se aprecia que existe una variación considerable en la forma de las curvas, y por ende en los valores de sus parámetros λ , μ y **A**. Los valores numéricos obtenidos para cada cepa se muestran en la **Tabla 2**. Los valores mostrados en esta sección, así como el procedimiento, están publicados en Valdivia-Anistro *et al.*, 2015, anexo en el **Apéndice II**.

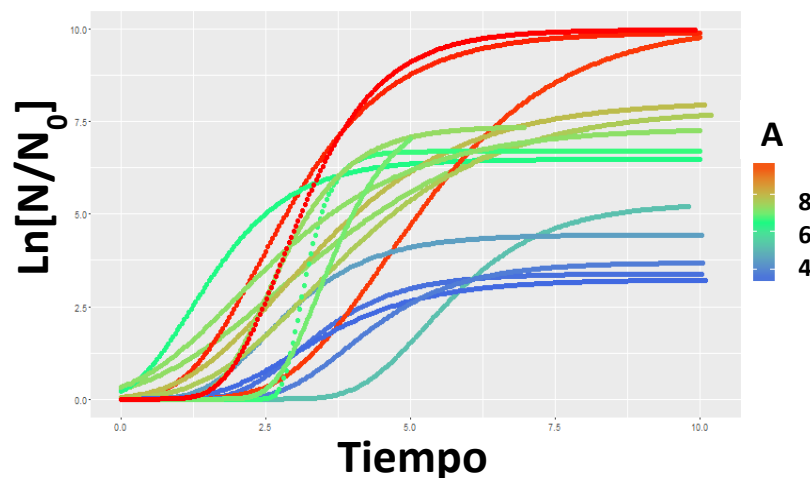


Figura 6. Curvas de crecimiento obtenidas. Se muestra la comparación de todas las curvas de crecimiento, marcadas con colores proporcionales al parámetro **A**.

Cepa	Especie	λ (h)	μ (h ⁻¹)	A
169A_5R	<i>Staphylococcus</i>	0.921	0.26	7.3
118_4C	<i>Bacillus sonorensis</i>	1.128	0.24	9.899
108	<i>Bacillus atropheus</i>	2.061	0.08	3.38
152A_5R	<i>Bacillus aquamaris</i>	0.224	0.16	6.483
m3-18	<i>Bacillus sp. m2-34</i>	2.892	0.24	9.78
441_T	<i>Bacillus horikoshii</i>	4.117	0.19	5.2
m2-9	<i>Bacillus coahuilensis</i>	1.08	0.22	7.954
m2-6	<i>Bacillus coahuilensis</i>	1.45	0.21	7.68
315_11T	<i>Bacillus marisflavi</i>	1.44	0.12	4.44
126_4D	<i>Bacillus cereus</i>	2.602	0.23	6.69
144b_4T	<i>Bacillus pumilis</i>	2.795	0.11	3.679
127B_4D	<i>Bacillus horikoshii</i>	1.7	0.09	3.22
122B_4D	<i>Bacillus pumilis</i>	1.7	0.31	7.35
107_3D	<i>Bacillus marisflavi</i>	0.25	0.19	7.266
178_5C	<i>Bacillus idriensis</i>	2.66	0.57	7.026
155B_5T	<i>Bacillus cereus</i>	1.83	0.92	9.984

Tabla 2. Valores de los parámetros de crecimiento. Se muestran los valores obtenidos para cada cepa.

Al comparar los parámetros obtenidos en nuestro grupo de estudio con otros trabajos representativos en el género *Bacillus*, encontramos que son comparables dentro de gran parte del intervalo obtenido (**Tabla 3**, modificado de Valdivia-Anistro *et al.*, 2015).

Especie	λ	μ (h ⁻¹)	Referencia
<i>B. subtilis</i>		0.00006	(Overkamp <i>et al.</i> , 2015)
<i>Bacillus cereus</i>	2.87-7.95	0.312-0.349	(Pla <i>et al.</i> , 2015)
<i>Bacillus cereus</i>	1.78-2.73	0.01-3.3	(Biesta-Peters <i>et al.</i> , 2010)
<i>Bacillus cereus</i>	8.4-88.4	0.033-0.26	(Valero <i>et al.</i> , 2003)
<i>B. stearothersophilus</i>	2.1-27	0.2-1.6	(Ng <i>et al.</i> , 2002)
<i>B. licheniformis</i>	-	0.02-0.6	(Bulthuis <i>et al.</i> , 1993)
<i>Bacillus caldotenax</i>	-	0.12-3.1	(Kuhn <i>et al.</i> , 1980)

Tabla 3. Parámetros de crecimiento publicados en otros trabajos sobre *Bacillus*. Se muestran los valores de λ y μ que se han obtenido en otros estudios hechos en el género (los guiones representan la ausencia de dicho valor en los trabajos citados).

En especial podemos mencionar los valores que obtuvimos para μ (tasa máxima de crecimiento) son consistentes con un trabajo hecho en un ambiente oligotrófico marino (muy similar al VCC), donde se menciona que el valor típico de este parámetro en estas condiciones es de 0.2 h⁻¹ (Cavicchioli *et al.*, 2003). Estas comparaciones, sin embargo, deben ser cuidadosas, pues es conocido que la composición del medio de cultivo, la temperatura, la densidad del inóculo inicial, el pH, la eficiencia de la maquinaria de traducción proteica, el

estado de la expresión génica global, y muchas otras variables afectan el comportamiento de las curvas de crecimiento (Kuhn *et al.*, 1980; Perni *et al.*, 2005b; Sung and Yasbin, 2000; Bosdriesz *et al.*, 2015; Piir *et al.*, 2011; Scott *et al.*, 2014; Klumpp and Hwa, 2014; Ratkowsky *et al.*, 2005).

Cuantificación de la síntesis proteica en las tres fases de crecimiento.

Se extrajeron proteínas totales a partir de las muestras de biomasa tomadas durante las tres fases de las curvas de crecimiento (ver **Fig. 4**), y se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Lowry (ver Materiales y Métodos). En la **Tabla 4** se muestran valores que representan concentración promedio de proteínas totales (en $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) de tres réplicas para cada cepa.

Estos tres parámetros nuevos (Φ_L , Φ_E , y Φ_S) reflejan la cantidad de síntesis proteica *por unidad de volumen* de cultivo. Es importante remarcar este dato, pues en la siguiente sección se describe el cálculo de parámetros que reflejan la cantidad de proteínas *por célula*.

Cepa	Especie	ΦL ($\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$)	ΦE ($\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$)	ΦS ($\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$)
169A_5R	<i>Staphylococcus</i>	8.52	9.6	6
118_4C	<i>Bacillus sonorensis</i>	9.87	5.92	12.81
108	<i>Bacillus atrophaeus</i>	11.24	11.75	10.62
152A_5R	<i>Bacillus aquamaris</i>	7.48	9.07	5.46
m3-18	<i>Bacillus sp. m2-34</i>	8.26	10.22	8.38
441_T	<i>Bacillus horikoshii</i>	10.74	11.81	14.45
m2-9	<i>Bacillus coahuilensis</i>	8.96	12.14	12.86
m2-6	<i>Bacillus coahuilensis</i>	8.06	12.38	15.54
315_11T	<i>Bacillus marisflavi</i>	8.8	11.88	10.07
126_4D	<i>Bacillus cereus</i>	11.87	9.07	3.93
144b_4T	<i>Bacillus pumilis</i>	7.16	12.78	9.09
127B_4D	<i>Bacillus horikoshii</i>	13.13	11.27	9.95
122B_4D	<i>Bacillus pumilis</i>	11.2	8.78	12.59
107_3D	<i>Bacillus marisflavi</i>	9.52	14.16	8.77
178_5C	<i>Bacillus idriensis</i>	9.33	10.15	4.61
155B_5T	<i>Bacillus cereus</i>	7.24	8.88	5.36

Tabla 4. Concentración de proteínas en los cultivos. Se muestran los valores promedio (tres réplicas) de la concentración de proteínas durante las tres fases de crecimiento.

Estimación de la síntesis proteica a nivel celular.

Con los datos generados en la **Tabla 4** podemos comparar entre diferentes cepas la síntesis global que una unidad de volumen de un cierto cultivo produce. Es decir, estamos analizando un parámetro poblacional, que bien podría diferir de los procesos que se llevan a cabo a nivel celular. Usualmente células de distintas cepas o especies difieren en volumen celular, o en la cantidad y eficiencia de ribosomas y operones ribosomales, lo cual afecta en gran medida la tasa de síntesis proteica a nivel celular (Bosdriesz *et al.*, 2015; Weider *et al.*, 2005; Yano *et al.*, 2013; Molenaar *et al.*, 2009). De hecho, como se describió en la introducción, las cepas utilizadas en este estudio se caracterizan por una alta variabilidad en el número de operones ribosomales (Valdivia-Anistro *et al.*, 2015).

Aunque no se hizo una determinación directa de la cantidad de proteínas por célula, con los datos obtenidos hasta ahora se pudo hacer una estimación, tomando ventaja de que la técnica de UFC es una buena aproximación al número de células por unidad de volumen (Hazan *et al.*, 2012; JH, 1972), y de que la cantidad de proteínas por unidad de volumen es conocida (**Tabla 4**). El cálculo hecho para este propósito se muestra en la **Figura 7**.

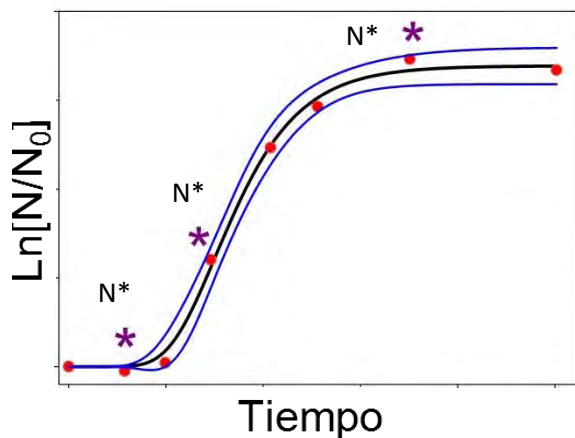


Figura 7. Aproximación de la cantidad intracelular de proteínas. Se tomó ventaja de los datos generados en las curvas de crecimiento y la cuantificación de proteínas para extrapolar este dato a nivel celular.

* Momento de toma de la muestra de biomasa.

N_0 = Número inicial de células (dato conocido).

N^* = Número de células al momento de la toma de muestra (dato desconocido).

Al observar los ejes de la curva, vemos que $Y = \ln[N/N_0]$, entonces podemos sustituir N por N^* , para obtener:

$$\exp^Y = N^*/N_0, \text{ que da } N^* = (\exp^Y)(N_0)$$

Finalmente podemos dividir Φ_L , Φ_S , o Φ_E , por el correspondiente valor de N^* ,

$$\frac{\Phi_L [\text{proteínas} * \text{volumen}^{-1}]}{N^* [\text{células} * \text{volumen}^{-1}]}$$

Y el valor resultante tendrá unidades de proteínas* células⁻¹.

Con estos cálculos (Fig. 7) se obtuvieron los datos que se muestran en la **Tabla 5**, que constituyen tres nuevas variables. Un examen breve nos permite reconocer que en efecto los datos entre las tablas 4 y 5 son cualitativa y cuantitativamente distintos. Por ejemplo, mientras que la cepa 118_4C (*Bacillus sonorensis*) tiene valores decrecientes en la **Tabla 5** ($C-\Phi_L > C-\Phi_E > C-\Phi_S$), sus valores en la **Tabla 4** tienen otra relación ($\Phi_E < \Phi_S > \Phi_L$).

El valor de estas nuevas variables está en un intervalo entre nanogramos y femtogramos de proteínas por bacteria, lo que concuerda con resultados publicados para otras bacterias (Peng *et al.*, 2004; Loferer-Krössbacher *et al.*, 1998). En especial cabe mencionar el trabajo de Zubkov *et al.*, donde examina bacterias de origen marino de distintas especies, y encuentra cantidades intracelulares de proteínas de entre 0.25 nanogramos hasta 24 femtogramos, comparables a los de la **Tabla 5** (Zubkov *et al.*, 1999).

Cepa	Especie	C-ΦL (g célula ⁻¹)	C-ΦE (g célula ⁻¹)	C-ΦS (g célula ⁻¹)
169A_5R	<i>Staphylococcus</i>	3.61 X 10 ⁻¹⁰	3.46 X 10 ⁻¹¹	3.23 X 10 ⁻¹²
118_4C	<i>Bacillus sonorensis</i>	1.58 X 10 ⁻¹⁰	2.05 X 10 ⁻¹²	1.24 X 10 ⁻¹³
108	<i>Bacillus atrophaeus</i>	6.65 X 10 ⁻¹⁰	2.02 X 10 ⁻¹⁰	2.61 X 10 ⁻¹¹
152A_5R	<i>Bacillus aquamaris</i>	2.62 X 10 ⁻¹⁰	2.11 X 10 ⁻¹⁰	4.82 X 10 ⁻¹²
m3-18	<i>Bacillus sp. m2-34</i>	6.81 X 10 ⁻¹¹	1.37 X 10 ⁻¹¹	8.53 X 10 ⁻¹⁴
441_T	<i>Bacillus horikoshii</i>	2.09 X 10 ⁻¹⁰	2.80 X 10 ⁻¹²	1.83 X 10 ⁻¹³
m2-9	<i>Bacillus coahuilensis</i>	1.29 X 10 ⁻¹⁰	9.07 X 10 ⁻¹²	4.70 X 10 ⁻¹³
m2-6	<i>Bacillus coahuilensis</i>	7.70 X 10 ⁻¹¹	2.92 X 10 ⁻¹¹	1.32 X 10 ⁻¹³
315_11T	<i>Bacillus marisflavi</i>	2.96 X 10 ⁻⁰⁸	3.78 X 10 ⁻¹⁰	1.58 X 10 ⁻¹²
126_4D	<i>Bacillus cereus</i>	1.86 X 10 ⁻¹¹	1.26 X 10 ⁻¹²	1.03 X 10 ⁻¹⁴
144b_4T	<i>Bacillus pumilis</i>	1.17 X 10 ⁻⁰⁹	1.53 X 10 ⁻¹¹	1.34 X 10 ⁻¹³
127B_4D	<i>Bacillus horikoshii</i>	5.26 X 10 ⁻¹⁰	4.13 X 10 ⁻¹¹	1.35 X 10 ⁻¹¹
122B_4D	<i>Bacillus pumilis</i>	6.60 X 10 ⁻⁰⁹	1.39 X 10 ⁻¹⁰	8.06 X 10 ⁻¹¹
107_3D	<i>Bacillus marisflavi</i>	6.10 X 10 ⁻¹¹	9.04 X 10 ⁻¹¹	3.08 X 10 ⁻¹³
178_5C	<i>Bacillus idriensis</i>	1.93 X 10 ⁻⁰⁹	9.39 X 10 ⁻¹⁰	5.41 X 10 ⁻¹⁴
155B_5T	<i>Bacillus cereus</i>	1.57 X 10 ⁻¹⁰	2.18 X 10 ⁻¹²	6.67 X 10 ⁻¹⁴

Tabla 5. Cantidad proteica a nivel celular. Los datos que se generan en la técnica UFC se utilizaron junto con los de la Tabla 4, y se calculó la cantidad intracelular de proteínas totales.

Análisis de la expresión diferencial de proteínas en las tres fases de crecimiento.

Con las múltiples muestras de biomasa tomadas en las tres fases de las curvas, se extrajeron proteínas para examinar la expresión global de las proteínas mediante geles de acrilamida y tinción de Coomassie (ver Materiales y Métodos). Para cada cepa se cargaron tres carriles

con el mismo volumen de extracto proteico, cada carril representando una fase de la curva de crecimiento.

Con las imágenes de los geles se hizo un análisis semicuantitativo ilustrado en la **Figura 8** y explicado a continuación. Las imágenes capturadas originalmente en color se convirtieron a archivos de 8 bits (escala de grises) utilizando el software Fiji (Schindelin *et al.*, 2012) **Fig. 8A**. Una vez hecha esta transformación se ajustaron los valores de brillo y contraste manualmente para el gel de cada cepa, y se guardó la imagen.

Aprovechando el hecho de que una imagen es un arreglo de pixeles en una matriz $n \times m$ (**Figura 8B**), se decidió trabajar con los valores numéricos de este arreglo, para lo cual se transformaron todas las imágenes generadas en Fiji a objetos numéricos que contenían los valores de cada pixel.

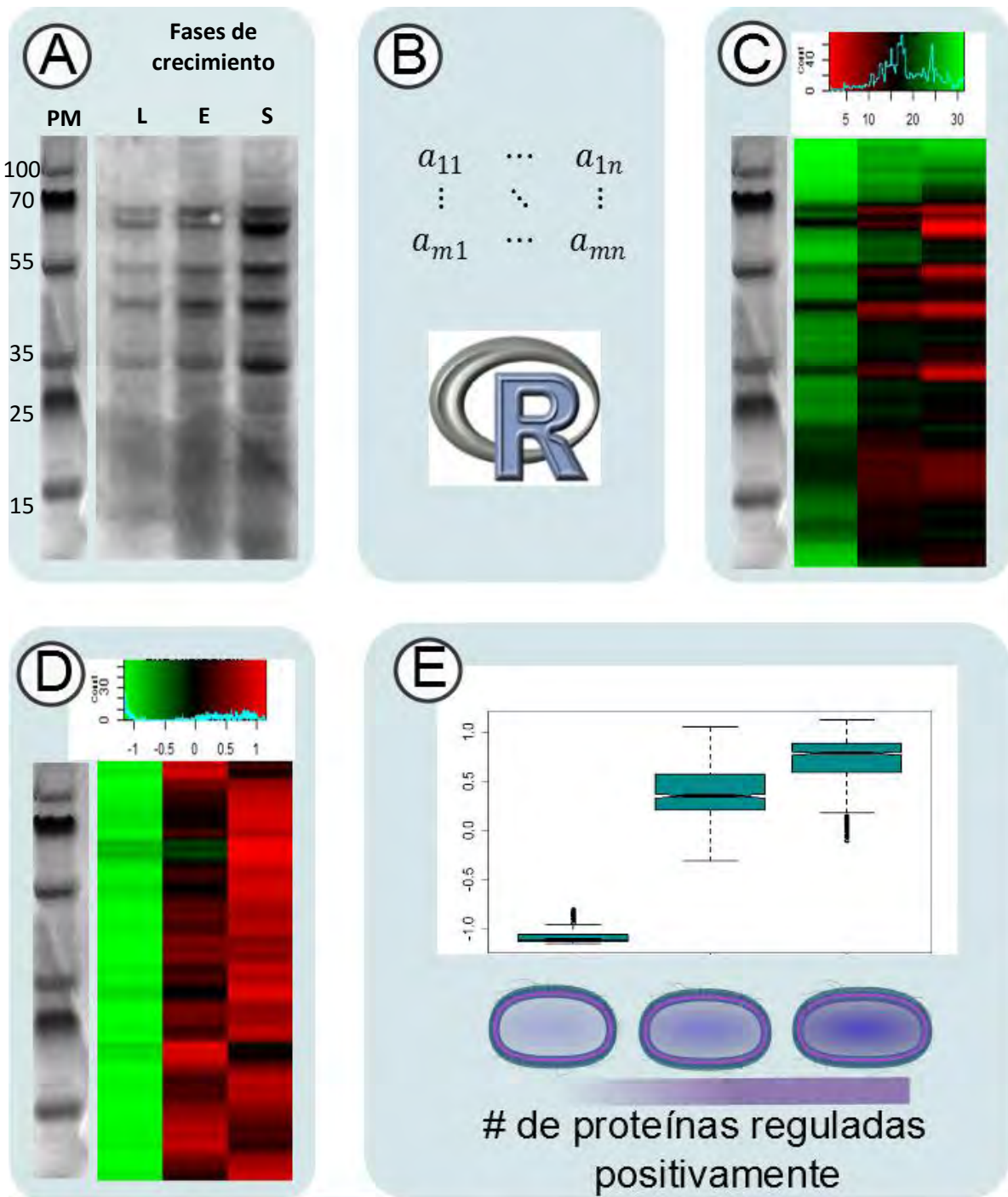


Figura 8. Se muestra el proceso de análisis de los geles de acrilamida. A) Para cada cepa se corrieron tres carriles de extractos proteicos, que corresponden a las tres fases de crecimiento (L-Adaptación, E-exponencial, y S-estacionaria, PM-peso molecular en kDa), y las imágenes de los geles de acrilamida se transformaron a escala de grises de 8 bits. B) Los archivos de 8 bits se transformaron a matrices numéricas mediante el software R. C) cada carril se convirtió a un mapa de colores de acuerdo al valor absoluto de los píxeles, y en el inciso D vemos la normalización de estos valores, que en E aparecen como gráficos de caja.

Esta transformación de las imágenes a matrices se realizó utilizando el software estadístico R

versión 3.2.2 (R core team, 2015), y la matriz obtenida se redujo a una sola columna matriz

que representa la intensidad de pixeles a lo largo de los diferentes pesos moleculares del carril y así, cada carril pudo visualizarse mediante un mapa de colores (Fig. 8C).

Luego se normalizó el valor de los pixeles entre los tres carriles de cada cepa. El resultado visual se muestra en la Figura 8D, donde los colores representan los valores Z (de una distribución normal centrada en cero) de cada banda distinguible en los carriles. Por último, se hizo un gráfico de caja para representar la distribución de valores Z de los tres carriles de cada cepa (Figura 8E).

Con este tipo de visualización semicuantitativa, podemos preguntarnos ¿en qué fase de la curva de crecimiento se observa una mayor cantidad de proteínas en comparación a las otras fases? Al responder esta pregunta, se clasificaron las cepas en tres categorías: α , β y γ . En la Figura 9 se observa un ejemplo de cada categoría, que a partir de ahora llamaremos estrategias metabólicas α , β , y γ .

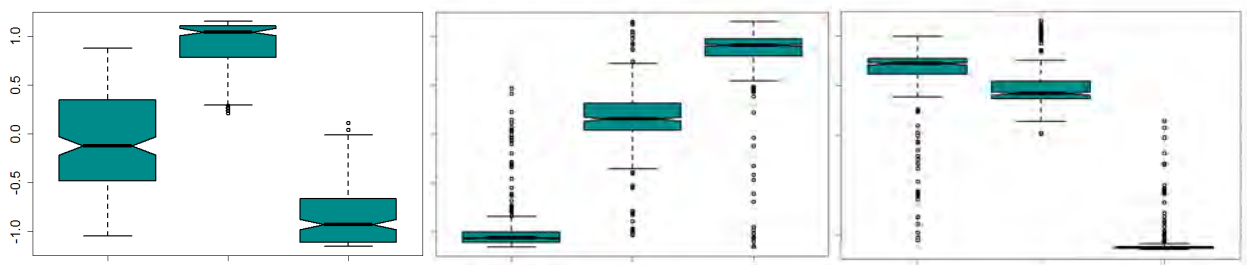


Figura 9. Diferentes estrategias metabólicas de síntesis proteica. En el panel izquierdo se muestra una cepa con estrategia α , en el panel de en medio se muestra el gráfico de una cepa con estrategia β , y en el último panel la estrategia γ . El eje Y representa los valores Z y en X se ordenan las fases de adaptación, exponencial y estacionaria.

Esta clasificación es importante (Tabla 6) pues refleja la fase de crecimiento en que existe más inversión de energía celular en la *regulación y síntesis* de proteínas y por lo tanto es un reflejo de los procesos metabólicos intrínsecos a la fisiología del crecimiento de las cepas en estudio.

Cepa	Especie	E. M.
169A_5R	<i>Staphylococcus</i>	α
118_4C	<i>Bacillus sonorensis</i>	γ
108	<i>Bacillus atropheus</i>	α
152A_5R	<i>Bacillus aquamaris</i>	α
m3-18	<i>Bacillus sp. m2-34</i>	β
441_T	<i>Bacillus horikoshii</i>	β
m2-9	<i>Bacillus coahuilensis</i>	β
m2-6	<i>Bacillus coahuilensis</i>	β
315_11T	<i>Bacillus marisflavi</i>	α
126_4D	<i>Bacillus cereus</i>	α
144b_4T	<i>Bacillus pumilis</i>	β
127B_4D	<i>Bacillus horikoshii</i>	α
122B_4D	<i>Bacillus pumilis</i>	β
107_3D	<i>Bacillus marisflavi</i>	γ
178_5C	<i>Bacillus idriensis</i>	α
155B_5T	<i>Bacillus cereus</i>	α

Tabla 6. Estrategias de metabolismo proteico de los *Bacillus* estudiados. E.M. = Estrategia metabólica.

Análisis de correlación y componentes principales del conjunto de variables determinadas para los *Bacillus* en estudio.

¿Cuál es el significado que tienen los valores de las variables hasta ahora calculadas? Para entender la interdependencia de estas variables y la posible relación que guardan con el medio en que se aislaron las cepas, se hicieron dos tipos de análisis: de correlación entre todas las variables, y de componentes principales. Para este fin, las variables obtenidas de las curvas de crecimiento (μ , λ y A) y de la expresión de proteínas (Φ_L , Φ_E , Φ_S , C- Φ_L , C- Φ_E , y C- Φ_S) se agregaron a las siguientes variables determinadas por Valdivia *et al.* (2015): P (% de Fósforo en biomasa), N (% de Nitrógeno en biomasa), C (% de Carbono en biomasa) y el número de operones de RNA ribosomal. Con el conjunto de todas estas variables se hizo una matriz de datos para realizar diversos análisis estadísticos.

Se hizo un análisis de correlación lineal entre todos los pares de variables, en el que se confirmó la correlación encontrada por Valdivia *et al.* entre el contenido de Fósforo y el número de operones ribosomales ($p = 0.01$). Además, se encontraron cuatro nuevas asociaciones significativas. El coeficiente de correlación de Pearson (R) y el valor P de todas las variables se encuentran en la **Figura 10** (para que una asociación fuese significativa se consideró que el valor de P fuera < 0.05).

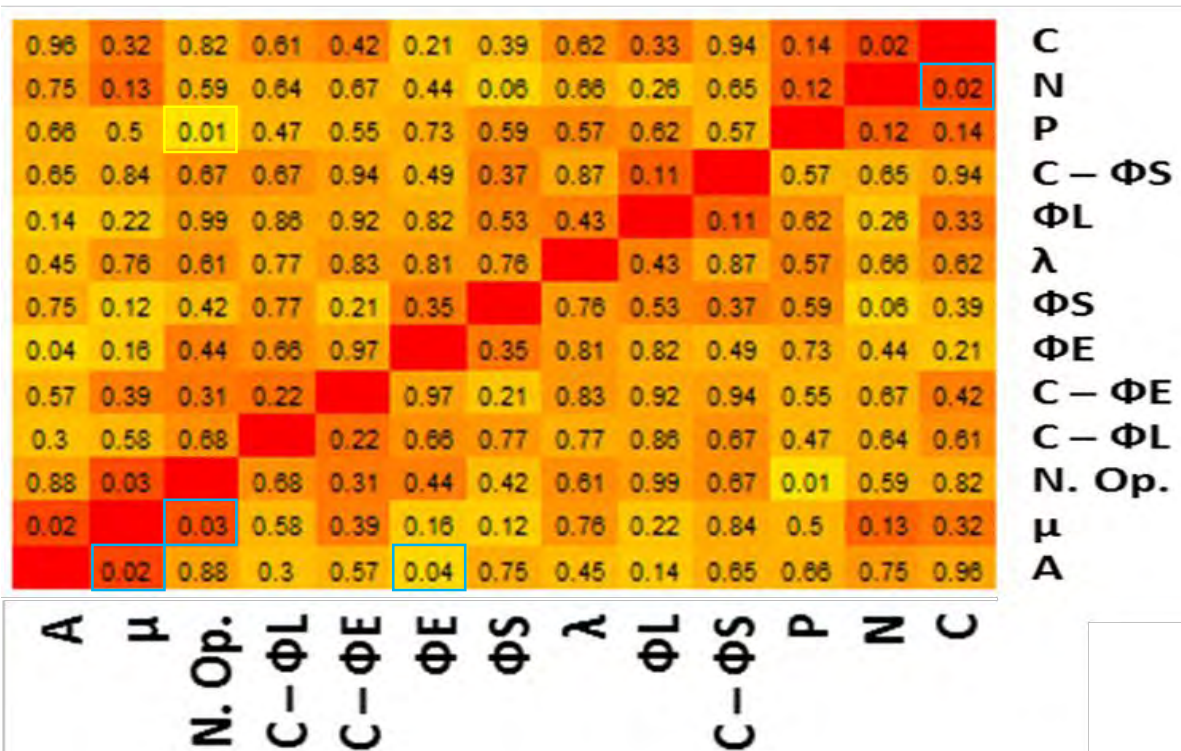
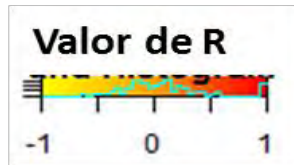


Figura 10. Matriz de resultados del análisis de correlación. Se muestran los resultados de correlación para todas las variables descritas en esta tesis y aquellas publicadas por Valdivia *et al.* (2015). N. Op. = Número de operones en las cepas. P, C y N son las proporciones de fósforo, carbono y nitrógeno en cada cepa durante la fase exponencial (Valdivia-Anistro *et al.*, 2015). μ , λ y A son la tasa máxima de crecimiento, la fase de adaptación y la densidad celular máxima, respectivamente. ϕ L, ϕ E y ϕ S representan las concentraciones de proteínas en cultivo, en las fases de adaptación, exponencial y estacionaria, respectivamente, mientras que C- ϕ L, C- ϕ E y C- ϕ S representan lo mismo pero a nivel celular. El color es proporcional al signo de la correlación (roja positiva, amarilla negativa), y los valores numéricos son los valores P.

Cuando existen sets de datos con múltiples variables, es usual reducir la dimensión del conjunto al mínimo de variables posible para una mejor interpretación y visualización de los resultados. Una técnica de reducción de dimensiones muy utilizada es el análisis de componentes principales (ACP). Este método convierte las n variables originales en k nuevas variables, llamadas componentes principales, que se clasifican de acuerdo a la cantidad de variación que conservan del set de datos original (Jolliffe and Cadima, 2016). Así, sets de datos

con muchas variables se pueden representar con unas pocas (los componentes principales), sin perder información estadística (Jolliffe and Cadima, 2016).

Se hizo un ACP para describir el conjunto de las variables encontradas en los *Bacillos* de este estudio, y se encontró que, de los 13 componentes principales, sólo dos son suficientes para explicar 42% de la variación total, lo cual representa una buena proporción de toda la variación. Por estos criterios se utilizaron estos dos componentes.

¿Qué variables influyen más en los componentes principales utilizados? Para representar qué tanto contribuye cada variable con los dos componentes principales seleccionados (y por lo tanto con el set completo de datos), se hizo la **Figura 11**. Podemos observar que los tres parámetros de crecimiento (μ , λ y A), así como el contenido de carbono y la cantidad intracelular de proteínas en las fases exponencial y estacionaria son las variables que contribuyen más en la descripción general de los datos. Además, en esta figura, la amplitud del ángulo entre dos variables cualquiera es inversamente proporcional a su correlación (Jolliffe and Cadima, 2016) y por ello podemos observar tres grupos de variables que se asocian entre sí, un grupo compuesto por μ , A y el número de operones, otro entre λ y el contenido de carbono, y el último grupo que es muy variable compuesto por las demás variables.

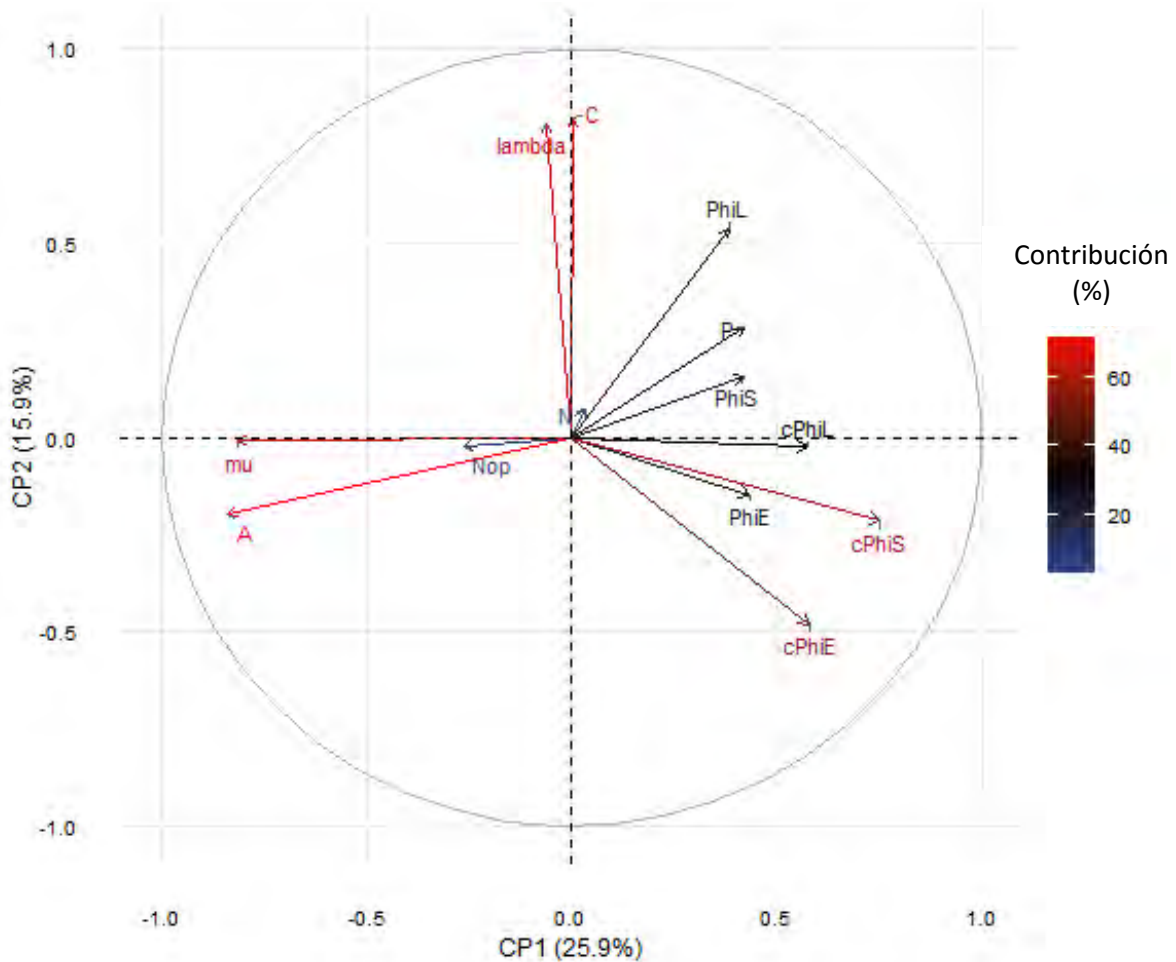


Figura 11. Contribución estadística de cada variable sobre el conjunto completo de datos. Cada flecha es un vector (eigenvectores) que representa la asociación de los dos componentes principales (CP1 y CP2) con cada variable. Además, se visualiza la contribución de las variables individuales en la descripción del set completo de datos. (Los nombres de variables son los mismos que se han usado, salvo: Nop = número de operones, Phi = Φ , lambda = λ , y mu = μ).

Con el ACP también existe la posibilidad de representar los datos individuales (en este caso, los individuos son las cepas utilizadas) en el plano de los componentes principales. Con estos mapas de individuos se asociaron las variables numéricas (contenidas en los componentes principales), con variables categóricas que consideramos relevantes. Así, se asociaron los datos con las siguientes variables categóricas: ambiente de aislamiento de la cepa (agua o sedimento), contenido de operones (bajo, medio, alto), tasa específica de crecimiento (baja, media, alta), valor de λ (bajo, medio, alto), valor de A (bajo, medio, alto), estrategia metabólica

(α , β , γ). De todas estas asociaciones, hubo dos que mostraron agrupaciones relevantes y significativas. Encontramos que si identificamos las cepas mediante el sitio en que se aislaron (agua o suelo/sedimento), se forman dos grupos significativamente distintos (t-Student, $p = 0.03$), asociación mostrada en la **Figura 12**.

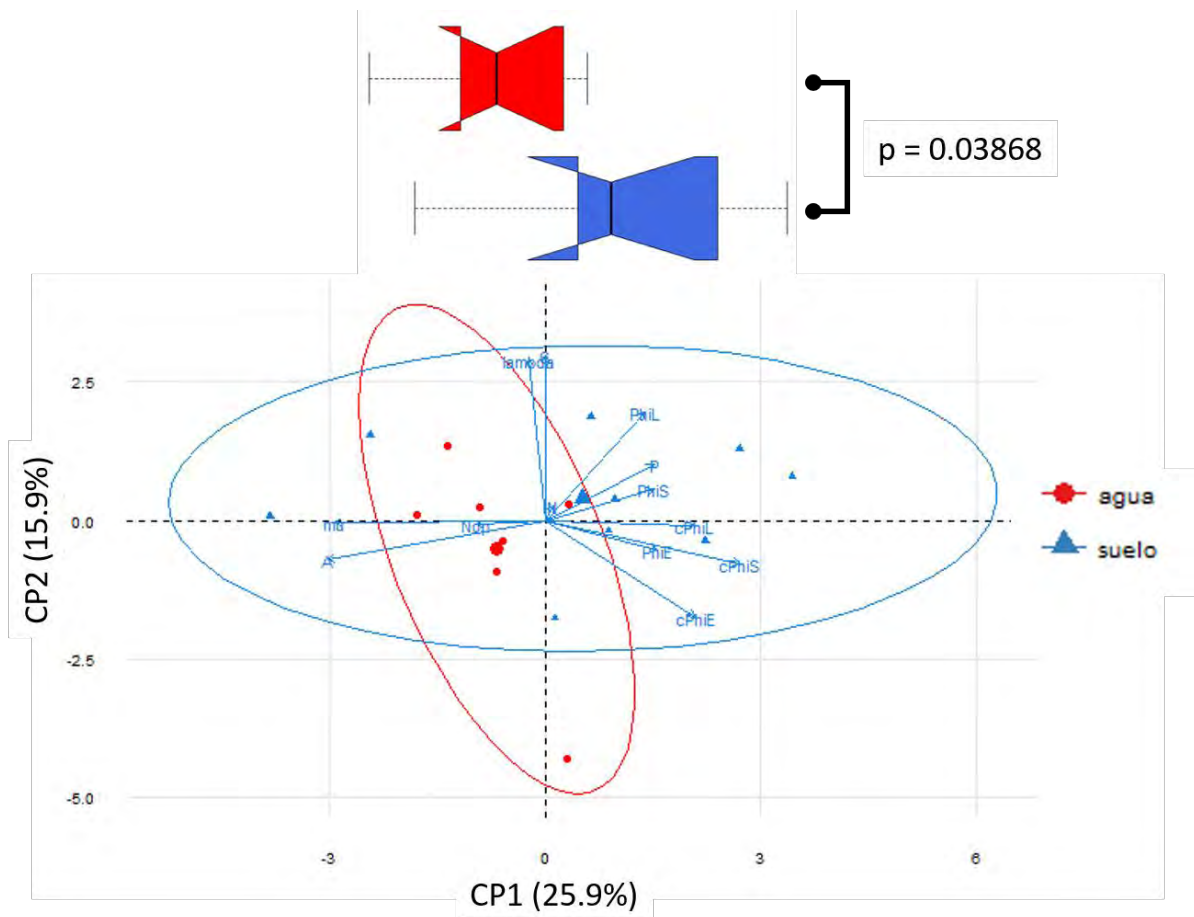


Figura 12. Relación entre el sitio de aislamiento y los valores de las variables en estudio. Podemos observar que si agrupamos las cepas en estudio por el sitio en que se aislaron, hay una diferencia estadística en la distribución de los valores en el eje del componente principal más importante.

El hecho de que los datos de las cepas se agrupen de acuerdo al ambiente es consistente con lo encontrado por Rebollar *et al.*, (2012) en un estudio hecho en el VCC con cepas del género *Exiguobacterium*, donde se determinó que las bacterias de este género tienen nichos definidos, de agua o de sedimento. Por otro lado, encontramos que si clasificamos la

densidad celular máxima alcanzada en baja, media y alta (de acuerdo a percentiles equivalentes), las cepas con densidad alta se distinguen estadísticamente de las de densidades medias y bajas (Figura 13). Debemos notar que a pesar de que no hay una relación directa entre la mayoría de las variables (Fig. 10), el análisis de componentes principales revela grupos de variables y organismos que podrían tener relevancia en el contexto ecológico del VCC (Figuras 12 y 13).

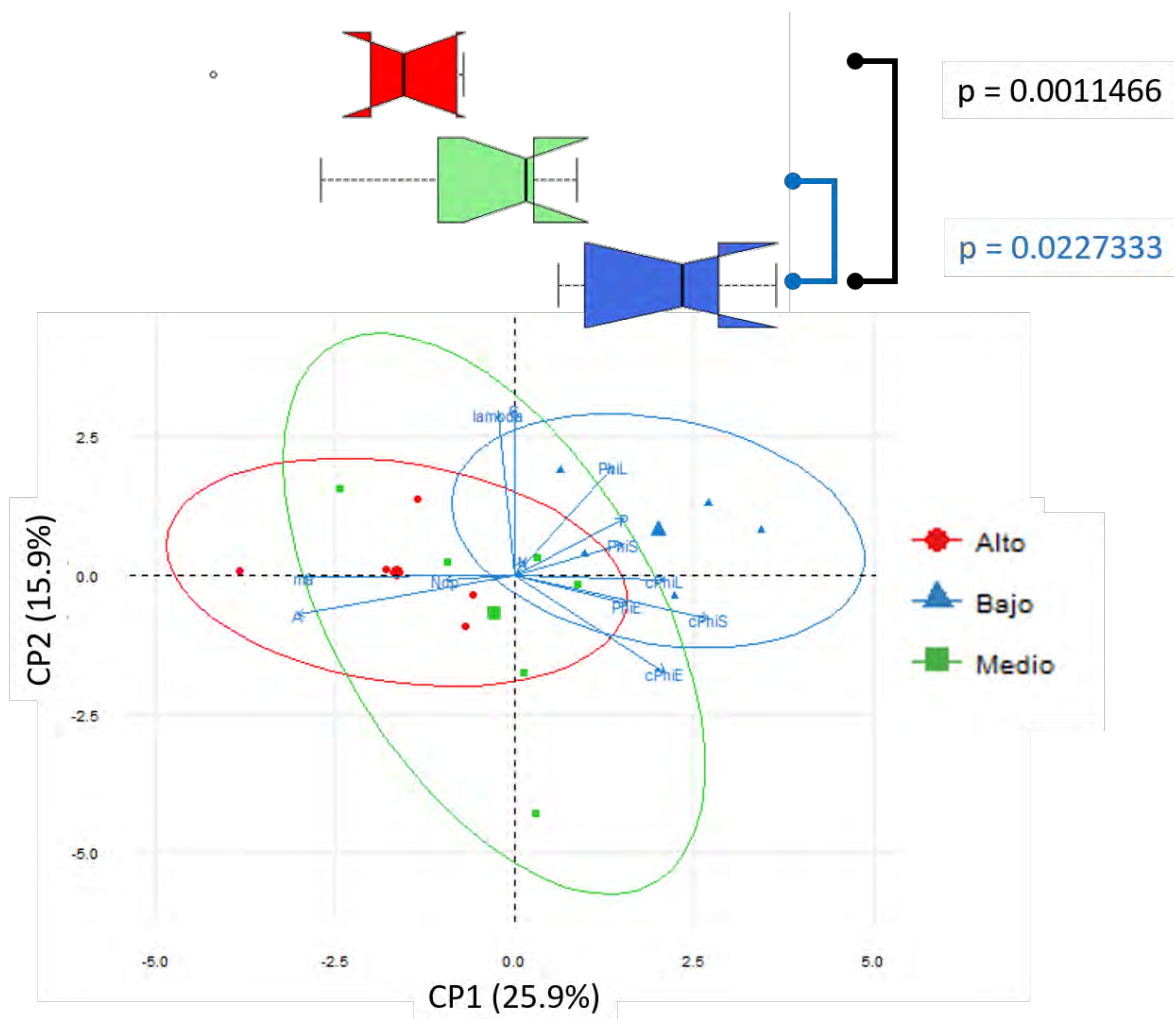


Figura 13. Relación entre la densidad celular máxima y los valores de las variables en estudio. Observamos que se forman tres grupos, y que las cepas con densidad celular alta se distinguen de los otros dos, no así las cepas con densidad media y baja. Se realizó una prueba Tukey HSD (*Honest Significant Differences*), y se muestran los valores p de aquellas diferencias significativas.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

Fisiología del crecimiento bacteriano.

Aunque la era de las tecnologías *ómicas* ha favorecido el avance en todas las áreas de la biología, aún existen importantes retos en el campo de la ecología microbiana. Por ejemplo, no sabemos cuál es la mejor referencia para definir una especie bacteriana, o si es necesario otro paradigma de clasificación biológica (Cohan, 2002; Konstantinidis *et al.*, 2006; Medini *et al.*, 2005). Por otro lado, es importante describir y entender los procesos evolutivos y las funciones ecológicas que realizan las comunidades microbianas en su ambiente (Konopka, 2009; Widder *et al.*, 2016), utilizando cepas y técnicas controladas lo más parecidas a lo que podríamos encontrar en la naturaleza, en lugar de cepas adaptadas al laboratorio durante mucho tiempo. Es por ello que decidimos utilizar cultivos de cepas que no se han adaptado al laboratorio (no se han transferido múltiples veces en medios de cultivo comunes), usando un medio de cultivo hecho con agua extraída *in situ*, del ambiente en que fueron aisladas las cepas. Estas técnicas, aunque no son replicables (por el medio de cultivo tan específico), han demostrado ser útiles para estudiar las características de las poblaciones naturales microbianas (Kaeberlein *et al.*, 2002; Stewart, 2012; Zengler *et al.*, 2002).

El valle de Cuatro Ciénegas es un ecosistema idóneo para aprender sobre la ecología microbiana. Es un ecosistema desértico y oligotrófico extremo (Souza *et al.*, 2006; Elser *et al.*, 2005; Peimbert *et al.*, 2012), en el que las bacterias han adoptado estrategias ecológicas inusuales que les permiten sobrevivir en estas condiciones (Alcaraz *et al.*, 2008). Para entender mejor la ecología bacteriana del VCC se han utilizado técnicas modernas, como análisis estequiométricos, genómicos, metagenómicos, y de modelamiento matemático

(Bonilla-Rosso *et al.*, 2012; Alcaraz *et al.*, 2008, 2010; Aguirre-von-Wobeser *et al.*, 2015; Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2013; Valdivia-Anistro *et al.*, 2015). Sin embargo, aún quedan muchas preguntas sobre un aspecto fundamental en la ecología microbiana: la tasa de expansión poblacional, que está muy relacionada con la abundancia y variación genética que tiene una población en un ecosistema determinado, pues el número de individuos es un componente importante que influye en los procesos evolutivos.

En el presente trabajo se cultivaron diversas cepas de *Bacillus* para determinar los parámetros de crecimiento de las mismas, para conocer si las condiciones particulares del VCC se ven reflejadas de alguna manera en dichos parámetros. También indagamos en la descripción cuantitativa y cualitativa de la síntesis proteica en las distintas fases del crecimiento de nuestras cepas, pues como se mencionó antes, Cuatro Ciénegas tiene una concentración muy baja de fósforo, lo que se ha descrito como un factor determinante en la eficiencia de la síntesis de proteínas en bacterias (Gourse *et al.*, 1996; Weider *et al.*, 2005; Tourova, n.d.; Loladze and Elser, 2011; Souza *et al.*, 2008; Elser *et al.*, 2008). Con el uso de estas técnicas simples buscamos ampliar el conocimiento que se ha generado sobre las poblaciones microbianas del VCC. Ya hace varias décadas Jaques Monod mencionó que el cultivo de microorganismos no es un tema especializado o una rama de la investigación, sino “es el método principal de la microbiología” (Monod, 1949).

Las curvas de crecimiento generadas revelaron que existe una amplia variación en los valores de los parámetros de crecimiento (ver Fig. 6 y Tabla 2). Por ejemplo, hay cepas que entran a la fase de crecimiento exponencial en menos de media hora (por ejemplo la cepa 152A_5R de la especie *Bacillus aquamaris*, o la cepa 107_3D de *Bacillus marisflavi*), mientras que otras

tardan casi tres horas (cepa 144b_4T *Bacillus pumilis*, o m3-18 *Bacillus sp.* m2-34), lo que representa una diferencia de hasta seis veces en el parámetro λ , que mide la duración de la fase de adaptación. Aun cuando existe esta gran variedad en los parámetros obtenidos, los valores que determinamos se encuentran dentro de intervalos reportados anteriormente en el género *Bacillus* (ver Tabla 3), además de ser valores muy cercanos a los valores reportados para bacterias aisladas de ambientes marinos muy similares al del VCC (Lauro *et al.*, 2009). También se encontró que la mayoría de las cepas incrementa su síntesis de proteínas en la fase exponencial de crecimiento, lo cual sugiere que es en esta fase donde los bacilos de Cuatro Ciénegas invierten una mayor cantidad de energía metabólica (ver Fig. 9 y Tabla 6).

El análisis conjunto de las variables reportadas aquí y en Valdivia-Anistro *et al.*, 2015 mostró que aunque parece no haber una asociación estadística entre los valores de las variables, existen ciertas correlaciones significativas (ver Fig. 11). Por ejemplo, encontramos que el conjunto de variables e individuos (cepas) se asocia en dos grupos definidos por el ambiente en que se aisló cada cepa: agua o sedimento, y en tres si agrupamos las cepas por la densidad celular máxima alcanzada (ver Figs. 12 y 13).

La asociación encontrada entre el nicho de procedencia y el valor de las variables tiene una relevancia importante para el conocimiento que se tiene sobre la ecología de bacterias de Cuatro Ciénegas, pues en un trabajo anterior, utilizando métodos diferentes, se encontró esta misma asociación en otro grupo de bacterias nativa del valle (Rebollar *et al.*, 2012). En cuanto a grupos de bacterias *Bacillus* con densidades máximas altas, bajas o medias, podría ser este un mecanismo en para evitar la competencia con otros linajes bacterianos con distinta

densidad poblacional, pues se ha demostrado que existen múltiples interacciones antagónicas en bacterias que habitan dentro del VCC (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2013).

Comentario final.

En conjunto, los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que el nicho de procedencia de las cepas es un determinante para los valores de las variables que calculamos, pues éstas se agrupan en dos conjuntos de acuerdo a si la cepa fue aislada en agua o en sedimento. También mostramos que la densidad celular máxima que alcanzan los cultivos está agrupada en tres conjuntos, que se distinguen entre sí, por lo que podría ser la densidad celular una adaptación para sobrevivir en el VCC. El conocimiento generado en Cuatro Ciénegas podría ser la descripción de algunos procesos generales de ecología microbiana en ambientes acuáticos oligotróficos. Hacen falta muchos otros estudios para entender mejor las causas y consecuencias de las complejas interacciones ecológicas microbianas (Figura 14).

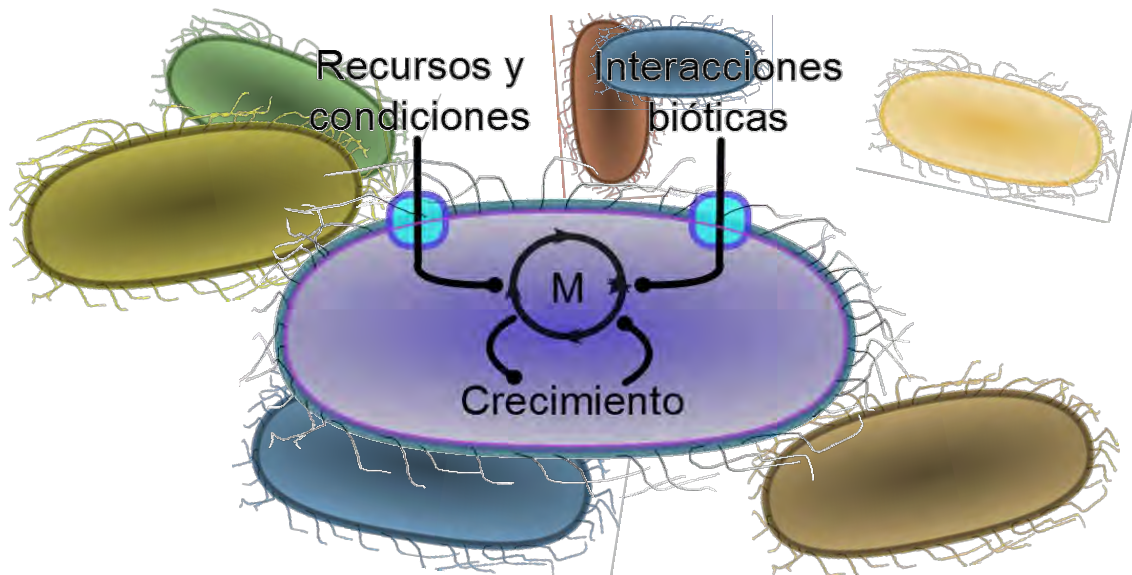


Figura 14. Esquema simplificado de las interacciones ecológicas microbianas. Las comunidades bacterianas mantienen un monitoreo constante de su medio, así como una comunicación compleja con otros organismos. Las expansiones o reducciones poblacionales se ven afectadas por estos factores, con la consecuencia última de moldear la trayectoria evolutiva de estos organismos.

ADDENDUM.

Un ambiente extremo en extremo peligro: "A [reiterated] plea for conservancy".

El valle de Cuatro Ciénegas se encuentra en grave peligro. Durante más de un siglo se ha extraído agua de sus manantiales sin un control adecuado, además de que en recientes décadas se han saqueado ejemplares de especies endémicas y han sido introducidas especies invasoras, todo lo cual ha dañado irreversiblemente el equilibrio ecológico de este ecosistema (Minckley, 1969, 1992; Contreras Balderas, 1984; Souza *et al.*, 2006; Betancourt, 2016). El valle de Cuatro Ciénegas ha sobrevivido millones de años a las grandes transformaciones de la vida en la tierra, pero parece no resistir el ritmo furtivo de explotación de sus riquezas por el hombre (Figura 15). Ojalá el conocimiento generado por décadas de investigación en el VCC ayude a concientizar sobre su relevancia ecológica y se refleje en acciones concretas y definitivas de conservación, hasta entonces, como dijo W.L. Minckley, seguiremos en una súplica por la conservación del área.

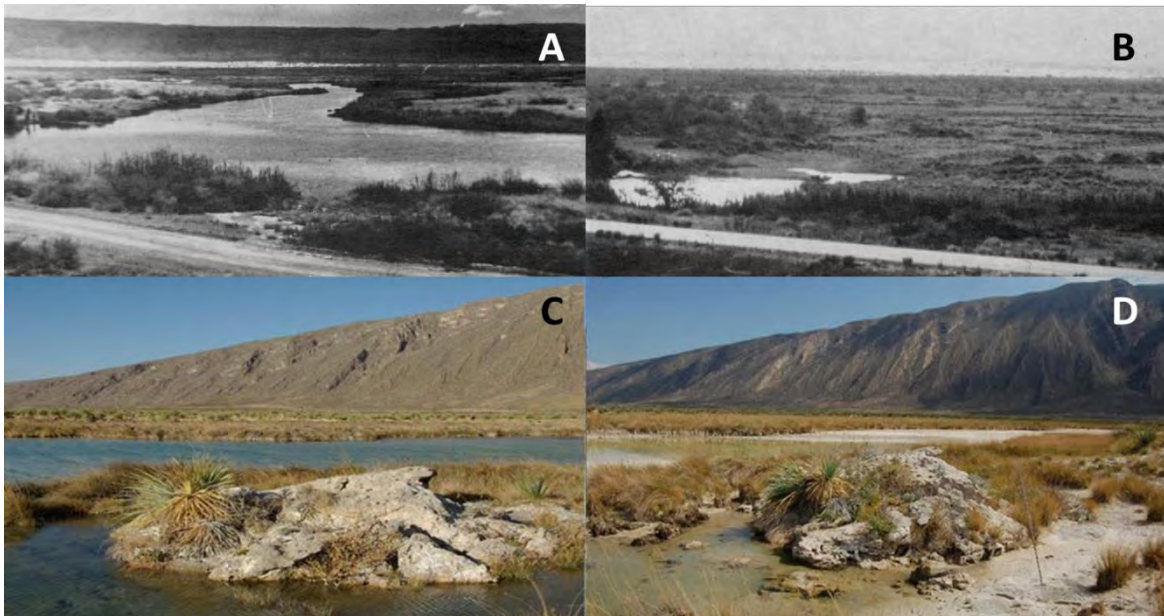


Figura 15. Evidencias del deterioro ecológico del valle de Cuatro Ciénegas. Las fotos en (A) y (B) se tomaron en 1960 y 1988 respectivamente, y muestran el impacto que tuvo la extracción intensiva de agua en las pozas de La Becerra durante ese periodo. En (C) y (D) se nota una reducción drástica del nivel de agua en el sistema Churince, durante 2011. Imágenes en (A) y (B) tomadas de Minckley 1992, y en (C) y (D) del blog de Souza 2011.

REFERENCIAS.

- Aguirre-von-Wobeser, E., Eguiarte, L. E., Souza, V. and Soberón-Chávez, G. (2015). Theoretical analysis of the cost of antagonistic activity for aquatic bacteria in oligotrophic environments. *Frontiers in microbiology*, 6, Frontiers, p.490. [Online]. Available at: doi:10.3389/fmicb.2015.00490 [Accessed: 13 July 2015].
- Alcaraz, L. D., Moreno-Hagelsieb, G., Eguiarte, L. E., Souza, V., Herrera-Estrella, L. and Olmedo, G. (2010). Understanding the evolutionary relationships and major traits of *Bacillus* through comparative genomics. *BMC genomics*, 11, p.332. [Online]. Available at: doi:10.1186/1471-2164-11-332 [Accessed: 31 August 2015].
- Alcaraz, L. D., Olmedo, G., Bonilla, G., Cerritos, R., Hernández, G., Cruz, A., Ramírez, E., Putonti, C., Jiménez, B., Martínez, E., López, V., Arvizu, J. L., Ayala, F., Razo, F., Caballero, J., Siefert, J., Eguiarte, L., Vielle, J.-P., Martínez, O., Souza, V., Herrera-Estrella, A. and Herrera-Estrella, L. (2008). The genome of *Bacillus coahuilensis* reveals adaptations essential for survival in the relic of an ancient marine environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 (15), p.5803–5808. [Online]. Available at: doi:10.1073/pnas.0800981105 [Accessed: 31 August 2015].
- Betancourt, N. (2016). Exigen frenar el tráfico de especies endémicas de Cuatro Ciénegas. *VanguardiaMX*. [Online]. Available at: <http://www.vanguardia.com.mx/articulo/exigen-frenar-el-trafico-de-especies-endemicas-de-cuatro-cienegas>.
- Biesta-Peters, E. G., Reij, M. W., Joosten, H., Gorris, L. G. M. and Zwietering, M. H. (2010). Comparison of two optical-density-based methods and a plate count method for estimation of growth parameters of *Bacillus cereus*. *Applied and environmental microbiology*, 76 (5), p.1399–1405. [Online]. Available at: doi:10.1128/AEM.02336-09 [Accessed: 31 August 2015].
- Bonilla-Rosso, G., Peimbert, M., Alcaraz, L. D., Hernández, I., Eguiarte, L. E., Olmedo-Alvarez, G. and Souza, V. (2012). Comparative metagenomics of two microbial mats at Cuatro Ciénegas Basin II: community structure and composition in oligotrophic environments. *Astrobiology*, 12 (7), Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle,

NY 10801 USA, p.659–673. [Online]. Available at: doi:10.1089/ast.2011.0724 [Accessed: 20 April 2016].

Bosdriesz, E., Molenaar, D., Teusink, B. and Bruggeman, F. J. (2015). How fast-growing bacteria robustly tune their ribosome concentration to approximate growth-rate maximization. *The FEBS journal*, 282 (10), p.2029–2044. [Online]. Available at: doi:10.1111/febs.13258 [Accessed: 21 August 2015].

Bulthuis, B. A., Koningstein, G. M., Stouthamer, A. H. and van Verseveld, H. W. (1993). The relation of proton motive force, adenylate energy charge and phosphorylation potential to the specific growth rate and efficiency of energy transduction in *Bacillus licheniformis* under aerobic growth conditions. *Antonie van Leeuwenhoek*, 63 (1), p.1–16. [Online]. Available at: doi:10.1007/BF00871725 [Accessed: 17 April 2016].

Cavicchioli, R., Ostrowski, M., Fegatella, F., Goodchild, A. and Guixa-Boixereu, N. (2003). Life under nutrient limitation in oligotrophic marine environments: an eco/physiological perspective of *Sphingopyxis alaskensis* (formerly *Sphingomonas alaskensis*). *Microbial ecology*, 45 (3), p.203–217. [Online]. Available at: doi:10.1007/s00248-002-3008-6 [Accessed: 20 April 2016].

Cohan, F. M. (2002). What are bacterial species? *Annual review of microbiology*, 56, Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, p.457–487. [Online]. Available at: doi:10.1146/annurev.micro.56.012302.160634 [Accessed: 21 April 2016].

Contreras Balderas, S. (1984). Environmental Impacts in Cuatro Ciénegas, Coahuila, Mexico: A Commentary. *Journal of the Arizona-Nevada Academy of Science*, 19 (1), p.85–88.

Dalgaard, P. and Koutsoumanis, K. (2001). Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models. *Journal of Microbiological Methods*, 43 (3), p.183–196. [Online]. Available at: doi:10.1016/S0167-7012(00)00219-0 [Accessed: 23 April 2015].

Dalgaard, P., Ross, T., Kamperman, L., Neumeyer, K. and McMeekin, T. A. (1994). Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data. *International Journal of Food Microbiology*, 23 (3-4), p.391–404. [Online]. Available at: doi:10.1016/0168-1605(94)90165-1 [Accessed: 2 July 2015].

Development, H. (n.d.). *CurveExpert Professional 2.0 | CurveExpert and GraphExpert Software*. [Online]. Available at: <https://www.curveexpert.net/curveexpert-professional-2-0/> [Accessed: 16 April 2016].

Elser, J. J., Schampel, J. H., Garcia-Pichel, F., Wade, B. D., Souza, V., Eguiarte, L., Escalante, A. and Farmer, J. D. (2005). Effects of phosphorus enrichment and grazing snails on modern stromatolitic microbial communities. *Freshwater Biology*, 50 (11), p.1808–1825. [Online]. Available at: doi:10.1111/j.1365-2427.2005.01451.x [Accessed: 19 April 2016].

Elser, J. J., Sterner, R. W., Gorokhova, E., Fagan, W. F., Markow, T. A., Cotner, J. B., Harrison, J. F., Hobbie, S. E., Odell, G. M. and Weider, L. W. (2008). Biological stoichiometry from genes to ecosystems. *Ecology Letters*, 3 (6), p.540–550. [Online]. Available at: doi:10.1111/j.1461-0248.2000.00185.x [Accessed: 2 October 2015].

Gourse, R. L., Gaal, T., Bartlett, M. S., Appleman, J. A. and Ross, W. (1996). rRNA transcription and growth rate-dependent regulation of ribosome synthesis in *Escherichia coli*. *Annual review of microbiology*, 50, p.645–677. [Online]. Available at: doi:10.1146/annurev.micro.50.1.645 [Accessed: 31 August 2015].

Hagen, S. J. (2010). Exponential growth of bacteria: Constant multiplication through division. *American Journal of Physics*, 78 (12), American Association of Physics Teachers, p.1290. [Online]. Available at: doi:10.1119/1.3483278 [Accessed: 31 August 2015].

Hall, B. G. (2013). Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Molecular biology and evolution*, 30 (5), p.1229–1235. [Online]. Available at: doi:10.1093/molbev/mst012 [Accessed: 26 February 2016].

Hazan, R., Que, Y.-A., Maura, D. and Rahme, L. G. (2012). A method for high throughput determination of viable bacteria cell counts in 96-well plates. *BMC microbiology*, 12 (1), BioMed Central, p.259. [Online]. Available at: doi:10.1186/1471-2180-12-259 [Accessed: 17 April 2016].

Ishihama, A. (1997). Adaptation of gene expression in stationary phase bacteria. *Current Opinion in Genetics & Development*, 7 (5), p.582–588. [Online]. Available at: doi:10.1016/S0959-437X(97)80003-2 [Accessed: 16 April 2016].

JH, M. (1972). *Determination of viable cell counts: bacterial growth curves*. Cold Spring. New York. [Online]. Available at: <http://www.jourlib.org/references/10343937> [Accessed: 17 April 2016].

Jolliffe, I. T. and Cadima, J. (2016). Principal component analysis: a review and recent developments. *Phil. Trans. R. Soc. A*. [Online]. Available at: [doi:10.1098/rsta.2015.0202](https://doi.org/10.1098/rsta.2015.0202).

Kaeberlein, T., Lewis, K. and Epstein, S. S. (2002). Isolating 'uncultivable' microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science (New York, N.Y.)*, 296 (5570), American Association for the Advancement of Science, p.1127–1129. [Online]. Available at: [doi:10.1126/science.1070633](https://doi.org/10.1126/science.1070633) [Accessed: 27 November 2015].

Kahm, M., Hasenbrink, G., Lichtenberg-Fraté, H., Ludwig, J. and Kschischo, M. (2010). grofit : Fitting Biological Growth Curves with R. *Journal of Statistical Software*, 33 (7), p.1–21. [Online]. Available at: [doi:10.18637/jss.v033.i07](https://doi.org/10.18637/jss.v033.i07) [Accessed: 17 February 2016].

Klumpp, S. and Hwa, T. (2014). Bacterial growth: global effects on gene expression, growth feedback and proteome partition. *Current opinion in biotechnology*, 28, p.96–102. [Online]. Available at: [doi:10.1016/j.copbio.2014.01.001](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.01.001) [Accessed: 12 May 2015].

Konopka, A. (2009). What is microbial community ecology? *The ISME journal*, 3 (11), International Society for Microbial Ecology, p.1223–1230. [Online]. Available at: [doi:10.1038/ismej.2009.88](https://doi.org/10.1038/ismej.2009.88) [Accessed: 27 September 2014].

Konstantinidis, K. T., Ramette, A. and Tiedje, J. M. (2006). The bacterial species definition in the genomic era. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 361 (1475), p.1929–1940. [Online]. Available at: [doi:10.1098/rstb.2006.1920](https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1920) [Accessed: 29 February 2016].

Kuhn, H. J., Cometta, S. and Fiechter, A. (1980). Effects of growth temperature on maximal specific growth rate, yield, maintenance, and death rate in glucose-limited continuous culture of the thermophilic *Bacillus caldotenax*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 10 (4), p.303–315. [Online]. Available at: [doi:10.1007/BF00498727](https://doi.org/10.1007/BF00498727) [Accessed: 17 April 2016].

Lauro, F. M., McDougald, D., Thomas, T., Williams, T. J., Egan, S., Rice, S., DeMaere, M. Z., Ting, L., Ertan, H., Johnson, J., Ferriera, S., Lapidus, A., Anderson, I., Kyrpides, N., Munk, A. C., Detter, C., Han, C. S., Brown, M. V., Robb, F. T., Kjelleberg, S. and Cavicchioli, R. (2009). The genomic basis of trophic strategy in marine bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106 (37), p.15527–15533. [Online]. Available at: doi:10.1073/pnas.0903507106 [Accessed: 5 August 2015].

Loferer-Krössbacher, M., Klima, J. and Psenner, R. (1998). Determination of bacterial cell dry mass by transmission electron microscopy and densitometric image analysis. *Applied and environmental microbiology*, 64 (2), p.688–694. [Online]. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=106103&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed: 17 April 2016].

Loladze, I. and Elser, J. J. (2011). The origins of the Redfield nitrogen-to-phosphorus ratio are in a homeostatic protein-to-rRNA ratio. *Ecology letters*, 14 (3), p.244–250. [Online]. Available at: doi:10.1111/j.1461-0248.2010.01577.x [Accessed: 4 December 2015].

Matsumoto, Y., Murakami, Y., Tsuru, S., Ying, B.-W. and Yomo, T. (2013). Growth rate-coordinated transcriptome reorganization in bacteria. *BMC genomics*, 14 (1), p.808. [Online]. Available at: doi:10.1186/1471-2164-14-808 [Accessed: 18 August 2015].

Medini, D., Donati, C., Tettelin, H., Massignani, V. and Rappuoli, R. (2005). The microbial pan-genome. *Current opinion in genetics & development*, 15 (6), p.589–594. [Online]. Available at: doi:10.1016/j.gde.2005.09.006 [Accessed: 17 March 2016].

Meyer, E. R. (1973). Late Quaternary paleoecology of the Cuatro Ciénegas basin, Coahuila, Mexico. *Ecology*, 54, p.982–985.

Minckley, W. L. (1969). *Environments of the Bolsón de Cuatro Ciénegas, Coahuila, México*. El Paso: Texas Western Press.

Minckley, W. L. (1992). Three Decades near Cuatro Ciénegas, México: Photographic Documentation and a Plea for Area Conservation. *Journal of the Arizona-Nevada Academy of Science*, 26 (2), p.89–118.

Molenaar, D., van Berlo, R., de Ridder, D. and Teusink, B. (2009). Shifts in growth strategies reflect tradeoffs in cellular economics. *Molecular systems biology*, 5 (1), EMBO Press, p.323. [Online]. Available at: doi:10.1038/msb.2009.82 [Accessed: 27 August 2015].

Monod, J. (1949). The Growth of Bacterial Cultures. *Annual Review of Microbiology*, 3 (1), Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, p.371–394. [Online]. Available at: doi:10.1146/annurev.mi.03.100149.002103 [Accessed: 16 November 2014].

Moreno-Letelier, A., Olmedo-Alvarez, G., Eguiarte, L. E. and Souza, V. (2012). Divergence and phylogeny of Firmicutes from the Cuatro Ciénegas Basin, Mexico: a window to an ancient ocean. *Astrobiology*, 12 (7), p.674–684. [Online]. Available at: doi:10.1089/ast.2011.0685 [Accessed: 27 August 2015].

Navarro Llorens, J. M., Tormo, A. and Martínez-García, E. (2010). Stationary phase in gram-negative bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 34 (4), p.476–495. [Online]. Available at: doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00213.x [Accessed: 7 April 2015].

Ng, T. M., Viard, E., Caipo, M. L., Duffy, S. and Schaffner, D. W. (2002). Expansion and Validation of a Predictive Model for the Growth of *Bacillus Stearothermophilus* in Military Rations. *Journal of Food Science*, 67 (5), p.1872–1878. [Online]. Available at: doi:10.1111/j.1365-2621.2002.tb08739.x [Accessed: 17 April 2016].

Overkamp, W., Ercan, O., Herber, M., van Maris, A. J. A., Kleerebezem, M. and Kuipers, O. P. (2015). Physiological and cell morphology adaptation of *Bacillus subtilis* at near-zero specific growth rates: a transcriptome analysis. *Environmental microbiology*, 17 (2), p.346–363. [Online]. Available at: doi:10.1111/1462-2920.12676 [Accessed: 30 August 2015].

Peimbert, M., Alcaraz, L. D., Bonilla-Rosso, G., Olmedo-Alvarez, G., García-Oliva, F., Segovia, L., Eguiarte, L. E. and Souza, V. (2012). Comparative metagenomics of two microbial mats at Cuatro Ciénegas Basin I: ancient lessons on how to cope with an environment under severe nutrient stress. *Astrobiology*, 12 (7), Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA, p.648–658. [Online]. Available at: doi:10.1089/ast.2011.0694 [Accessed: 20 April 2016].

Peng, W.-P., Yang, Y.-C., Kang, M.-W., Lee, Y. T. and Chang, H.-C. (2004). Measuring masses of single bacterial whole cells with a quadrupole ion trap. *Journal of the American Chemical Society*, 126 (38), American Chemical Society, p.11766–11767. [Online]. Available at: doi:10.1021/ja046754l [Accessed: 17 April 2016].

Pérez-Gutiérrez, R.-A., López-Ramírez, V., Islas, Á., Alcaraz, L. D., Hernández-González, I., Olivera, B. C. L., Santillán, M., Eguiarte, L. E., Souza, V., Travisano, M. and Olmedo-Alvarez, G. (2013). Antagonism influences assembly of a Bacillus guild in a local community and is depicted as a food-chain network. *The ISME journal*, 7 (3), p.487–497. [Online]. Available at: doi:10.1038/ismej.2012.119 [Accessed: 31 August 2015].

Perni, S., Andrew, P. W. and Shama, G. (2005a). Estimating the maximum growth rate from microbial growth curves: Definition is everything. *Food Microbiology*, 22 (6), p.491–495. [Online]. Available at: doi:10.1016/j.fm.2004.11.014 [Accessed: 2 June 2015].

Perni, S., Andrew, P. W. and Shama, G. (2005b). Estimating the maximum growth rate from microbial growth curves: definition is everything. *Food Microbiology*, 22 (6), p.491–495. [Online]. Available at: doi:10.1016/j.fm.2004.11.014 [Accessed: 2 June 2015].

Piir, K., Paier, A., Liiv, A., Tenson, T. and Maiväli, U. (2011). Ribosome degradation in growing bacteria. *EMBO reports*, 12 (5), p.458–462. [Online]. Available at: doi:10.1038/embor.2011.47 [Accessed: 31 August 2015].

Pla, M.-L., Oltra, S., Esteban, M.-D., Andreu, S. and Palop, A. (2015). Comparison of Primary Models to Predict Microbial Growth by the Plate Count and Absorbance Methods. *BioMed research international*, 2015, p.365025. [Online]. Available at: doi:10.1155/2015/365025 [Accessed: 21 March 2016].

Ratkowsky, D. A., Olley, J. and Ross, T. (2005). Unifying temperature effects on the growth rate of bacteria and the stability of globular proteins. *Journal of Theoretical Biology*, 233 (3), p.351–362. [Online]. Available at: doi:10.1016/j.jtbi.2004.10.016 [Accessed: 1 April 2015].

Rebollar, E. A. (2012). *Exiguobacterium como modelo para entender la relación del ambiente con los procesos evolutivos en bacterias en el valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila*. Universidad Nacional Autónoma de México.

Rebollar, E. A., Avitia, M., Eguiarte, L. E., González-González, A., Mora, L., Bonilla-Rosso, G. and Souza, V. (2012). Water-sediment niche differentiation in ancient marine lineages of *Exiguobacterium* endemic to the Cuatro Ciénegas Basin. *Environmental microbiology*, 14 (9), p.2323–2333. [Online]. Available at: doi:10.1111/j.1462-2920.2012.02784.x [Accessed: 2 September 2015].

Rolfe, M. D., Rice, C. J., Lucchini, S., Pin, C., Thompson, A., Cameron, A. D. S., Alston, M., Stringer, M. F., Betts, R. P., Baranyi, J., Peck, M. W. and Hinton, J. C. D. (2012). Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation. *Journal of bacteriology*, 194 (3), p.686–701. [Online]. Available at: doi:10.1128/JB.06112-11 [Accessed: 23 August 2015].

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P. and Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, 9 (7), Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved., p.676–682. [Online]. Available at: doi:10.1038/nmeth.2019 [Accessed: 9 July 2014].

Scott, M. and Hwa, T. (2011). Bacterial growth laws and their applications. *Current opinion in biotechnology*, 22 (4), p.559–565. [Online]. Available at: doi:10.1016/j.copbio.2011.04.014 [Accessed: 23 July 2015].

Scott, M., Klumpp, S., Mateescu, E. M. and Hwa, T. (2014). Emergence of robust growth laws from optimal regulation of ribosome synthesis. *Molecular systems biology*, 10 (8), EMBO Press, p.747. [Online]. Available at: doi:10.15252/msb.20145379 [Accessed: 23 July 2015].

Souza, V., Eguiarte, L. E., Siefert, J. and Elser, J. J. (2008). Microbial endemism: does phosphorus limitation enhance speciation? *Nature reviews. Microbiology*, 6 (7), p.559–564. [Online]. Available at: doi:10.1038/nrmicro1917 [Accessed: 2 September 2015].

Souza, V., Espinosa-Asuar, L., Escalante, A. E., Eguiarte, L. E., Farmer, J., Forney, L., Lloret, L., Rodríguez-Martínez, J. M., Soberón, X., Dirzo, R. and Elser, J. J. (2006). An endangered oasis of aquatic microbial biodiversity in the Chihuahuan desert. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America, 103 (17), p.6565–6570. [Online]. Available at: doi:10.1073/pnas.0601434103 [Accessed: 13 August 2015].

Souza, V., Siefert, J. L., Escalante, A. E., Elser, J. J. and Eguiarte, L. E. (2012). The Cuatro Ciénegas Basin in Coahuila, Mexico: An Astrobiological Precambrian Park. *Astrobiology*, 12 (7), p.641–647. [Online]. Available at: doi:10.1089/ast.2011.0675 [Accessed: 19 April 2016].

Stein, B. A., Kutner, L. S. and Adams, J. S. (2000). *Precious Heritage: The Status of Biodiversity in the United States*. Oxford: Oxford Univeristy Press.

Stewart, E. J. (2012). Growing unculturable bacteria. *Journal of bacteriology*, 194 (16), p.4151–4160. [Online]. Available at: doi:10.1128/JB.00345-12 [Accessed: 14 July 2014].

Sung, H. M. and Yasbin, R. E. (2000). Transient growth requirement in *Bacillus subtilis* following the cessation of exponential growth. *Applied and environmental microbiology*, 66 (3), p.1220–1222. [Online]. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=91968&tool=pmcentrez&render type=abstract> [Accessed: 31 August 2015].

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, 28 (10), p.2731–2739. [Online]. Available at: doi:10.1093/molbev/msr121 [Accessed: 9 July 2014].

Team, R. C. (n.d.). *R: The R Project for Statistical Computing*. [Online]. Available at: <https://www.r-project.org/> [Accessed: 16 April 2016].

Tourova, T. P. (n.d.). Copy Number of Ribosomal Operons in Prokaryotes and Its Effect on Phylogenetic Analyses. *Microbiology*, 72 (4), Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers, p.389–402. [Online]. Available at: doi:10.1023/A:1025045919260 [Accessed: 30 August 2015].

Valdivia-Anistro, J. A., Eguiarte-Frutos, L. E., Delgado-Sapién, G., Márquez-Zacarías, P., Gasca-Pineda, J., Learned, J., Elser, J. J., Olmedo-Alvarez, G. and Souza, V. (2015). Variability of rRNA Operon Copy Number and Growth Rate Dynamics of *Bacillus* Isolated from an

Extremely Oligotrophic Aquatic Ecosystem. *Frontiers in microbiology*, 6, Frontiers, p.1486. [Online]. Available at: doi:10.3389/fmicb.2015.01486 [Accessed: 15 April 2016].

Valero, M., Fernández, P. . and Salmerón, M. . (2003). Influence of pH and temperature on growth of *Bacillus cereus* in vegetable substrates. *International Journal of Food Microbiology*, 82 (1), p.71–79. [Online]. Available at: doi:10.1016/S0168-1605(02)00265-9 [Accessed: 17 April 2016].

Weider, L. J., Elser, J. J., Crease, T. J., Mateos, M., Cotner, J. B. and Markow, T. A. (2005). THE FUNCTIONAL SIGNIFICANCE OF RIBOSOMAL (r)DNA VARIATION: Impacts on the Evolutionary Ecology of Organisms. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 36 (1), Annual Reviews, p.219–242. [Online]. Available at: doi:10.1146/annurev.ecolsys.36.102003.152620 [Accessed: 7 July 2015].

Widder, S., Allen, R. J., Pfeiffer, T., Curtis, T. P., Wiuf, C., Sloan, W. T., Cordero, O. X., Brown, S. P., Momeni, B., Shou, W., Kettle, H., Flint, H. J., Haas, A. F., Laroche, B., Kreft, J.-U., Rainey, P. B., Freilich, S., Schuster, S., Milferstedt, K., van der Meer, J. R., Großkopf, T., Huisman, J., Free, A., Picioreanu, C., Quince, C., Klapper, I., Labarthe, S., Smets, B. F., Wang, H. and Soyer, O. S. (2016). Challenges in microbial ecology: building predictive understanding of community function and dynamics. *The ISME Journal*. [Online]. Available at: doi:10.1038/ismej.2016.45 [Accessed: 30 March 2016].

Yano, K., Wada, T., Suzuki, S., Tagami, K., Matsumoto, T., Shiwa, Y., Ishige, T., Kawaguchi, Y., Masuda, K., Akanuma, G., Nanamiya, H., Niki, H., Yoshikawa, H. and Kawamura, F. (2013). Multiple rRNA operons are essential for efficient cell growth and sporulation as well as outgrowth in *Bacillus subtilis*. *Microbiology (Reading, England)*, 159 (Pt 11), p.2225–2236. [Online]. Available at: doi:10.1099/mic.0.067025-0 [Accessed: 31 August 2015].

Yates, G. T. and Smotzer, T. (2007). On the lag phase and initial decline of microbial growth curves. *Journal of Theoretical Biology*, 244 (3), p.511–517. [Online]. Available at: doi:10.1016/j.jtbi.2006.08.017 [Accessed: 2 July 2015].

Zengler, K., Toledo, G., Rappe, M., Elkins, J., Mathur, E. J., Short, J. M. and Keller, M. (2002). Cultivating the uncultured. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*

States of America, 99 (24), p.15681–15686. [Online]. Available at:
doi:10.1073/pnas.252630999 [Accessed: 1 March 2016].

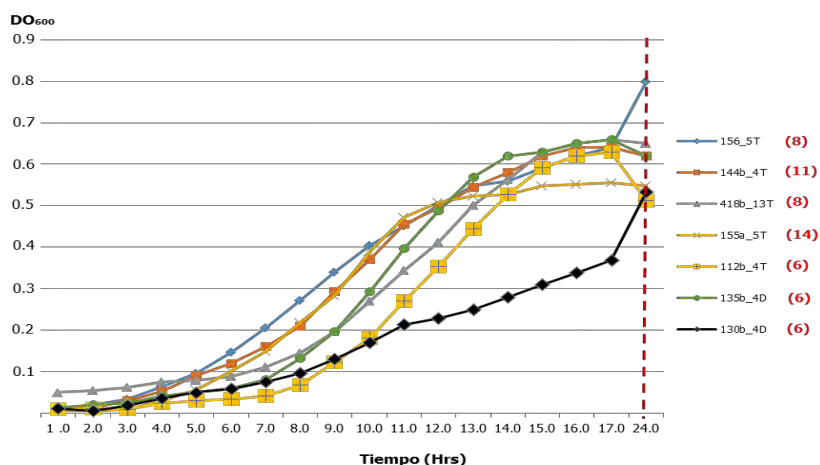
Zubkov, M. V., Fuchs, B. M., Eilers, H., Burkill, P. H. and Amann, R. (1999). Determination of Total Protein Content of Bacterial Cells by SYPRO Staining and Flow Cytometry. *Appl. Envir. Microbiol.*, 65 (7), p.3251–3257. [Online]. Available at:
<http://aem.asm.org/content/65/7/3251.full> [Accessed: 17 April 2016].

Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M. and van 't Riet, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and environmental microbiology*, 56 (6), p.1875–1881. [Online]. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=184525&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed: 4 August 2015].

Zwietering, M. H., Rombouts, F. M. and van 't Riet, K. (1992). Comparison of definitions of the lag phase and the exponential phase in bacterial growth. *The Journal of applied bacteriology*, 72 (2), p.139–145. [Online]. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1556037> [Accessed: 16 April 2016].

Apéndice I.

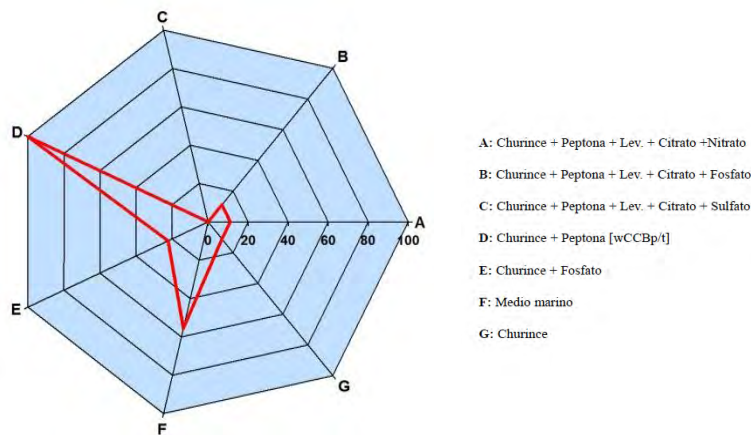
a) Determinación de las condiciones de cultivo de las cepas utilizadas.



Cultivos de *Bacillus* en Medio Marino mantienen una densidad baja y toman mucho tiempo en alcanzar la fase estacionaria. Se muestran diferentes cepas y con distintos números de operones ribosomales (Figura cortesía de Jorge Valdivia).

b) Comparación del Medio Marino con otras combinaciones de nutrientes.

La concentración de fosfatos, nitratos, y sulfatos utilizada en las distintas combinaciones fue la misma que hay en el Medio marino (Difco™ Marine Broth, BD and Company). Cada tratamiento se hizo por duplicado (para una cepa escogida al azar) y el crecimiento final a 12 horas (medido en unidades de DO₆₀₀) se normalizó con el crecimiento máximo, que fue el alcanzado por el agua estéril de Churince + 5g/L de peptona (Bacto™ Tryptone, BD and Company).



Apéndice II.

Artículo.

“Variabilidad del número de copias del operón rRNA y de la dinámica de las tasas de crecimiento de *Bacillus* aislados de un ambiente acuático oligotrófico extremo”

Valdivia-Anistro, J. A., Eguiarte-Frutos, L. E., Delgado-Sapién, G., Márquez-Zacarías, P., Gasca-Pineda, J., Learned, J., Elser, J. J., Olmedo-Alvarez, G. and Souza, V. (2015). Variability of rRNA Operon Copy Number and Growth Rate Dynamics of *Bacillus* Isolated from an Extremely Oligotrophic Aquatic Ecosystem. *Frontiers in microbiology*, 6, Frontiers, p.1486. [Online]. Available at: doi:10.3389/fmicb.2015.01486

Resumen.

El operon de genes ribosomales (RRN) es un grupo clave de genes relacionados con la producción de la maquinaria de síntesis de proteínas, y por lo tanto con la fisiología del crecimiento microbiano. Evidencia experimental sugiere una intrínseca relación entre el número de copias de este operon y la disponibilidad de recursos ambientales, especialmente de fósforo, porque usualmente las bacterias que viven en ecosistemas oligotróficos tienen menos operones RRN y una tasa de crecimiento lenta. El valle de Cuatro Ciénegas (VCC) es un complejo ecosistema acuático que contiene una inusualmente alta diversidad microbiana que es capaz de persistir bajo condiciones de extrema oligotrofia. Estas condiciones ambientales suponen una variedad de fuertes presiones selectivas que moldean la dinámica genómica de sus habitantes. El género *Bacillus* es uno de los grupos cultivables más abundantes en el VCC y usualmente posee un número alto de copias de RRN (6-15 copias). El propósito principal de este estudio fue analizar la variación en el número de copias del

RRN en *Bacillus* del VCC y determinar sus propiedades relacionadas al crecimiento, así como su balance estequiométrico (contenido de nitrógeno y fósforo). Definimos 18 grupos filogenéticos dentro del clado de bacilos y documentamos un intervalo entre 6 y 14 copias del RRN. La dinámica de crecimiento de estos bacilos fue heterogénea y no mostró una relación directa con el número de copias del operón. Fisiológicamente, nuestros resultados no fueron consistentes con la hipótesis de la tasa de crecimiento, pues el número de copias del RNN estuvo desacoplada con la tasa de crecimiento. Sin embargo, creemos que la diversidad en las propiedades de crecimiento de estos bacilos, así como el bajo contenido de fósforo en sus células en un amplio intervalo de copias del RNN son una respuesta adaptativa a la oligotrofia que hay en el VCC y esto podría representar un mecanismo ecológico que permite a estos taxones coexistir. Estos hallazgos aumentan el conocimiento en la variabilidad del número de copias del RRN en el género *Bacillus* y dan pistas sobre la fisiología de este grupo bajo condiciones de extrema oligotrofia.



Variability of rRNA Operon Copy Number and Growth Rate Dynamics of *Bacillus* Isolated from an Extremely Oligotrophic Aquatic Ecosystem

Jorge A. Valdivia-Anistro¹, Luis E. Eguarte-Frums¹, Gabriela Delgado-Sapien², Pedro Márquez-Zacarias³, Jaime Gasca-Pineda¹, Jennifer Learned⁴, James J. Elser⁵, Gabriela Olmedo-Alvarez⁶ and Valeria Souza^{1*}

¹Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyacán, México; ²Laboratorio de Genética Bacteriana, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyacán, México; ³School of Biology, Georgia Institute of Technology, Atlanta, GA, USA; ⁴School of Life Sciences, Arizona State University, Tempe, AZ, USA; ⁵Laboratorio de Bacteriología Molecular, Departamento de Ingeniería Genética, CINVESTAV Unidad Irapuato, Irapuato, México

OPEN ACCESS

Edited by:

Power H. Hahnspichler,
California Institute of Technology, USA

Reviewed by:

Sukanya K. Kulkarni,
Michigan University, USA
Alexei L. Kuznetsov,
Stanford University, USA

*Correspondence:

Valeria Souza
vsouza@unam.mx

Specialty section:

This article was submitted to
Microbial Physiology and Metabolism,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 16 September 2015

Accepted: 09 December 2015

Published: 26 January 2016

Citation:

Valdivia-Anistro JA, Eguarte-Frums LE, Delgado-Sapien G, Márquez-Zacarias J, Gasca-Pineda J, Learned J, Elser JJ, Olmedo-Alvarez G and Souza V (2016) Variability of rRNA Operon Copy Number and Growth Rate Dynamics of *Bacillus* Isolated from an Extremely Oligotrophic Aquatic Ecosystem. *Front. Microbiol.* 6:1403. doi: 10.3389/fmicb.2015.01403

The ribosomal RNA (*rna*) operon is a key suite of genes related to the production of protein synthesis machinery and thus to bacterial growth physiology. Experimental evidence has suggested an intrinsic relationship between the number of copies of this operon and environmental resource availability, especially the availability of phosphorus (P), because bacteria that live in oligotrophic ecosystems usually have few *rna* operons and a slow growth rate. The Cuatro Ciénegas Basin (CCB) is a complex aquatic ecosystem that contains an unusually high microbial diversity that is able to persist under highly oligotrophic conditions. These environmental conditions impose a variety of strong selective pressures that shape the genome dynamics of their inhabitants. The genus *Bacillus* is one of the most abundant cultivable bacterial groups in the CCB and usually possesses a relatively large number of *rna* operon copies (6–15 copies). The main goal of this study was to analyze the variation in the number of *rna* operon copies of *Bacillus* in the CCB and to assess their growth-related properties as well as their stoichiometric balance (N and P content). We defined 10 phylogenetic groups within the *Bacilli* clade and documented a range of from six to 14 copies of the *rna* operon. The growth dynamic of these *Bacilli* was heterogeneous and did not show a direct relation to the number of operon copies. Physiologically, our results were not consistent with the Growth Rate Hypothesis, since the copies of the *rna* operon were decoupled from growth rate. However, we speculate that the diversity of the growth properties of these *Bacilli* as well as the low P content of their cells in an ample range of *rna* copy number is an adaptive response to oligotrophy of the CCB and could represent an ecological mechanism that allows these taxa to coexist. These findings increase the knowledge of the variability in the number of copies of the *rna* operon in the genus *Bacillus* and give insights about the physiology of this bacterial group under extreme oligotrophic conditions.

Keywords: rRNA operon copies, oligotrophy, bacterial growth, *Bacillus*, Cuatro Ciénegas

INTRODUCTION

Population genetics is the most direct tool for use in understanding adaptation to the ecological challenges imposed upon microbial communities by the environment (Whitaker et al., 2003; Xu, 2006; Spencer et al., 2008). Functional traits can aid in the study of population genetics, because they help to define species in terms of their ecological roles, such as how they use environmental resources or how they interact with other species (McGill et al., 2006; Tongbea et al., 2006). These functional traits are often considered to be ecological strategies because they are useful in understanding why certain bacteria live in a particular environment and how they respond to environmental challenges (Green et al., 2008).

The ribosomal RNA operon (*rrn* hereafter) is the key genetic structure for protein synthesis and thus a functional trait related to bacterial life history (Stevenson and Schmidt, 2004). Ecologically, the *rrn* operon has been related with the bacterial capacity to respond to changes in environmental conditions (Codon et al., 1999; Prüb et al., 1999; Green et al., 2008). In particular, the variation in the number of copies of the *rrn* operon has been considered an ecological strategy related to resource availability, with physiological implications associated with bacterial growth rate and fitness (Klappenbach et al., 2000; Shrestha et al., 2007). The *rrn* operon is comprised of three genes (5S, 16S, and 23S rDNA) and its copy number varies from 1 to 15 among bacterial genomes (Klappenbach et al., 2001; Acinas et al., 2004; Stoddard et al., 2015) and even more dramatically among eukaryotes (Elser et al., 2000). Experimentally, it has been shown that deletions of one or more copies of the *rrn* operon have a considerable impact on growth rate, affecting various stress response mechanisms (Nanamiya et al., 2010; Yano et al., 2013). Hence, it has been suggested that the multiplicity of the *rrn* operon is a potential mechanism for adaptation to different environmental conditions (Elser et al., 2000; Green et al., 2008). In general terms, bacteria that possess more *rrn* operon copies may cope better with fluctuating nutrient inputs than bacteria with fewer *rrn* operon copies, which tend to live in environments where nutrients are scarce (Klappenbach et al., 2001; Elser, 2003; Jaysingh and Weider, 2007). Moreover, the relationship between *rrn* operon copy number and the bacterial biotic potential for the cellular allocation of key resources could be analogous to the ecological strategies described in other macrobiota (*r*- and *K*-strategies) (Pianka, 1970; Elser et al., 2000; Dehlfelsen and Schmidt, 2007; Shrestha et al., 2007; Lipowsky et al., 2012).

Bacillus is a genus that is well-known because of its ecological versatility (Feldgarden et al., 2003). The fact that it can sporulate increases its long-range dispersal and allows it to explore diverse environments (Nanamiya et al., 2010; Yano et al., 2013). Coincidentally, *Bacilli* have a relatively high number of *rrn* operon copies per genome, ranging from six to 15 (*rrn*OR, Stoddard et al., 2015), a degree of variation that may aid in this lifestyle strategy of colonizing new environments and provide great adaptability in response to stress, as well as being able to uptake a wide variety of resources (Feldgarden et al., 2003; Comor et al., 2010). If the new environment is rich in phosphorus (P), high *rrn* operon

copy number may be favored because the rich P supply could then support the rapid production of P-rich *rrn* to meet the protein demands of rapid growth, as stated by the "Growth Rate Hypothesis" (GRH), a core idea within the theory of biological stoichiometry (Elser et al., 2000; Elser, 2006). However, in environments with low phosphorus availability, multiple *rrn* operon copies could represent a competitive cost if a high *rrn* operon copy number leads to the over production of P-rich *rrn* (Sterner and Elser, 2007; Marín, 2005; Jaysingh and Weider, 2007). Indeed, aquatic bacteria isolated from oligotrophic environments usually have low *rrn* operon copy numbers (Beeatella et al., 1998; Streif et al., 1999; Lamro et al., 2009), as well as various other adaptations to decrease cellular phosphorus demand (Cavicchioli et al., 2003; Alcaraz et al., 2008; Martiny et al., 2009; Van Mooy et al., 2009). Thus, it has been proposed that there is a connection between the number of *rrn* operon copies and environmental P availability (Elser et al., 2000; Weider et al., 2005; Jaysingh and Weider, 2007). However, to our knowledge, we lack extensive studies that document this variation in *rrn* operon copy number and other associated ecological strategies employed by bacteria coexisting in oligotrophic environments, especially those characterized by severe P limitation.

The aims of this study were to describe *rrn* operon copy number variation in different lineages of *Bacillus* strains isolated from an extremely oligotrophic ecosystem and to analyze the possible association between the copy number and its physiological implications for growth rate and chemical composition (P content and N:P stoichiometry). Severe P limitation is considered a primary selective pressure that drives bacterial evolution in this environment (Souza et al., 2008, 2012). For example, we have previously reported on an endemic and moderately halophilic *Bacillus* (type strain of *B. coahuilensis*: m4-4 = NRRL B-41737^T), (Cerritos et al., 2008) that has a typical number of *rrn* copies (nine) but also clear adaptations to the extreme oligotrophic conditions, including a small genome (3.5 Mb), a diversity of phosphate acquisition genes (Moreno-Letelier et al., 2011), and a cellular membrane composed of sulfolipids (Alcaraz et al., 2008). Similar adaptations to low P levels have been reported only from oligotrophic marine cyanobacteria with low *rrn* copy numbers (Cavicchioli et al., 2005; Lauro et al., 2009; Martiny et al., 2009; Van Mooy et al., 2009). Hence, the present study represents the first attempt to link biological stoichiometry to *Bacillus* diversity and *rrn* operon copy number, as well as the first report in which the numbers of *rrn* copies are analyzed in several members of this genus that coexist in the same habitats.

MATERIALS AND METHODS

Site Description and Selection of *Bacillus* Strains

The Cuatro Ciénegas Basin (CCB hereafter) is a hydrologic system in the Chihuahuan Desert in northeastern México (Souza et al., 2006), (Figure 1A, yellow triangle). This basin represents an oasis with a high microbial diversity in extremely oligotrophic

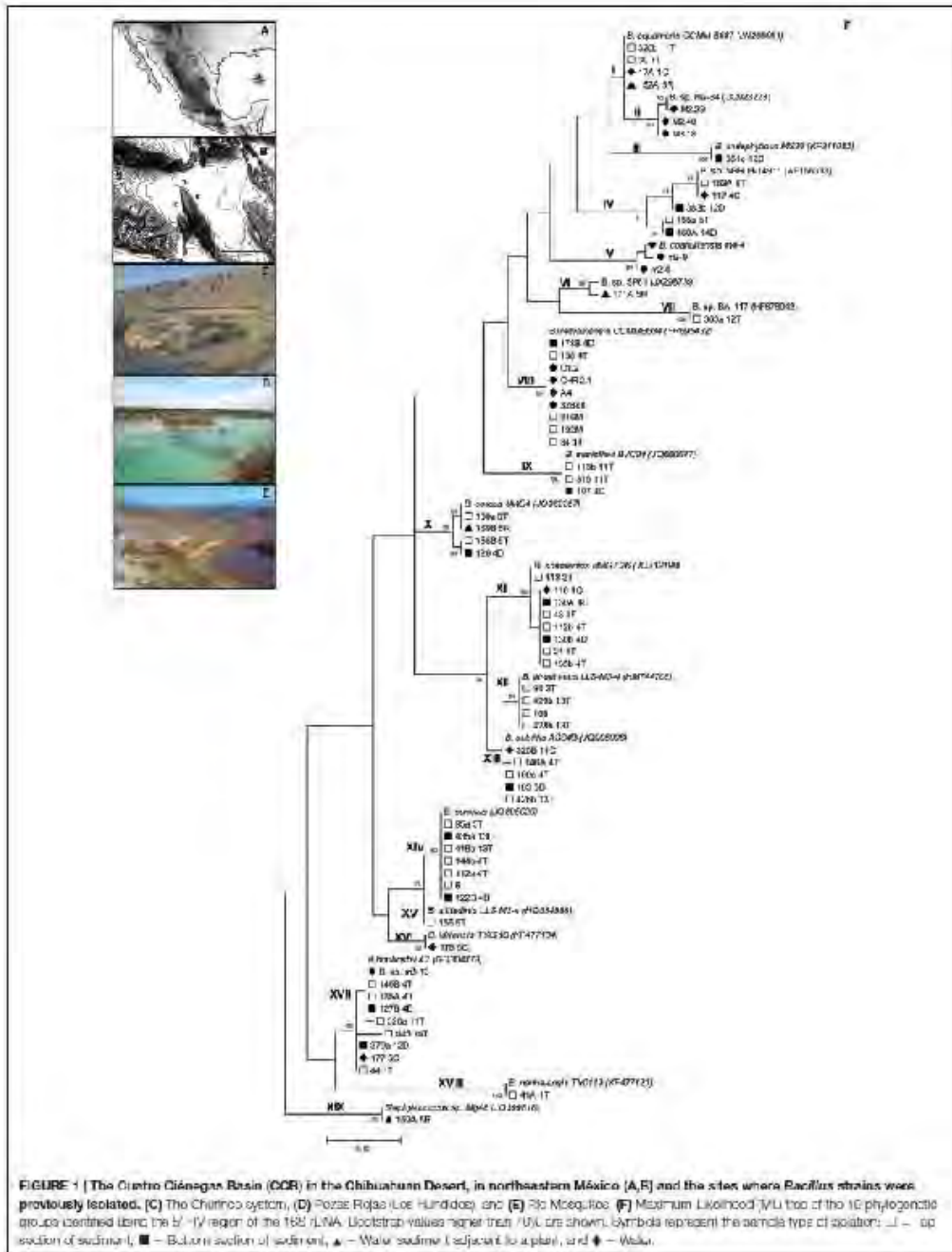


FIGURE 4 | (A) The Cuatro Ciénegas Basin (CCB) in the Chihuahuan Desert, in northeastern México. [A,E] and the sites where *Bacillus thuringiensis* was previously isolated. (C) The Charinos system, (D) Pozas Rojas (Los Hundidos) and (E) Pozo Micoquilo. (F) Maximum Likelihood (ML) tree of the 16S phylogenetic groups identified using the b¹-V region of the 16S rDNA. Bootstrap values higher than 70% are shown. Symbols represent the source type of isolates: □ – top soil (isolates of sediments), ■ – Bottom soil (isolates of sediments), ▲ – Water samples (adjacent to a play), and ◆ – Water.

conditions ($<1 \mu\text{mol PO}_4^{3-}$; Pálmber et al., 2012; Souza et al., 2012). Interestingly, ca. 50% of the bacterial communities in the CCB are most closely related to marine relatives (Souza et al., 2006). Isolates related to the genus *Bacillus* were identified from samples collected at various sites in the CCB during 15 years of field work (Souza et al., 2006; Alvarez et al., 2009, 2010; Carreres et al., 2010; Pérez-Gutiérrez et al., 2015), (Figure 1B).

Our isolates are from three primary sampling sites within the basin: (i) the Churruce site consists of a freshwater spring that connects to an intermediate shallow pond via a small stream and eventually terminates in a shallow desiccated lagoon (Figure 1C); (ii) the Río Mesquites is a stable system composed of a river and some lateral desiccated ponds (Figure 1D) with low nutrient concentrations and highly imbalanced C:N:P ratios [C:N:P, 900:150:1 (molar); Souza et al., 2012]; and (iii) the Pozas Rojas site (Figure 1E) is located in a system called Los Húmedos and consists of a shallow lake and nine to 12 small semi-permanent ponds with strongly fluctuating conditions (high salinity and temperature in summer, both decrease in winter).

The *Bacillus* strains isolated from the CCB are part of a larger collection (several thousands of isolates) of microbes that is maintained at the Molecular Evolution and Experimental Laboratory at the Instituto de Ecología, UNAM (Valeria Souza) and at the Molecular Bacteriology Laboratory in the CINVESTAV, Irapuato (Gabriela Olmedo); cultures are available upon request. We selected 71 of these isolates and classified them according to the site of isolation and sample type (plant root, sediment, or water). Sixty seven *Bacillus* isolates were sampled from Churruce, one was from Río Mesquites and three were from Pozas Rojas.

Phylogenetic Analysis

To obtain biomass for DNA extraction, *Bacillus* isolates were grown in the standard medium used for their isolation in the field (Marine agar, DiCo™ 2216). Genomic DNA extractions were performed using the QIAamp® DNA Mini Kit (USA), according to the manufacturer's instructions. The 5' hypervariable (HV) region of the 16S rDNA was amplified (275 bp; 70–344 position), following Goto et al., (2009). This region has a high level of conservation and is useful for the clustering of *Bacillus* species. The polymerase chain reaction (PCR) products were confirmed via 1.5% agarose gel electrophoresis. The sequencing of the HV region was performed by the High Throughput Genomics Center (htSEQ), University of Washington (USA), and compared with the GenBank database using BLAST (NCBI). Sequences were aligned using CLUSTAL W (Thompson et al., 2002), and a maximum-likelihood tree was constructed using MEGA5, with a bootstrap of 1000 replicates (Tamura et al., 2011). The sequences of the 5' HV region of the 16S rDNA were submitted to GenBank with the following accession numbers: KT781592–KT781661.

I-CeuI Cleavage Map of the *Bacillus* Strains

The I-CeuI (CeuI hereafter) restriction endonuclease recognizes a 26-bp sequence from position 1911–1936 of the 23S rRNA gene in *rrn* operons, with the number of CeuI (New England Biolabs)

fragments usually representing the number of *rrn* operons. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was used to construct the *rrn* profile of the chromosome from the *Bacillus* isolates. Bacterial genomic DNA from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2 cleaved with CeuI and the 0.1–200 kb Sigma Plus Marker were used as molecular weight markers. Because the size of *S. enterica* Typhimurium LT2 identifying fragments had been determined previously (Lin et al., 1993), their inclusion improved the precision of the band-size estimation.

Preparation and Digestion of Genomic DNA in Agarose Blocks

Bacillus isolates were cultured aerobically in DiCo™ Marine Broth 2216 (BD & Co.) and incubated overnight at 35°C. The genomic DNA of each strain was prepared in agarose blocks using a previously described method, with some modifications (Nekrasov et al., 2000; Delgado et al., 2013). Two processes of incubation in proteinase K solution (12 h at 37°C) were carried out to increase the purity of the DNA. Agarose blocks were pre-incubated in 1X NEBuffer 4 (New England Biolabs) for 30 min at 4°C. Finally, the digestion of the genomic DNA was achieved with 100 μl fresh 1X NEBuffer 4 containing 15 U of I-CeuI restriction enzyme, and it was incubated overnight at 37°C.

Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) and DNA Fragments Transfer

The CeuI fragments were separated by a CHEF DR II electrophoresis system (Bio-Rad). Electrophoresis was performed on a 1% agarose (Seakem Gold agarose, BioWhittaker Molecular Applications) gel and 0.5X TBE buffer (Bio-Rad) at 11°C. The electrophoresis conditions were divided into two stages to separate the DNA fragments of various sizes: First stage, pulse time ramped from 6.75 s to 2 min for 20 h at 4 V cm^{-1} and in a second stage, pulse time ramped from 0.22 to 5.10 s for 15 h at 6 V cm^{-1} .

The agarose gels were radiated with UV light for 1 min in a UV Crosslinker (UVP) to fix the DNA. The gels were washed in 250 mM HCl solution for 15 min with moderate shaking. Next, the gels were washed in denaturing buffer (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) for 2 h and later washed in a neutralization buffer (0.5 M Tris/HCl, 1.5 M NaCl, pH 8.0) for 2 h. The DNA fragments were then transferred onto N4-nylon membrane (Amersham Biosciences) via Southern blotting as described previously (Sambrook et al., 1989). Finally, the membrane was radiated with UV light to fix the DNA (1 min, UV Crosslinker, UVP).

Preparation of DNA Probes and Hybridization

The *rrn* profiles of *Bacillus* isolates were validated by probing the Southern blotting membranes with PCR products of the 16S and 23S *rrn* operon from the *Bacillus horikoshii* ATCC 700161 strain. The primer sets used to amplify the *rrs* gene were designed using the 5' HV region (described above), and an internal region of the *rrl* gene was designed from the 2283 to 2696 position (23S₄) of the *rrn*. Then, the 23S₄ region (413 bp) was amplified using the

forward primer F23S₃ 5'-ACG GAG GCG CCC AAA GGT T-3' and the reverse primer R23S₃ 5'-CCA GCG GTG CGT CCA TCC-3'. The primer set used to amplify the 23S₃ was designed based on previously sequenced genomes using the Primer Select program of the DNASTAR Lasergene 7 package (DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA).

The PCR amplification conditions were as follows: 95°C for 5 min for the initial denaturation, 30 cycles of denaturation at 95°C for 40 s, annealing at 60°C for 40 s, an extension of 1 min at 72°C, and a final extension of 5 min at 72°C (Gene Amp, PCR System 9700). The presence and size of PCR products were subsequently confirmed via 1.5% agarose gel electrophoresis. The PCR products were purified with the PCR Clean-up Gel Extraction Kit (Macherey–Nagel products) and then DIG-labeled using the random primer method of the DIG High Prime DNA Labeling system (Roche). The membrane was incubated in 10 ml hybridization solution (DIG Easy Hyb buffer). Incubation was carried out at 58°C with constant, gentle shaking for 1 h. The labeled probe was then added to fresh hybridization solution and hybridization was carried out overnight at 58°C with constant and gentle shaking. The membrane was exposed to X ray film after being washed at high stringency (64°C).

Growth Parameter Estimations

Genotypes of *Bacillus* with different numbers of copies of the *rrn* operon were chosen from among the groups described in the phylogenetic analysis. Prior to growth parameter estimation, all the strains were pre-cultured in fresh marine broth for 24 h to homogenize their metabolic condition. All cultures were incubated at 35°C, the maximum water temperature during summer at the CCB (Pérez-Gutiérrez et al., 2015), with shaking at 150 rpm. Additionally, experiments were carried out for nutritional conditions similar to CCB; for this, we inoculated the strains into sterile water collected from the Clarence field site but supplemented with tryptone (5 g per liter Bacto™ Tryptone, BD and Company; hereafter, CCBwt) and incubated for 12 h (overnight), (Supplementary Figure S1A).

The growth parameters were then determined using the previously described overnight culture. Three new 40 ml flask of fresh CCBwt medium were inoculated to reach an optical density of 0.05 (600 nm wavelength, BioPhotometer Plus, Eppendorf), which corresponded to $\sim 10^7$ colony-forming units (CFU) ml⁻¹. CFU counts were made taking at least seven samples distributed through a period of 12 h to cover all the phases of the growth curve; the samples were diluted appropriately in 0.85% NaCl to perform a plate count analysis.

We estimated the lag phase period (λ ; units: hours), the tangential growth rate (G_{max} ; units: cells/h), and maximal biomass reached [A ; units: $\ln(\text{CFU}/\text{CFU}_{(t-\lambda)})$] from our data using a non linear regression (CurveExpert Professional 2.0.3 software) to fit a Gompertz equation according to Zwietering et al. (1990), (Supplementary Figure S1B). We obtained the final parameters from the predicted curve, defining G_{max} as the tangent of the inflection point of the curve, λ as the X intercept of the tangential line through the inflection point (where the X-axis is time), and A as the Y-value of the asymptote [where the Y-axis is $\ln(\text{CFU}/\text{CFU}_{(t-\lambda)})$] for plate-count assays. In addition,

we estimated the maximum specific growth rate (μ_{max} ; units: hours⁻¹) as follows:

$$\mu_{max} = \ln(N_e - N_0)/(t_e - t_0)$$

and the bacterial doubling (generation) time as follows:

$$t_d = \ln 2/\mu_{max}$$

N_0 and N_e are the cell densities reached at the beginning and at the end of the exponential phase, respectively, while t_0 and t_e are the times (h) at which the exponential phase started and ended, respectively.

Cell Contents of Carbon (C), Nitrogen (N), and Phosphorus (P) During the Exponential Phase

The samples of bacterial biomass were harvested in the exponential phase during the determination of growth dynamics. Biomass samples were spin in a centrifuge for the removal of the growth medium. To avoid the influence of remains of the growth medium in the elemental composition analysis, the biomass samples were washed three times with 250 μ l water (Milli-Q)[®] and after of each washing, supernatant was removed by centrifuge. Finally, the biomass samples were vacuum dried to be shipped frozen to Arizona State University for analysis.

At ASU total phosphorus content was measured using a modified ascorbic acid method with persulfate digestion (APHA, 2005). The dried biomass samples were weighed and treated with a potassium persulfate and sulfuric acid solution and then autoclaved for 30 min at 121°C and 15–20 psi. The samples were allowed to cool and then neutralized before the addition of the color reagent. After 30 min, the absorbance was read on a spectrophotometer at 880 nm. The samples were analyzed with a triplicate standard curve and triplicate NIST reference material.

The total carbon and nitrogen content was measured via combustion in a Perkin Elmer model 2400 elemental analyzer. The samples were combusted at 1760°C. Elemental detection was conducted via a thermal conductivity detector.

The C, N, and P data were expressed as percentages of dry mass and referred to as "C content," "N content," and "P content," respectively (Supplementary Table S2).

Statistical Analysis

All statistical analyses, including the estimation of Pearson correlation coefficients (r) and principal component analysis (PCA) were performed with the R Statistic program: Version 3.5.1 (24-07-10).

RESULTS

Identification and Clustering of *Bacillus* Isolates from the CCB

The 71 isolates used for this study were clustered into 19 phylogenetic groups, forming a large "marine" cluster (30 isolates, i.e., formed by strains with marine affinities). Most of the lineages

include representatives from a variety of habitats (e.g., soil, water, sediment); however, some "marine" groups included strains only sampled from water, while the *B. atrophaceus* lineage was only found in the top layers of sediment. Strains related to *B. pumilus* were also only found in sediment (Figure 1F).

The "marine" cluster is composed of nine phylogenetic groups (arbitrarily numbered I to IX) composed of *Bacillus* strains isolated mostly from CCB aquatic samples, such as *B. sp.* m2-34 (group I) and *B. coahuilensis* (group V). In addition, three CCB phylogenetic groups of *Bacillus* were related to type strains isolated from water: *B. endophyticus* (group III), related to a pollutant-degrading strain isolated from industrial effluent, as well as *B. sp.* NRRLB-14911 (group IV) and *B. mariflavi* (group IX), both isolated from seawater. The *B. aquamaris* (group I), *B. sp.* SP61 (group VI), and *B. vietnamiensis* (group VIII) groups are related to strains isolated from hypersaline environments (salters and a microbial mat). Finally, group VII is related to a strain isolated from a biofilm of a lake (*B. sp.* BA-117). The small *B. cereus* cluster is related to type strains isolated from marine sediments (group X). The *B. subtilis* cluster (group XII), was similar to soil type *Bacillus*. Group XI is most closely related to *B. sonorensis* isolated from the soil of the Sonoran desert. Organisms in group XIII are related to a *B. atrophaceus* strain isolated from soil and water samples, and group XIII is related to a *B. subtilis* strain from marine samples, although this is a well-known cosmopolitan species. Strains related to a *B. albidinis* strain (group XV), were present in soil and water

samples; *B. latreutis* isolates (group XVI), were related to strains from soil samples with halotolerance. Finally, the *B. borekianus* cluster (group XVII) has as a representative a strain isolated from a fish pond as well as a lineage related to a halotolerant *B. nanhaiensis* (group XVIII), isolated from a non-saline soil sample. Unexpectedly, the 169A SR isolate was closely related to the strain *Staphylococcus sp.* Mg48 (JQ399818), isolated from a saline lake (group XIX), but it is not unusual to isolate a *Staphylococcus* strain when aiming to select *Bacillus*.

Phylogenetic Variability of the *rrn* Operon Copy Number

The *rrn* operon copy number was determined for every isolate described above in the maximum likelihood tree via PFGE and hybridization analyses (Figure 2 and Supplementary Figure S2). To obtain a benchmark for the *rrn* copy number in the *Bacillus* diversity from the CCB, we analyzed the type strain of *B. coahuilensis* (m4-4 = NRRL B-41757) that was isolated from the Chaurice site (Cerritos et al., 2008) and that has already been sequenced (Alcaraz et al., 2008). After genomic digestion and hybridization analysis, eight *rrn* operons were quantified (Figure 2 and Supplementary Figure S2; group V). The 70 strains of *Bacillus* from the CCB showed a range of between six and 14 *rrn* operon copies (Figure 2 and Supplementary Figure S2); some groups showed intraspecific variation from one to four copies. Interestingly, we quantified only six copies of this operon in some phylogenetic groups, such

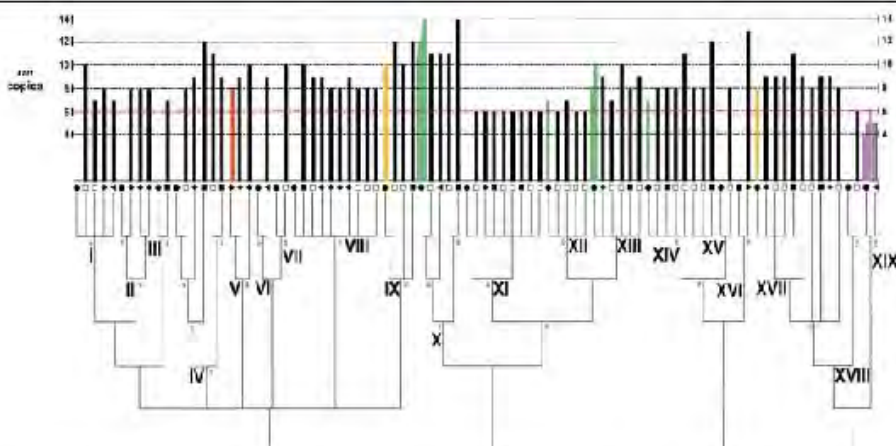


FIGURE 2 | Variability of the *rrn* operon copy number in the *Bacillus* diversity from the CCB. ML tree of the 16S rDNA region of the 16S rDNA, with a 50% of confidence. The tree is divided into 19 groups of *Bacillus* for every phylogenetic group. The separate lineages and the individual symbols represent the environment, as described in Figure 1. The dotted rod represents the low number of the *rrn* operon in *Bacillus* according to the rDNA. The black bars represent the number of operon copies in the isolates from the CCB, and the green bars represent the number of copies in *Bacillus* species reported in the rDNA. Gray bars represent the number of copies in the isolates related to the genus *Staphylococcus*. The light purple bars represent the number of operon copies in different *Staphylococcus* species analyzed by the rDNA. The orange bar represents the number of copies quantified in the type strain of *B. coahuilensis* (m4-4 = NRRL B-41757). Group V. The yellow bars represent the number of copies in the type strains of *B. mariflavi* (JCM 11144 = KCM4176) and *B. borekianus* (ATCC 700161), groups IX and XVII, respectively.

as *B. sonnensensis* (XI), *B. atrophaeus* (XII), and *B. nanhaiensis* (XVIII); the lowest number of copies quantified in other strains of the genus (*rrnDB*, Stoddard et al., 2015). The highest number of copies was observed in the *B. cereus* group (X) (14 copies).

To further increase knowledge about the number of copies of the *rrn* operon in the genus *Bacillus*, we analyzed two type strains similar to those observed in the CCB, *B. marisflavi* (JCM 11544 = KCCM 41588), and *B. horikoshii* (ATTC 700161). The genomes of these species have not yet been sequenced and the number of copies of this functional gene is unknown. The *B. marisflavi* and *B. horikoshii* type strains showed ten and eight copies of the *rrn*, respectively (Figure 2 and Supplementary Figure S2, groups IX and XVII). Thus, the number of copies quantified in these *Bacillus* type species was similar to the number described in the strains isolated from the CCB (Figure 2).

Homogeneity in *rrn* operon copy number was observed in the *B. sp.* m2-34 (II; eight copies) and *B. sonnensensis* (XI; six copies) groups. However, considerable heterogeneity and intraspecific variation were observed in several other groups: *B. aquamaris* (I; seven to nine copies), *B. sp.* NRRLB-14911 (IV; eight, nine, eleven and twelve copies), *B. vietnamiensis* (VIII; eight to ten copies), *B. subtilis* (XIII; seven to eleven copies), *B. pumilus* (XIV; eight, eleven, and twelve copies) and *B. horikoshii* (XVII; eight, nine and eleven copies). In addition, the phylogenetic groups composed of only one isolate showed different numbers of *rrn* operon copies: *B. endophyticus* (III; seven copies), *B. sp.* SP61 (V; ten copies), *B. sp.* BA-119 (VII; nine copies), *B. altitudinis* (XV; eight copies), *B. idriensis* (XVI; 13 copies) and *B. nanhaiensis* (XVIII; six copies, Figure 2). The *Staphylococcus* isolate had five copies of the *rrn*.

Growth Parameters

Growth parameters were estimated for a subsample of 15 *Bacillus* isolates from the CCB representative of the phylogenetic diversity present and the range of *rrn* operon copy numbers observed. We also characterized the isolate related to the *Staphylococcus* genus (Table 1). Not surprisingly, given the large diversity in this genus within the CCB, the results show a high heterogeneity in the growth parameters estimated. In agreement with these results, the lag phase period of these *Bacilli* is variable and it is not related with their growth rate (μ_{max} ; Supplementary Figure S3A). In addition, the maximum biomass reached was correlated with the maximum specific growth rate (μ_{max} ; Supplementary Figure S3B).

Interestingly, an exploratory analysis showed no overall correlation between the number of copies of the *rrn* operon and the growth parameters estimated (Supplementary Table S1). However, an arbitrary categorization of this copy number (where "low" was from five to seven copies, "mid" was from eight to ten copies and "high" was from 11 to 14 copies) showed that the isolates with the fewest copies had lower levels of dispersion in their growth parameters (Figure 3). Principal component analysis (PCA) was performed to describe the influence of the various growth parameters in these categories: in the isolates from the CCB (Figure 3). It seems that 42.71% of the variance was explained by Component 1, which was defined by doubling time (t_d), maximum growth rate (μ_{max}) and the maximum biomass

TABLE 1 | Growth parameters estimated in the *Bacillus* isolates in the CCB.

rrn copies	Isolate	Phylogenetic group	Growth parameters			
			A	λ(h)	μ_{max} (h ⁻¹)	t_d (h)
A	14_55R_FT	X <i>B. cereus</i>	0.08	0.32	0.29	2.58
B	8_113_4C	XI <i>B. sonnensensis</i>	0.89	1.13	0.24	2.58
C	8_m2-34	I <i>B. sp.</i> m2-34	0.78	2.89	0.21	2.88
D	9_m2-9	V <i>B. coarctatus</i>	7.36	1.28	0.22	2.16
L	10_m2-6	VII <i>B. coarctatus</i>	7.88	1.46	0.21	2.20
I	12_1133_4U	XIV <i>B. pumilus</i>	7.35	1.70	0.31	2.23
G	5_163A_5H	XX <i>Staphylococcus</i>	7.30	0.52	0.25	2.58
II	12_407_3T	IX <i>B. marisflavi</i>	7.20	0.25	0.19	3.04
F	15_171_7C	XIII <i>B. subtilis</i>	7.72	2.78	0.57	1.51
J	11_127_4T	X <i>B. cereus</i>	0.09	2.78	0.29	3.74
K	7_152A_5R	I <i>B. aquamaris</i>	0.40	0.22	0.17	4.59
L	8_44_1T	XVII <i>B. horikoshii</i>	5.20	4.12	0.19	3.84
M	10_215_11T	IX <i>B. marisflavi</i>	4.44	1.44	0.12	3.77
N	11_144b_14T	XVI <i>B. pumilus</i>	3.67	2.79	0.11	6.30
O	8_103	XII <i>B. atrophaeus</i>	3.28	2.26	0.08	3.66
P	11_127B_4D	XVII <i>B. horikoshii</i>	3.22	1.70	0.05	7.70

A = maximum biomass reached (μ_{max} (CFU) $t_d - t_0$); λ = lag phase; μ_{max} = maximum specific growth rate; t_d = doubling time (exponential) time.

reached (A). Component 2 explained 26.87% of the variance, and was principally defined by adaptation time (λ) and the *rrn* operon copies (Supplementary Figure S4). Meanwhile, isolates with the highest copy numbers showed greater dispersion, having the most extreme parameter values (Table 1). These results may indicate that the *rrn* operon copy number in the *Bacillus* from the CCB may be related to the integrated suite of growth dynamics parameters, but not exclusively to the growth rate. Then, the heterogeneity in the growth dynamics of the isolates of *Bacillus* from the CCB could be a response to the low availability of nutrients and the competitive cost that represents the high number of copies of the *rrn* operon.

P and N Contents and N:P Ratios in the Exponential Phase

To assess potential eco-physiological implications associated with the oligotrophic conditions of the CCB regarding the genus *Bacillus*, biomass C, N, and P contents were estimated during the exponential phase of growth for all strains (Supplementary Table S2). All the isolates showed a relatively low but variable P (%) content (Mean = 0.49%; SD = 0.61%; Median = 0.25%). While C (%) and N (%) content also showed high variability among the isolates [N (%): Mean = 7.14; SD = 5.61; Median = 5.49; C (%): Mean = 64.64; SD = 26.63; Median = 59.63]. Both the C:N ratio (Mean = 13.18; SD = 7.18; Median = 12.32) and the N:P ratio (Mean = 126.7; SD = 235.1; Median = 52.1) showed a considerable range (Table 2). Finally, the N:P ratios estimated in the *Bacillus* from the CCB were substantially higher than the ratios reported for other *Bacilli* (*B. subtilis* 10.6; Loladze and Elser, 2011).

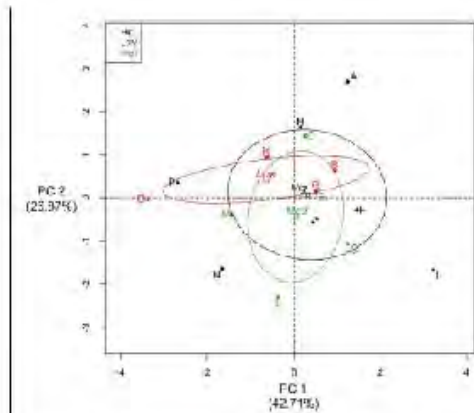


FIGURE 3 | Principal component analysis (PCA) of the growth parameters estimated in the *Bacillus* isolates from the CCB. The names of isolates (letters), from A to P, were in agreement with the maximum biomass reached (N), in Table 1. Color labels represent the isolates of the arbitrary coding system: (1) low number of rrn operon copies (1 to 6) (green labels), while red labels are the isolates with “low copy numbers” (two to seven), green labels are the isolates with “intermediate copy numbers” (8 to 10) and black labels are the isolates with “high copy numbers” (from 11 to 14).

Despite the growth rate not being related to cellular P content (Figure 4A), the correlation between *rrn* operon copy number and P (%) content is negative and significant (Figure 4B). Isolate G, with a low copy number (five copies *Staphylococcus*), had the highest cellular content of both elements. In addition, isolates B and O, with six *rrn* operon copies, had high P-content levels

TABLE 2 | C:N and N:P ratio during the exponential phase of growth in the isolates of *Bacillus* from the CCB.

	<i>rrn</i> copies	Isolate	Phylogenetic group	C:N	N:P
A	14	1553_ET	X. <i>B. cereus</i>	4.94	985.38
B	6	118_FC	XI. <i>B. sonorensis</i>	10.28	10
C	8	m3_18	II. <i>B. sp. m3_21</i>	8.35	296.47
D	9	m3_0	V. <i>B. coahuilensis</i>	21.82	79.00
L	14	m3-8	V. <i>B. coahuilensis</i>	15.18	52.91
I	12	1121_40	XIV. <i>B. pumilus</i>	15.77	134.61
G	5	1899_21	XX. <i>Staphylococcus</i>	5.75	25.82
IJ	12	107_31T	IX. <i>B. marisflavi</i>	8.87	19.02
I	13	170_10T	XVI. <i>B. thuringiensis</i>	17.75	40.07
J	14	195_4T	X. <i>B. cereus</i>	24.73	67.41
K	7	152A_3R	I. <i>B. aquimaris</i>	0.62	72.85
L	8	44_1T	XVII. <i>B. thuringiensis</i>	15.79	4.51
M	10	315_11T	IX. <i>B. marisflavi</i>	8.7	82.72
N	11	174b_14T	XV. <i>B. pumilus</i>	6.50	50.75
O	6	108	XII. <i>B. atrophaeus</i>	10.77	23.6
P	11	127_1_40	XVII. <i>B. thuringiensis</i>	10.55	51.32
		Mean ± SD		10.18 ± 7.18	125.72 ± 225.10

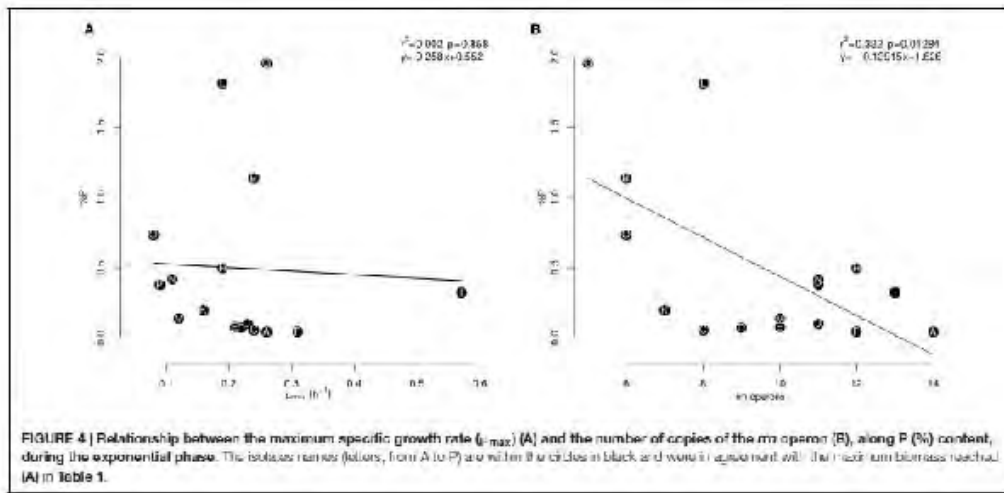
(*B. sonorensis* and *B. atrophaeus*, respectively). Meanwhile isolate A (14 *rrn* operon copies; *B. cereus*) had the lowest P content of all the isolates analyzed; this isolate also had the second-highest N content. The isolates D and E (*B. coahuilensis*; nine and ten *rrn* operon copies, respectively) showed low P contents and had the lowest N content. Moreover, the previous isolates with low *rrn* operon copies (B, G, and O) showed low N:P ratios, while isolate A, with a high number of *rrn* operon copies had the highest estimated N:P ratio. In addition, the two isolates related to *B. coahuilensis* showed intermediate values of this elemental ratio (Table 2). These results were not consistent with the GRH and it seems that the isolates with low number of copies of the *rrn* operon may cope better in this oligotrophy of the CCB, although the number of operon copies quantified is high in comparison with other bacterial groups that live in other oligotrophic environments (e.g., cyanobacteria; Foght et al., 1998).

DISCUSSION

The general objectives of this work were to assess the variability of a particular ecological trait, the *rrn* operon copy number in *Bacillus* strains isolated from extremely oligotrophic aquatic ecosystems, and to evaluate whether there is any association between the variation of this trait and strain physiology. We analyzed 71 isolates of this ecosystem and found considerable variation in the ribosomal operon copy number with a tendency toward an intermediate number of *rrn* operon copies. We also documented variation in growth rate dynamics and elemental composition. While we did observe physiological associations consistent with the GRH (e.g., the isolate with the slower-growth showed the lowest P content, and a high ratio of N:P). However, there were no consistent associations between copy number and growth parameters. Instead, it is likely that a variety of genomic strategies beyond variation in *rrn* copy number are employed to modulate growth in this clade of *Bacillus*, potentially allowing for their coexistence in different niches.

Phylogenetic Clustering of *Bacillus* Isolates

Our phylogenetic reconstruction showed a large diversity of species with isolates obtained from different habitats generally widespread in the tree. This suggests that each sampling site, as well as the overall system, contains several coexisting taxa. The microbial diversity in the Churince ecosystem has been deeply documented, particularly its *Bacillus* population, yielding 55 thermo resistant strains and several extremely halotolerant strains (Cerritos et al., 2010). Moreover, endemic *Bacillus* strains have been described and genotyped. For instance, the genomes of *B. coahuilensis* and *Bacillus* m3-13 show several interesting low-nutrient adaptations (Akaraz et al., 2008, 2010), as well as an ancient ancestry (Moreno-Letelier et al., 2011). Further sampling of pond sediments in Churince led to a demonstration of how antagonistic interactions between the *Bacilli* contribute to the large observed diversity, while maintaining a large local



differentiation via either resistance or avoidance as in a paper-rock-scissors model (Pérez-Gutiérrez et al., 2013; Aguirre-von-Wobeser et al., 2014).

Most of our isolates came from Churince, whose large terminal lake is now mostly dry due to water overexploitation (Souza et al., 2006, 2012). Interestingly, several times during this sampling period, we recovered the same phylogroups in the sediments in the same sampling sites. It has been argued that sediment is the “native” habitat of *Bacillus* in the CCB because many phylogenetic groups coexist there and can be recovered consistently at different sampling times (Pérez-Gutiérrez et al., 2013). Our results support what has been observed previously: the considerable levels of bacterial diversity in this basin are the outcome of complex biotic interactions within the community, CCB’s ancient geological history, low nutrient availability, and considerable spatial and seasonal variability in environmental conditions (Souza et al., 2012).

Variation in *rrn* Operon Numbers

We found no simple answer regarding variations in *rrn* operon copy number as a response on the part of bacteria in a low-nutrient environment. This was somewhat unexpected because *rrn* operon copy number is a well-studied functional trait that has been reported to be associated with bacterial lifestyle and represents an ecological strategy for nutrient use (Klappenbach et al., 2000; Stevenson and Schmidt, 2004; Green et al., 2008). A variety of studies have quantified the copy number of this operon in strains isolated from environmental samples, including some for which some *Bacillus* strains were analyzed (Klappenbach et al., 2000; Shrestha et al., 2007; Vieira Silva and Rocha, 2015). However, no previous studies have focused on *rrn* operon copy number in such a diverse group of coexisting species within the genus *Bacillus*, much less in a shared environment with extremely low nutrient availability.

Previous work has described the genomic properties of some *Bacillus* isolated from the CCB (Alcaraz et al., 2008, 2010). For example, the genome analysis of *B. coahuilensis* documented nine *rrn* operon copies (Alcaraz et al., 2010; unpublished results). However, in our analysis, we quantified eight copies, perhaps because the differences in size among operons were too small to be detected via the pulse field method. Nevertheless, such discrepancies are common when these types of data are compared (Vishnivetskaya et al., 2009). *Bacillus* groups isolated from the CCB showed from six to 14 *rrn* operon copies, which is consistent with previous quantifications of the *rrn* operon (from six to 15 copies reported in *rrnDB*, Stoddard et al., 2015). This range of operon copies is not what would be expected for isolates from the CCB because the idea is that they should match a slower (i.e., “K-selected”) life history in an oligotrophic environment such as the CCB. This could be the case for all of the CCB isolates related to *B. sonorensis*, a soil strain that was first described in a desert sample with similar environmental conditions to those of the CCB (Palnisamy et al., 2001; Souza et al., 2006, 2012). To evaluate this further, we compared our results with data from the *rrnDB* database. *B. atrophaeus* strain 1942 has seven *rrn* operon copies, but as mentioned above, in our analysis, we found a related strain with six copies. The *rrnDB* *B. subtilis* strains from the database showed from eight to ten copies; in our analysis, we observed a wider range (seven to eleven copies). On the other hand, seven copies of the *rrn* operon were observed in the *B. pumilus* genome, while *B. pumilus* relatives isolated in the CCB have eight, eleven, and twelve copies. Such intraspecific variability was evaluated by Acinas et al. (2004) for different bacterial genomes. They documented three species of *Bacillus* that had normal variation from one to three copies. Subsequent analysis with a larger number of *Bacillus* genomes showed similar variability (Rastogi et al., 2009). Accordingly, the CCB’s closely related, *pumilus*-like *Bacillus* showed a similar level of intraspecific variation, from one

to four copies. Overall, the number of copies of the *rrn* operon in the genus *Bacillus* at the CCB shows considerable variability, but it does not show evidence of any clear directional change from previously published values for various taxa. This could be due to the fact that very large ranges of taxa within the *Bacilli* are being selected for a wide variety of responses to cope with the oligotrophic environment. For example, while some save P in their ribosomes with a slow growth rate ("K strategists"), others may maintain a high growth capacity ("r strategists") that is compensated by other tactics, such as phospholipid to sulfolipid substitutions, the presence of high-affinity P-uptake systems, and small genomes (Alcaraz et al., 2008; Moreno-Letelier et al., 2011).

Growth Parameters and *rrn* Operon Copy Number

The analysis of bacterial growth is considered to be an important tool in understanding and characterizing an organism because it describes potential bacterial response to changes in environmental conditions, as well as ecological responses to other microorganisms (Monod, 1949; Neidhardt, 1999). As mentioned in the results section, the growth dynamics of *Bacillus* inhabitants of the CCB showed a high degree of variability in various parameters. This heterogeneity in growth rate has been previously observed for environmental strains with different numbers of *rrn* operons (Dethlefsen and Schmidt, 2007). In addition, several of the estimated parameters were similar to those described in other *Bacillus* strains under extreme experimental growth conditions (Supplementary Table S3); however, many of these previous studies were performed with model or economically important species. Previous work has considered the ecological importance of the *rrn* operon copy numbers in bacterial adaptation to different environmental conditions (Elser et al., 2000; Klappenbach et al., 2000; Shrivastha et al., 2003; Green et al., 2009). Variation in the number of *rrn* operon copies is potentially related to the bacterial growth rate because of the need to sustain high levels of rRNA synthesis (Clodon et al., 1993; Nanamiya et al., 2010; Yano et al., 2013). However, in our analysis, *rrn* operon copy number was not correlated with the estimated growth rate parameters. Instead, the growth dynamics of the *Bacilli* from the CCB may be dictated by a combination of different physiological responses that are uncoupled from the *rrn* operon copies, such as differences in transcription rates or intra-cellular allocation processes.

Among the various growth dynamics of the strains from the CCB, we observed not only that many parameters were out of range when compared with those estimated for other previously studied *Bacillus* but also that they presented high variability that at first inspection, does not seem to relate either to evolutionary history, isolation site, or *rrn* operon copy number. We hypothesize that the oligotrophic condition in the CCB may have had a significant effect on the *Bacillus* growth dynamics that contribute to this variability. For example, long adaptation times are related to stressful conditions affecting the speed of bacterial growth, like limited nutrient availability (Chorin et al., 1997; Schaeclter, 2006;

Autolinos et al., 2011, 2012; Brun et al., 2013). Furthermore, estimates of maximum biomass reached can be quite variable because of the influence of overall nutrient availability and sensitivity to the waste material that accumulates during the exponential phase (Buchanan et al., 1993; Jharn et al., 1997). In addition, long doubling times are characteristic of bacteria in oligotrophic environments (Viens-Silva and Rocha, 2015). Indeed, bacteria from other ecosystems that are extremely limited in terms of nutrients can achieve generation times of thousands of years (Jørgensen and Boetius, 2009; Labonté et al., 2015). Thus, the bacterial growth properties of *Bacillus* that live in the extremely oligotrophic ecosystems of the CCB likely involve a complex response to environmental and nutritional conditions acting in concert with genomic potential.

rrn Operon Copy Number and Phosphorus Availability in the CCB

As previously mentioned, ecosystems in the CCB are characterized by very low P availability in water, soil, and sediments (Elser et al., 2003; Pembert et al., 2012), a condition that makes its high variation in *rrn* operon copy number somewhat surprising because we expected that such habitats would be dominated by taxa with low operon copy numbers. Previous work has suggested that *rrn* operon copy number is related to nutrient availability and especially with P because the copy number is linked to the growth rate, which is associated with the production of P rich *rrn* (Elser, 2003; Jayasingh and Weider, 2007). Indeed, it has been shown that bacteria that live in oligotrophic environments do tend to have very low *rrn* operon copy numbers (< two copies; Fogatella et al., 1998; Strehl et al., 1999; Lauro et al., 2009). In theory, multiple copies could allow a growth rate advantage when resources are abundant but would impose a competitive cost when resources are limited due to the costs of the over-production of *rrn* (Weider et al., 2009; Dethlefsen and Schmidt, 2009; Jayasingh and Weider, 2007). While we detected many *Bacillus* isolates with six *rrn* operon copies, even this number is relatively high in comparison with other bacterial lineages that live under low nutrient conditions (Fogatella et al., 1998; Strehl et al., 1999; Lauro et al., 2009). Thus, it seems that the number of copies of the *rrn* operon is a functional trait related with the evolutionary history of the genus *Bacillus*, and defines its ecological versatility and adaptability to different environmental conditions (Klappenbach et al., 2000; Feldgarden et al., 2003; Stevenson and Schmidt, 2004; Connor et al., 2010).

A simple explanation of this incongruity is that the genus *Bacillus* does not pay for the full cost of high copy number under nutrient limitations due to its ability to escape from scarcity by forming spores and then germinating under better conditions. Indeed, stress response capacity has been shown to be related to *rrn* operon multiplicity (Nanamiya et al., 2010; Yano et al., 2013). However, spore formation in *Bacillus* of the CCB is not a given, due to the loss of many of the genes of the spore-forming complex in the sequenced genomes (Alcaraz et al., 2010)

and the difficulty of obtaining spores experimentally in all the isolated strains. Nevertheless, *B. coahuilensis* m4-4 and *B. sp.* m3-13 have eight and nine *rrn* operon copies, respectively, like other spore-forming *Bacilli* (*B. halodurans* C-125, eight *rrn* operon copies; *B. amyloliquefaciens* CC178, 9 *rrn* operon copies). Thus, the variability in the *rrn* operon copy number could reflect broader life history strategies in which each taxa uses different sets of resources or inhabits distinct microhabitats in structured sediments, potentially decreasing competition. In agreement with this view, various bacterial communities have been shown to have similar functional heterogeneity regarding other important ecological traits (Martínez-Alonso et al., 2004; Giovannoni and Stungl, 2005; Martiny et al., 2006). Additional work is needed to understand the importance of conserving high *rrn* operon copy numbers in CCB *Bacillus*.

Our overall findings about diversity in *Bacillus rrn* operon number in the CCB do not seem to conform to the broader context of the GRH (Hser et al., 2000; Hser, 2006). For example, isolate A (*B. cereus*) had the highest number of copies of the *rrn* operon (14) and also had the slowest growth rate and highest N:P ratio (965) when growing on media produced using the CCB's natural waters. Furthermore, several isolates with low *rrn* operon numbers showed some of the highest P content values, contrary to the GRH. However, the high N:P ratio and slow growth rate of isolate A is consistent with the development of severe P limitations for this high-copy-number strain, resulting in its high biomass N:P ratio. Then, it seems that the isolates with lower number of copies of the *rrn* operon may cope better in this oligotrophy of the CCB. To more effectively test the genetic dimension of the GRH, each strain would need to be raised under optimal conditions at its genetically constrained maximal growth rate. Indeed, this inference is supported by the higher dispersion of growth parameters seen for high-copy-number strains. That is, low-copy-number strains may have a limited range of growth variation, regardless of media, while high-copy-number strains may have a considerable range of growth, depending on whether or not the environment is well-matched to their needs. Another possible explanation for the decoupling of *rrn* operon number from growth rate and stoichiometric properties is that CCB *Bacillus* are selected for fine-tuned signaling with resource supplies or for variation in the rates of rRNA genes expression, thus disconnecting copy number from RNA production and growth rate (i.e., low-copy-strains may have high levels of transcription for each copy, while high-copy strains may more stringently express each copy). In any case, our data do not provide a clear resolution regarding the validity of the genetic components of the GRH within the *Bacillus* of the CCB. It is possible that the consideration of a broader range of bacterial taxa, as well as the more extensive testing of growth conditions, are needed in order to more rigorously test the GRH in the microbial realm, using approaches that can overcome the possible impacts of physiological conditions, phylogenetic inertia, and taxon-specific lifecycle strategies (e.g., sporulation) in terms of confounding the interpretations.

We suggest that the growth patterns described in the *Bacillus* isolates from the CCB, as well as the high variability in *rrn* operon copy number, represent ecological strategies that allow them to

persist in this oligotrophic ecosystem. Analogous strategies have been described in other organisms whose growth parameters are also affected by various environmental and biotic factors (Pianka, 1970; Page, 2002; Lipowsky et al., 2012). Variable lag phases may help in adapting to changing environmental conditions to reach optimum growth with long generation times (Crooks, 2005; Wangen and Webster, 2006; Daehler, 2009). We also note that the retardation of growth is a common result of intense interaction with other organisms, as well as stressful conditions (Lain et al., 2013; Tangata et al., 2014). To date, these ecological strategies in bacteria have been largely related only to nutrient availability (Gappenbach et al., 2000; Hierer et al., 2007; Shrestha et al., 2007). However, the intensity of direct inter-specific interactions (such as chemical antagonisms) can also establish coexistence, and these interactions are known to be particularly intense in the CCB (Souza et al., 2012; Pérez-Gutiérrez et al., 2013; Aguirre-Vin-Wehner et al., 2014). These inferences suggest a bet-hedging strategy on the part of CCB bacteria in which expression of RNA genes is tightly controlled due to low P-conditions (reflected in their overall low P content and high N:P ratio), but when chemical antagonism is successful, resources suddenly arrive, and the *rrn* operons are activated to grow rapidly under the nutrient bounty.

The main results of our work indicate that the *rrn* operon copy number exhibits considerable variation among field-isolated *Bacilli* and that considerable variation also exist in their growth properties and chemical composition. However, *rrn* operon copy number appears to be largely uncoupled from growth and chemical properties in this clade. Further investigation is needed to understand the ecological and physiological importance of this *rrn* operon variability, as mediated by gene transcriptional regulation, and its influence on ribosome and protein content and thus N:P stoichiometry (Gourse et al., 1996; Fegatella and Cavicchioli, 2000; Dehlefaen and Schmidt, 2007; Scott et al., 2010; Pir et al., 2011). It may be that the extreme oligotrophic conditions in the CCB have imposed important physiological constraints on resource allocation and growth rate, as well as the expression of the rRNA genes, and thus, the rate of production of ribosomes per *rrn* operon copy differs considerably among strains. More detailed studies, including competition experiments involving *Bacillus* strains isolated from different CCB environments and subject to various environmental limitations (such as differences in nutrient supply concentrations, ratios, and supply schedules), may be needed to identify the ecological and evolutionary significance of *rrn* operon copy number variation among microbes in the habitats of Cuatro Ciéngas and similar nutrient deficient habitats.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JV-A: Primary author, experimental design, amplification and analysis of genetic material, PFGE, analysis of data. LE-P: Experimental design, analysis of data. GD-S: PFGE standardization, analysis of data. PM-Z: Growth curves standardization, parameter estimations. JG-P: Statistical analysis. JI: Cell contents of phosphorus (P) and nitrogen (N). JF:

Experimental design, analysis of data. (X)-A: Experimental design, analysis of data. VS: Group leader, experimental design, analysis of data.

ACKNOWLEDGMENTS

Thanks are due to Posgrado en Ciencias Biológicas of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). This work is the doctoral research of JV-A in the Doctorado en Ciencias Biológicas program (CVU: 216032, CONACYT fellow number: 207187). We would like to thank Ariadama del C. Cruz-Córdoba and Juan Xicohtencatl-Cortés of the Laboratorio de Bacteriología Intestinal (Hospital Infantil de México "Federico Gómez"), and José Luis Méndez and Rosario Morales of the Laboratorio de Genómica Bacteriana (UNAM), because of their technical assistance in (1) CE standardization, Africa Islas of the Laboratorio de Bacteriología Molecular (CINVESTAV-Unidad Irapuato) for providing the strains needed to perform this work, Felipe García-Oliva (Biogeoquímica de Suelos: CIEto, UNAM) and Mario Soberón-Chávez (Departamento de Microbiología Molecular, IBT, UNAM) for their advice and input of ideas throughout the development of this work, Ana Gutiérrez Preciado (Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva, Universitat de València) for her comments and observations that contributed to the improvement of the manuscript. Grants from Alianza WWF-Fundación Carlos Slim to VS and LE-F and U.S. NSF (DEB-0950179) to JE supported this study. Laura Espinosa-Asoar and Erika Aguirre-Planter helped in the general technical logistics during the entire project.

REFERENCES

Aceves, S. G., Mirófilino, I. A., Klepac-Gera, V., and Fobz, M. P. (2004). Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple rrm operons. *J. Bacteriol.* 186, 2625–2635. doi: 10.1128/JB.186.9.2629-2635.2004

Aguirre-von-Wobeser, E., Soberón-Chávez, G., Iguarte, L. E., Ponce-Soto, C. Y., Vinquez-Rosas-Landa, M., and Souza, V. (2014). Two-role model of an interaction network of free living γ proteobacteria from an oligotrophic environment. *Environ. Microbiol.* 16, 1365–1377. doi: 10.1111/1462-2920.12305

Alcaraz, L. D., Marcano-Higedrich, U., Iguarte, L. E., Souza, V., Herrera-Estralla, L., and Omeñaca, G. (2010). Understanding the evolutionary relationships and major traits of *Bacillus* through comparative genomics. *BMC Genomics* 11:332. doi: 10.1186/1471-2164-11-332

Alcaraz, L. D., Omeñaca, G., Bouilla, G., Carillon, R., Henzler, G., Cruz, A., et al. (2008). The genome of *Bacillus coahuilensis* reveals adaptations essential for survival in the role of an ancient marine environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 5805–5808. doi: 10.1073/pnas.0800581105

Antalio, V., Muñoz, M., Ros-Chumillas, M., Aznar, A., Peñafo, P. M., and Fernández, P. S. (2011). Combined effect of lysozyme and nitrite at different incubation temperature and mild heat treatment on the probability of time growth of *Bacillus cereus*. *Food Microbiol.* 28, 305–310. doi: 10.1016/j.fm.2010.07.021

Antalio, V., Muñoz-Cuevas, M., Ros-Chumillas, M., Peñafo, P. M., Hernández, P. S., and Marc, Y. L. (2012). Modelling the effects of temperature and osmotic shifts on the growth kinetics of *Bacillus weihenstephanensis* in broth and food products. *Int. J. Food Microbiol.* 158, 35–44. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.06.017

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2015.01486>

FIGURE S1 | Growth conditions assays and Gompertz growth curves of the *Bacillus* isolates from the CCB. (A) Diffractograms of the growth dynamics of the *Bacillus*. A = Marine broth (Difco™ 2910), B = CCB water, C = CCB water + P (0.42PO₄, 5 g per liter) and D = CCB water + N (tryptone, 5 g per liter). Growth was quantified via culture turbidity (OD₆₀₀) (Diffractometer Phos. Spectra 1) after 12 h of growth at different environmental levels with optimal conditions for growth. (B) Growth curves were described after linear regression analysis according to the Gompertz equation. Isolate names were in agreement with the maximum growth reached (A), followed by the number of copies of the rrm operon for every isolate. Growth curves were pooled with the (left of the plot) name of assays [r(CFL/CFL₀ - 0)].

FIGURE S2 | rRNA operon copy number in the genus *Bacillus* isolated in the CCB. For every isolate, the separation of fragments with PFGE is shown on the left and southern blot confirmation is shown on the right. At the bottom of the figure is the total number of rRNA operon copies quantified. The red asterisk represents the fragments identical with hybridization analysis.

FIGURE S3 | Relationship between the growth parameters estimated in the *Bacillus* isolates from the CCB. (A) μ_{max} VS μ_{min} and (B) μ_{max} VS λ . Isolate names (letters, from A to H) are within the circles in black and were in agreement with the maximum biomass reached (A) in Table 1. λ = maximum biomass reached [ln(CFL/CFL₀ - 0)]; μ_{max} = μ_{max} phase; μ_{min} = maximum specific growth rate.

FIGURE S4 | Relative contribution (%) per variable in the PCA of the growth parameters estimated in the *Bacillus* isolates from the CCB. A = maximum growth reached; λ = lag phase; λ_2 = doubling time; and μ_{max} = maximum specific growth rate.

APHA (2005). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Washington, DC: American Public Health Association.

Eren, A., Hart, Y., Dönel, E., Koster, D., and Alm, U. (2013). The last generation of bacterial growth in limiting nutrient. *BMC Syst. Biol.* 7:77. doi: 10.1186/1745-2950-7-77

Buchanan, R. L., Whiting, R. C., and Darrett, W. C. (1997). When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. *Food Microbiol.* 14, 215–220. doi: 10.1006/food.1997.0127

Burlett, I. D. L., Kirkwood, T. B. L., and Whalley, J. B. (1986). Growth kinetics of individual *Bacillus subtilis* cells and correlation with nucleoid extension. *J. Bacteriol.* 167, 215–220.

Canocho-Roldán, R., Ostrowska, M., Tegulid, P., Goodchild, A., and Guzmán-Rivera, N. (2007). Life under nutrient limitation in oligotrophic marine environments: an ecophysiological perspective of *Sphingopyxis alaskensis* (formerly *Sphingopyxis alaskensis*). *Microb. Ecol.* 45, 203–217.

Cerritos, R., Iguarte, L. E., Avitia, M., Siefrid, I., Frausino, M., Rodríguez-Verdugo, A., et al. (2010). Diversity of culturable thermotolerant aquatic bacteria along an environmental gradient in Cuatro Ciénegas, Coahuila, Mexico. *Antonie van Leeuwenhoek* 96, 1–16. doi: 10.1007/s10482-010-9450-9

Cerritos, R., Vintner, R., Iguarte, L. E., Herrera-Estralla, L., Alcaraz-Farza, L. D., Avitia-Sánchez, T. L., et al. (2008). *Bacillus coahuilensis* sp. nov., a moderately halophilic species from a desiccated lagoon in the Cuatro Ciénegas valley in Coahuila, Mexico. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 919–923. doi: 10.1099/ijs.0.54953-0

Chorn, Z., Thanou, D., Clerel, E. J., and Bourgeois, C. M. (2007). Modeling *Bacillus cereus* growth. *Int. J. Food Microbiol.* 98, 229–234. doi: 10.1016/S0168-1605(07)00110-3

- Chaturvedi, V., and Sauer, U. (2014). Environmental dependence of stationary-phase metabolism in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 2901–2909. doi: 10.1128/AEM.00661-14
- Codina, C., Livers, D., Squires, C., Schwartz, J., and Soares, C. L. (1998). rRNA operon multiplicity in *Escherichia coli* and the physiological implications of rrr and rbf genes. *J. Bacteriol.* 177, 4152–4156.
- Collins, J. P., and Richmond, M. H. (1992). Rate of increase in length of bacterium between divisions. *J. Gen. Microbiol.* 38, 15–17. doi: 10.1099/00221787-38-15
- Conroy, N., Lisorski, J., Rooney, A. P., Karpac, S., Scoppell, A. F., Burger, A., et al. (2010). Ecology of speciation in the genus *Bacillus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1249–1258. doi: 10.1128/AEM.01938-09
- Cookes, J. A. (2005). Tag lines and exotic species: the ecology and management of biological invasions in slow motion. *Ecoscience* 12, 216–226. doi: 10.2980/1195-8860-12-2-216.1
- Daudin, C. C. (2009). Slow tag lines for invasive tropical plants: evidence from experimental planting in Hawaii. *PLoS ONE* 4:e4162. doi: 10.1371/journal.pone.004162
- Delgado, G., Souza, V., Morales, R., Cerritos, E., González-Cortáez, A., Méndez, J. F., et al. (2013). Genetic characterization of atypical *Citrobacter freundii*. *PLoS ONE* 8:e74126. doi: 10.1371/journal.pone.0074126
- Dethlefsen, L., and Schmidt, T. M. (2007). Performance of the translational apparatus varies with the ecological strategies of bacteria. *J. Bacteriol.* 189, 3237–3245. doi: 10.1128/JB.11636-05
- Eisen, J. J. (2007). Biological stoichiometry: a theoretical framework connecting ecosystem ecology, evolution, and biochemistry for application to astrobiology. *Int. J. Astrobiol.* 2, 185–192. doi: 10.1017/S1473289410001763
- Eisen, J. J. (2008). Biological stoichiometry: a chemical bridge between ecosystem ecology and evolutionary biology. *Am. Nat.* 168, 525–535. doi: 10.1086/578048
- Eisen, J. J., Sterner, R. W., Gorkhova, L., Eagen, W. L., Markow, T. A., Gornick, L. B., et al. (2009). Biological stoichiometry links genes to ecosystem. *Ecol. Lett.* 3, 210–218. doi: 10.1016/j.1461-0248.2008.09185.x
- Eisen, J. J., Wicks, J., Schamp, J. H., and Palmer, J. (2005). Early Cambrian food webs on a trophic knife edge? A hypothesis and preliminary data from a modern stromatolite-based ecosystem. *Ecol. Lett.* 9, 295–303. doi: 10.1111/j.1461-0248.2005.00873.x
- Fagutella, E., and Cawthra, R. (2000). Physiological responses to starvation in the marine oligotrophic cyanobacterium *Sphaerococcus* sp. strain RB2256. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2037–2044. doi: 10.1128/AEM.66.5.2037-2044.2000
- Fagutella, E., Liu, J., Kjelleberg, S., and Cavicchioli, R. (1998). Implications of rRNA operon copy number and ribosome content in the marine oligotrophic cyanobacterium *Sphaerococcus* sp. strain RB2256. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4455–4458.
- Feldgarden, M., Byrd, N., and Cohan, F. M. (2002). Gradual evolution in bacteria: evidence from *Bacillus* systematics. *Microbiology* 148(Pt. 12), 3565–3572. doi: 10.1099/mic.0.2645-04
- Fierer, N., Bradford, M. A., and Jackson, R. B. (2007). Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology* 88, 1354–1364. doi: 10.1890/0014-1801-2006-0200
- Geo, R., Wen, Z. Y., and Wong, S. M. (2013). Plant growth retardation and conserved miRNAs are correlated to hibiscus chlorotic ringspot virus infection. *PLoS ONE* 8:e85478. doi: 10.1371/journal.pone.0085478
- Giovannoni, S. J., and Stingl, V. (2005). Molecular diversity and ecology of microbial plankton. *Nature* 437, 343–348. doi: 10.1038/nature04158
- Goto, K., Osumi, T., Hara, Y., and Sadaie, Y. (2000). Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus *Bacillus*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 46, 1–6. doi: 10.2327/jgm.46.1
- Gourse, R. L., Gask, T., Bartlett, M. S., Appleman, T. A., and Boss, W. (1996). rRNA transcription and growth rate-dependent regulation of ribosome synthesis in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Microbiol.* 50, 645–671. doi: 10.1146/annurev-micro.50.1.645
- Green, J. L., Bohannan, B. J. M., and Whitaker, R. J. (2008). Microbial biogeography: from taxonomy to traits. *Science* 320, 1039–1042. doi: 10.1126/science.1153175
- Hughes, A. R., Inouye, B. D., Johnson, M. T. J., Underwood, S., and Vellend, M. (2008). Ecological consequences of genetic diversity. *Ecol. Lett.* 11, 609–623. doi: 10.1111/j.1461-0248.2008.01179.x
- Jayasingh, P. T., and Weider, L. J. (2007). Functional links between genes and elements: evolutionary implications of ecological stoichiometry. *Mol. Ecol.* 16, 4648–4661. doi: 10.1111/j.1365-3113.2007.03558.x
- Jørgensen, B. B., and Jørgensen, A. (2007). Yeast and furanone-microbial life in the deep-sea bed. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 770–781. doi: 10.1038/nrmicro1745
- Kacera, M. A., Merrill, G. A., Manfredi, B., Smith, E. E., Klaus, D. M., and Todd, P. (1993). Bacterial growth in space flight: logistic growth curve parameters for *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31, 223–224. doi: 10.1007/bf02530051386
- Klappnerbach, J. A., Dunbar, J. M., and Schmidt, T. M. (2003). rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1328–1333. doi: 10.1128/AEM.69.4.1328-1333.2003
- Klappnerbach, J. A., Saxman, P. R., Cole, J. R., and Schmidt, T. M. (2001). rrrAB: ribosomal RNA operon copy number database. *Nucleic Acids Res.* 29, 181–184. doi: 10.1093/nar/29.1.181
- Lalonde, J. M., Firth, E. K., Jax, M., Chivian, D., Van Helden, F., Wommersley, R. L., et al. (2015). Single cell genomics indicates horizontal gene transfer and viral infections in a deep subsurface Firmicutes population. *Front. Microbiol.* 22:249. doi: 10.3389/fmicb.2015.00349
- Laurio, L. M., McDougald, D., Thomas, L., Williams, L. J., Egan, S., Rutz, S., et al. (2019). The genomic basis of trophic strategy in marine bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 116, 15827–15833. doi: 10.1073/pnas.1909517116
- Lipowsky, A., Roscher, C., Schumacher, J., and Schmidt, B. (2012). Density-independent mortality and increasing plant diversity are associated with differentiation of *Tharionia* alkaline nitro-sulfid K-strategists. *PLoS ONE* 7:e28121. doi: 10.1371/journal.pone.0028121
- Lu, S., Hessel, A., and Sanderum, K. P. (1993). Genetic mapping with 1-Cat, an intron encoded endonuclease specific for genes for ribosomal RNA, in *Salinivibrio* spp., *Escherichia coli*, and other bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 6874–6878. doi: 10.1073/pnas.90.14.6874
- Loladze, I., and Elser, J. J. (2011). The origins of the Redfield nitrogen to phosphorus ratio are in a homeostatic protein-to-rRNA ratio. *Ecol. Lett.* 14, 244–250. doi: 10.1111/j.1461-0248.2010.01577.x
- Maril, E. (2015). The role of phosphorus in chemical evolution. *Chem. Soc. Rev.* 34, 651–701. doi: 10.1039/c4re00055k
- Martinez-Alonso, M., Mir, L., Guzmán, P., Gato, N., Guerrero, R., and Estévez, J. (2004). Distribution of phototrophic populations and primary production in a microbial mat from the Ebro Delta, Spain. *Int. Microbiol.* 7, 19–25.
- Martiny, A. C., Coleman, M. L., and Chisholm, S. W. (2006). Phosphate acquisition genes in *Prochlorococcus* ecotypes: evidence for genome-wide adaptation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 12552–12557. doi: 10.1073/pnas.0604131103
- Martiny, A. C., Huang, Y., and Li, W. (2009). Occurrence of phosphate acquisition genes in *Prochlorococcus* cells from different ocean regions. *Environ. Microbiol.* 11, 1340–1347. doi: 10.1111/j.1462-2820.2009.01880.x
- McGill, B. J., Enquist, B. J., Weiher, E., and Westoby, M. (2006). Rebuilding community ecology from functional traits. *Trends Ecol. Evol.* 21, 170–175. doi: 10.1016/j.tree.2006.02.002
- Membré, J. M., Lepore, B., Viale, M., Mettler, E., Perrier, L., Thuault, D., et al. (2005). Temperature effect on bacterial growth rate: quantitative approach including cardinal values and variability estimates to perform growth simulations *in silico*. *Int. J. Food Microbiol.* 100, 179–190. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.015
- Monod, J. (1949). The growth of bacterial cultures. *Annu. Rev. Microbiol.* 3, 371–394. doi: 10.1146/annurev-micro.03.116149.007103
- Moreno-Lecio, A., Diemond, G., Iguarte, L. B., Martínez-Gastilla, L., and Souza, V. (2011). Parallel evolution and horizontal gene transfer of the

- psf operon in Firmicutes from oligotrophic environments. *Int J Evol Biol* 2011:781642. doi:10.4061/2011/781642
- Nishikawa, K., Nozaki, M., Yoshitomo, T., Kame, S., Co. M., Iohsua, S., et al. (2003). Characterization and comparative study of the rRNA operon of alkaliphilic *Bacillus halodurans* C 125. *Extremophiles* 7, 209–213. doi:10.1007/s00800-003-0107-5
- Narazawa, H., Sato, M., Masuda, K., Sato, M., Wada, T., Suzuki, S., et al. (2010). *Bacillus subtilis* mutants harbouring a single copy of the rRNA operon exhibit severe defects in growth and sporulation. *Microbiology* 156, 2444–2452. doi:10.1099/mic/0000000000000295-0
- Neidhardt, F. C. (1999). Bacterial growth constant obsession with rDNA. *J. Bacteriol.* 181, 7405–7408.
- Ng, T. M., and Scheffner, L. W. (1997). Mathematical models for the effects of pH, temperature, and sodium chloride on the growth of *Bacillus pasteurii* on salty carrots. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 125–128.
- Page, C. N. (2002). Ecological strategies in term evolution: a neoperiological overview. *Rev. Palaeobot. Palynol.* 119, 1–33. doi:10.1016/S0034-6667(01)00127-0
- Palanisami, M. M., Nakamura, I. K., Dancu, K. E., Istok, C. A., and Collier, P. M. (2007). *Bacillus israelensis* sp. nov., a close relative of *Bacillus thuringiensis*, isolated from soil in the Sonoran Desert, Arizona. *Int J Syst. Evol. Microbiol.* 51, 1671–1679. doi:10.1099/ijs.00207713-51-5-1671
- Pembert, M., Acaz, L. E., Borilla-Ross, G., Climerd-Alvarez, G., Garcia-Oliva, P., Segovia, L., et al. (2012). Comparative metagenomics of two microbial mats at Cuicatlan Geoglyphs Basin: an ancient lesson on how to cope with an environment under severe nutrient stress. *Astrobiology* 12, 648–658. doi:10.1089/ast.2011.0699
- Pérez-Gutiérrez, R. A., López-Ramírez, V., Biza, A., Alcaraz, L. D., Hernández-González, L., Luna-Olivares, R. C., et al. (2013). Antagonism influences assembly of a *Bacillus* guild in a local community and is depicted as a food-chain network. *ISMEJ* 7, 497–497. doi:10.1038/ismej.2013.119
- Plano, E. R. (1970). On r and K selection. *Am. Nat.* 104, 592–597. doi:10.1086/282227
- Pfir, K., Pökel, A., Lin, A., Tenson, T., and Makal, O. (2011). Ribosome degradation in growing bacteria. *EMBO Rep.* 12, 458–462. doi:10.1038/embo.2011.47
- Powell, E. O. (1955). Growth rate and generation time of bacteria with special reference to continuous culture. *J. Gen. Microbiol.* 15, 489–511. doi:10.1099/00221287-15-3-489
- Prüß, B. M., Francis, K. P., von Stetten, F., and Scherer, S. (1999). Correlation of 16S rRNA DNA signature with adaptive and genotypic and rates of mesophilic and psychrotolerant strains of the *Bacillus cereus* group. *J. Bacteriol.* 181, 7654–7670.
- Rasogi, R., Wu, M., Dasgupta, J., and Fox, G. E. (2008). Visualization of ribosomal RNA operon copy number distribution. *ISME J.* 2, 228. doi:10.1186/1471-2185-9-208
- Ratkowsky, D. A., 1997, R. S., McMeekin, T. A., Stokes, A. N., and Chandler, R. E. (1982). Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biospecific temperature range. *J. Bacteriol.* 159, 1222–1226.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 31–39.
- Schacherer, M. (2006). From growth physiology to system biology. *Int. Microbiol.* 9, 157–161.
- Scott, M., Gardenson, C. W., Metesca, L. M., Zhang, Z., and Iyengar, T. (2011). Interdependence of cell growth and gene expression: origins and consequences. *Science* 330, 1099–1102. doi:10.1126/science.1202588
- Shrestha, P. M., Noll, M., and Tiedje, W. (2007). Phylogenetic identity, growth-response time and rRNA operon copy number of soil bacteria indicate different stages of community succession. *Environ. Microbiol.* 9, 2464–2474. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01361.x
- Solarte, V., Eguarte, L. E., Siefert, J. S., and Eiserich, J. P. (2008). Microbial endosymbiosis: does phosphorus limitation enhance speciation? *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 579–584. doi:10.1038/nrmicro1917
- Solano, V., Espinoza-Ascar, L., Escalante, A. E., Eguarte, L. E., Ferraci, L. E., Forney, J., et al. (2009). An endangered oasis of aquatic microbial biodiversity in the Chihuahuan desert. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 6565–6569. doi:10.1073/pnas.0801424106
- Solano, V., Siefert, J. P., Escalante, A. E., Eiserich, J. P., and Eguarte, L. E. (2012). The Cuicatlan Geoglyphs Basin in Coahuila, Mexico: an astrobiological Precambrian park. *Astrobiology* 12, 641–647. doi:10.1089/ast.2011.0575
- Spacie, C. C., Treviño, J., Bertrand, M., and Dobell, M. (2008). Adaptation increases the likelihood of diversification in an experimental bacterial lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 1587–1589. doi:10.1073/pnas.0706870105
- Sterner, R. W., and Eisele, L. L. (2002). *Ecological Stoichiometry: The Biology of Elements from Molecules to the Biosphere*. Princeton, NJ: Princeton University Press.
- Stevenson, B. S., and Schmidt, T. M. (2004). Life history implications of rRNA gene copy number in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6570–6577. doi:10.1128/AEM.70.11.6570-6577.2004
- Stoddard, S. F., Smith, B. J., Heia, E., Becker, B. R. S., and Schmidt, T. M. (2015). rnaDB: improved tools for interpreting rRNA gene abundance in bacteria and archaea and a new foundation for future development. *Nucleic Acids Res.* 43, D553–D558. doi:10.1093/nar/gkt120
- Strehl, U., Hiltzendorff, L., Artenbery, F., and Hies, W. R. (1999). A small and compact genome in the marine cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* CCMP 1375: lack of an intron in the gene for (RNA)UAA and a single copy of the rRNAop. *FEMS Microbiol. Lett.* 181, 261–265. doi:10.1111/j.1574-6968.1999.tb08553.x
- Sutherland, I. P., Azerna, A., and Beaumont, A. L. (1996). Preparation and validation of growth model for *Bacillus cereus*: the effects of temperature, pH, sodium chloride and carbon dioxide. *Int. J. Food Microbiol.* 30, 359–372. doi:10.1016/0168-1607(96)00967-7
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739. doi:10.1093/molbev/mr121
- Thompson, J. D., Gibson, T. F., and Higgins, D. G. (2002). Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Curr. Protoc. Bioinformatics* Chapter 2, Unit 2.5. doi:10.1002/0471250638.b02025a01
- Tsuama, D., Liu, S., and Tócano, T. (2014). Analysis of functions of VIP1 and its close homologs in osmoregulatory responses of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 9, e103930. doi:10.1371/journal.pone.0102930
- Valik, L., Gornet, E., and Lauková, D. (2003). Growth dynamics of *Bacillus cereus* and self-life of pasteurized milk. *Czech J. Food Sci.* 51, 195–202.
- Van Mooy, B. A. S., Fredricks, H. P., Puffer, B. E., Dylamann, S. T., Kall, J. M., Kozlzek, M., et al. (2009). Phytoplankton in the ocean use non-planktonic lipid in response to phosphorus scarcity. *Nature* 458, 69–72. doi:10.1038/nature07659
- Vieira-Silva, S., and Rocha, E. P. C. (2015). The systemic imprint of growth and its uses in ecological (Meta) genomics. *PLoS Genet.* 10, e1004808. doi:10.1371/journal.pgen.1004808
- Vishnevskaya, T. A., Kharitonov, S., and Fedin, J. M. (2009). The *Erythrobacterium* genus: biodiversity and biogeography. *Extremophiles* 13, 541–555. doi:10.1007/s00792-009-0243-5
- Wargen, S. R., and Webster, C. R. (2006). Potential for multiple lag phases during biotic invasions: reconstructing an invasion of the exotic tree *Acer glaberrimus*. *J. Appl. Ecol.* 43, 258–268. doi:10.1111/j.1365-2656.2006.01138.x
- Warth, R. D. (1970). Relationship between the heat resistance of spores and the optimum and maximum growth temperatures of *Bacillus* species. *J. Bacteriol.* 124, 569–705.
- Weida, L. J., Eise, J. J., Crease, T. J., Mawes, M., Cotner, J. B., and Markow, T. A. (2005). The functional significance of ribosomal (r) DNA variation: impacts on the evolutionary ecology of organisms. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 36, 219–242. doi:10.1146/annurev.ecolsys.36.102005.152620
- Winkler, R. J., Grogan, D. W., and Taylor, J. W. (2003). Geographical heterogeneity in endemic populations of hyperthermophilic archaea. *Science* 301, 976–978. doi:10.1126/science.1066979
- Xu, J. (2006). Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances. *Mol. Ecol.* 15, 1713–1731. doi:10.1111/j.1365-294X.2006.02887.x
- Yano, K., Wada, T., Suzuki, S., Tagami, K., Matsumoto, T., Shino, Y., et al. (2013). Multiple rRNAops are essential for efficient cell growth and sporulation

as well as outgrowth in *Salmonella* spp. *Microbiology* 159, 2225–2236. doi: 10.1099/mic/0/067025-0

Zwietering M. H., Jongenburger I., Kosterhout A. A. M. and van't Riet K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1875–1881.

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 Ceballos-Austin, Sguinard-Prius, Delgado-Sapién, Márquez-Zúñiga, Gáscar-Pineda, Leunel, Eber, Obando-Sánchez and Sotelo. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the copyright notice remains visible in any publication in which this article is included, provided that the original author(s) and source are credited. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.