



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Análisis del efecto de la oligotrofia sobre el número de copias del  
operón ribosomal (*rrn*) y en la dinámica de crecimiento del género  
*Bacillus* en el sistema hidrológico del Valle de Cuatro Ciénegas,  
Coahuila.**

## TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**JORGE ANTONIO VALDIVIA ANISTRO**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:**

**DRA. VALERIA FRANCISCA EUGENIA LEOPOLDINA DE MARÍA  
GUADALUPE SOUZA SALDIVAR**  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

**COMITÉ TUTOR:**

**DR. MARIO SOBERÓN CHÁVEZ**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

**DR. FELIPE FRANCISCO GARCÍA OLIVA**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD, UNAM

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., NOVIEMBRE, 2016.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE ECOLOGÍA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

Análisis del efecto de la oligotrofia sobre el número de copias del operón ribosomal (*rrn*) y en la dinámica de crecimiento del género *Bacillus* en el sistema hidrológico del Valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila.

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**JORGE ANTONIO VALDIVIA ANISTRO**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:**

**DRA. VALERIA FRANCISCA EUGENIA LEOPOLDINA DE MARÍA  
GUADALUPE SOUZA SALDIVAR  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR:**

**DR. MARIO SOBERÓN CHÁVEZ  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM**

**DR. FELIPE FRANCISCO GARCÍA OLIVA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD, UNAM**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., NOVIEMBRE, 2016.**

Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Biología Evolutiva y Sistemática, en su sesión ordinaria del día 13 de junio de 2016, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **DOCTOR EN CIENCIAS**, del Posgrado en Ciencias Biológicas, del alumno **VALDIVIA ANISTRO JORGE ANTONIO** con número de cuenta **97280459** con la tesis titulada: "**Análisis del efecto de la oligotrofia sobre el número de copias del operón ribosomal (rrn) y en la dinámica de crecimiento del género *Bacillus* en el sistema hidrológico del Valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila**", bajo la dirección de la **DRA. VALERIA FRNACISCA EUGENIA LEOPOLDINA DE MARÍA DE GUADALUPE SOUZA SALDIVAR**:

Presidente: DR. ARTURO CARLOS II BECERRA BRACHO  
Vocal: DR. DAVID ROMERO CAMARENA  
Secretario: DR. MARIO SOBERÓN CHÁVEZ  
Suplente: DRA. ESPERANZA MARTÍNEZ ROMERO  
Suplente DR. LUIS DAVID ALCARAZ PERAZA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 26 de septiembre de 2016

*M. del Coro Arizmendi*  
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



## **AGRADECIMIENTOS**

AL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS,  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACyT):  
(Beca CONACyT: CVU 216032; Número de becario 207187).

### **FINANCIAMIENTO:**

ALIANZA WWF-FUNDACIÓN CARLOS SLIM (VALERIA SOUZA Y LUIS  
EGUIARTE-FRUNS) Y U.S. NSF (DEB-0950179) (JAMES ELSER).

### **A LA TUTORA PRINCIPAL:**

DRA. VALERIA FRANCISCA EUGENIA LEOPOLDINA DE MARÍA  
GUADALUPE SOUZA SALDIVAR, INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM.

### **A LOS MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:**

DR. MARIO SOBERÓN CHÁVEZ, INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM.

DR. FELIPE FRANCISCO GARCÍA OLIVA, INSTITUTO DE  
INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD, UNAM.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

A MI FAMILIA.

A ELIZABETH CASTILLO VILLANUEVA.

A LA FAMILIA EGUIARTE SOUZA.

A MIS AMIGOS:

JAIME GASCA, ROBERTO TREJO, RICARDO COLÍN, MARCO RODRÍGUEZ Y  
MANUEL ROSAS.

A LA SEÑORA SILVIA BARRIENTOS.

A ARIADNNA del CARMÉN CRUZ CÓRDOVA,  
Hospital Infantil de México “Federico Gómez”.

A GABRIELA DELGADO, JOSÉ LUIS MENDEZ Y ROSARIO MORALES,  
Laboratorio de Genómica Bacteriana, Facultad de Medicina, UNAM.

# INDICE

	Página
Resumen .....	1
Abstract .....	2
Introducción .....	3
Figura 1. Principales eventos relacionados con el origen y evolución de los seres vivos en la Tierra.	3
Tabla 1. Concentración relativa de los principales elementos biogénicos.	4
Figura 2. Análisis comparativo de la abundancia de los elementos biogénicos entre el Sistema Solar y la biomasa de un modelo biológico (lavadura).	5
Figura 3. Síntesis elemental en núcleos de cuerpos estelares y diversidad y abundancia de compuestos químicos del fósforo.	6
Figura 4. Los tres Dominios de la vida.	9
Figura 5. Ciclo del fósforo (P).	10
Figura 6. Evolución del genoma bacteriano.	12
Antecedentes .....	15
Figura 7. Hipótesis de la Tasa de Crecimiento.	17
Figura 8. La diversidad microbiana presente en el sistema hidrológico del Valle de Cuatro Ciénegas en el desierto chihuahuense.	18
Figura 9. Adaptaciones a la oligotrofia extrema del Valle de Cuatro Ciénegas descritas en la especie endémica <i>Bacillus coahuilensis</i> m4-4.	19
Justificación .....	20
Objetivos general y particulares .....	21
Métodos .....	22
Figura 10. Sitios de muestreo en el Valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila.	23



<b>Resultados</b>	.....	30
Figura 11. Árbol de Máxima verosimilitud (Maximum-likelihood) de los 19 grupos filogenéticos identificados con la región 5' HV del gen 16S rRNA.		30
Figura 12. Número de copias del operón <i>rrn</i> en los grupos filogenéticos del VCC.		32
Figura 13. Variación del número de copias del operón <i>rrn</i> en la diversidad del género <i>Bacillus</i> del VCC.		33
Figura 14. Número de copias del operón <i>rrn</i> en la diversidad bacteriana.		35
Tabla 2. Parámetros de crecimiento estimados en los aislados del VCC.		37
Figura 15. Condiciones y determinación de la dinámica de crecimiento de los aislados del VCC.		38
Figura 16. Correlación de los parámetros de crecimiento estimados en los aislados del VCC.		39
Tabla 3. Coeficiente de correlación de Pearson ( <i>r</i> ) de los parámetros de crecimientos estimados en los aislados del VCC.		40
Figura 17. Análisis categórico del número de copias del operón <i>rrn</i> y los parámetros de crecimiento estimados en los aislados del VCC.		41
Tabla 4. Contenido de C, N y P (%) y, proporciones C:N y N:P durante la fase exponencial de aislados del VCC.		43
Figura 18. Relación entre la tasa específica de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) (A) y el número de copias del operón (B), con el contenido de P (%) durante la fase exponencial de crecimiento.		44
Figura 19. Variación del contenido de proteínas durante la dinámica de crecimiento de los aislados del VCC.		45
Figura 20. Patrones del contenido de proteínas durante la dinámica de crecimiento de los aislados del VCC.		46-47
<b>Discusión</b>	.....	48
<b>Conclusiones</b>	.....	58
<b>Perspectivas</b>	.....	60
<b>Referencias</b>	.....	62
<b>Anexos</b>	.....	76
Anexo 1. Parámetros de crecimiento estimados en diferentes cepas de <i>Bacillus</i> .		76



## RESUMEN

El operón ribosomal (*rrn*) son un grupo de genes relacionado con la síntesis de la maquinaria para la producción de proteínas; por lo que, está estrechamente relacionado con el crecimiento y con la fisiología bacteriana. Experimentalmente, se ha observado una relación intrínseca entre el número de copias de este operón y los recursos ambientales disponibles; específicamente con la concentración de fósforo (P), debido a que las bacterias que habitan ecosistemas oligotróficos presentan un número reducido de copias del operón *rrn* y tienen una tasa de crecimiento lenta. El Valle de Cuatro Ciénegas (VCC) es un sistema hidrológico complejo que alberga una diversidad microbiana alta y atípica que ha persistido bajo condiciones de oligotrofia extrema. Esta condición ambiental ha impuesto una variedad de presiones selectivas fuertes que han moldeado la dinámica genómica de las bacterias que lo habitan. El género *Bacillus* es uno de los grupos cultivables más abundantes y estudiados del VCC, que se caracteriza por tener un número de copias del operón *rrn* elevado (6-15 copias). Por lo que, el objetivo general del presente trabajo fue cuantificar el número de copias del operón *rrn* en aislados relacionado con el género *Bacillus* procedentes del VCC y, analizar la relación que tiene este número con la dinámica de crecimiento, el balance estequiométrico (contenido C, N y P) y el contenido de proteínas. Se definieron 18 grupos filogenéticos relacionados con *Bacillus*; los cuales, mostraron un rango de 6 a 14 copias del operón *rrn*. La dinámica de crecimiento y el contenido de proteínas fueron heterogéneos y ambos mostraron estar desacoplados del número de copias del operón *rrn*; por lo que, estos resultados no se correlacionaron con la Hipótesis de la Tasa de Crecimiento (Estequiometria biológica). Sin embargo, estos resultados podrían estar mostrando la diversidad de estrategias de crecimiento que utilizan estos bacilos para contrarrestar la extrema oligotrofia del VCC, asociado al elevado número de copias operón y al bajo contenido de P que presentan a nivel celular. Por lo que, el presente trabajo contribuyó en el conocimiento de la variación del número de copias del operón *rrn* del género *Bacillus* y en la descripción de los mecanismos de respuesta a nivel fisiológico de este género bajo condiciones de oligotrofia extrema.

## ABSTRACT

The ribosomal RNA (*rrn*) 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 *rrn* 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 *rrn* operon copies (6-15 copies). The main goal of this study was to analyze the variation in the number of *rrn* 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 18 phylogenetic groups within the Bacilli clade and documented a range of from six to 14 copies of the *rrn* 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 *rrn* 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 *rrn* 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 *rrn* operon in the genus *Bacillus* and give insights about the physiology of this bacterial group under extreme oligotrophic conditions.

## INTRODUCCIÓN

### *Los elementos químicos y su importancia en la evolución de la vida*

Desde su origen, los seres vivos han adquirido o desarrollado diversas adaptaciones relacionadas con los cambios ambientales que han ocurrido a lo largo de la historia geológica de la Tierra (Williams, 1997; Des Marais and Walter, 1999; Cleaves II, 2013). Muchas de estas adaptaciones han quedado registradas en el material genético de los seres vivos; sin embargo, antes del origen de la vida, la evolución química fue un proceso importante que estableció los principios para su desarrollo y funcionamiento (Figura 1) (Horneck, 1995; Spitzer, 2013). Al estudiar los efectos de los cambios ambientales sobre los procesos que dieron lugar a los principios biológicos, se han obtenido avances del origen y evolución de la vida primitiva (Kasting and Siefert, 2002; Bernstein, 2006; Spitzer et al., 2015). A nivel químico, la evidencia más importante del proceso evolutivo es que todos los seres vivos estamos compuestos de los mismos elementos (Sterner and Elser, 2002).

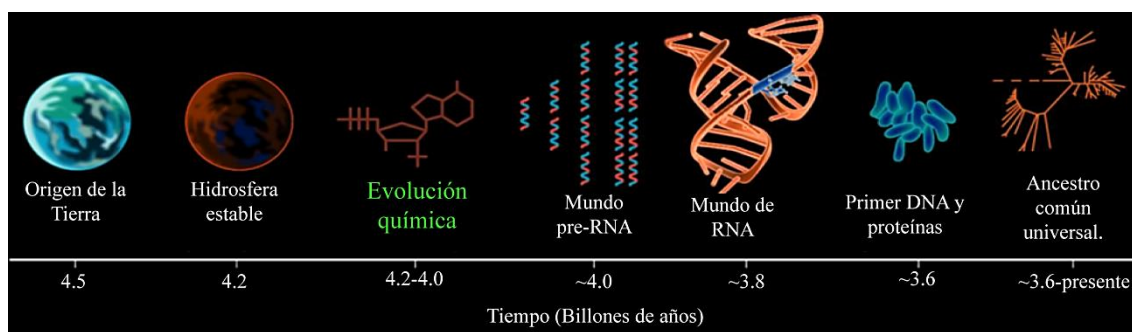


Figura 1. Principales eventos relacionados con el origen y evolución de los seres vivos en la Tierra

(Tomado de Joyce, 2002).

Los elementos químicos son los componentes básicos de la materia y son indispensables para el funcionamiento de los seres vivos (Bertini et al., 1994; Spitzer, 2013). Estos elementos se encuentran unidos entre sí por enlaces químicos que se forman y se disgregan durante los principales procesos bióticos (Kleidon, 2010). La composición química de los organismos está basada en la dominancia de un grupo de

elementos denominados **biogénicos**, entre los que destacan el carbono (**C**), hidrógeno (**H**), oxígeno (**O**), nitrógeno (**N**), fósforo (**P**) y azufre (**S**) (Elser, 2003). La dominancia de estos elementos es considerada un reflejo de la abundancia relativa en la que se encontraban en los sitios donde se originó la vida (Spitzer et al., 2015). Sin embargo, se ha observado que la composición de algunos organismos puede variar debido a la disponibilidad espacio-temporal en la que se encuentran estos elementos en los ecosistemas (Sternner and Elser, 2002; Jeyasingh and Weider, 2007). En este sentido, la variación en la disponibilidad del fósforo ha mostrado una gran influencia en la evolución y funcionamiento de los seres vivos; a pesar de ser uno de los elementos más escasos en la Tierra y en el Sistema Solar (Tabla 1; Figura 2) (Maciá, 2005; Schwartz, 2006; Pasek et al., 2015).

**Tabla 1.** Concentración relativa de los principales elementos biogénicos  
(Tomado de Sternner and Elser, 2002).

Elemento	Sistema solar	Planeta	Corteza terrestre	Sistemas biológicos
Hidrógeno	A	B	D	A
Carbono	B	B	B	A
Nitrógeno	B	B	B	A
Oxígeno	A	A	A	A
Fósforo	B	B	B	A
Azufre	B	A	B	B

A > 10<sup>-2</sup> (>1%); 10<sup>-2</sup> > B > 10<sup>-4</sup> (entre 1ppm y 1%); 10<sup>-9</sup> < D (<1ppb).  
ppm = partículas por millón; ppb = partículas por billón.

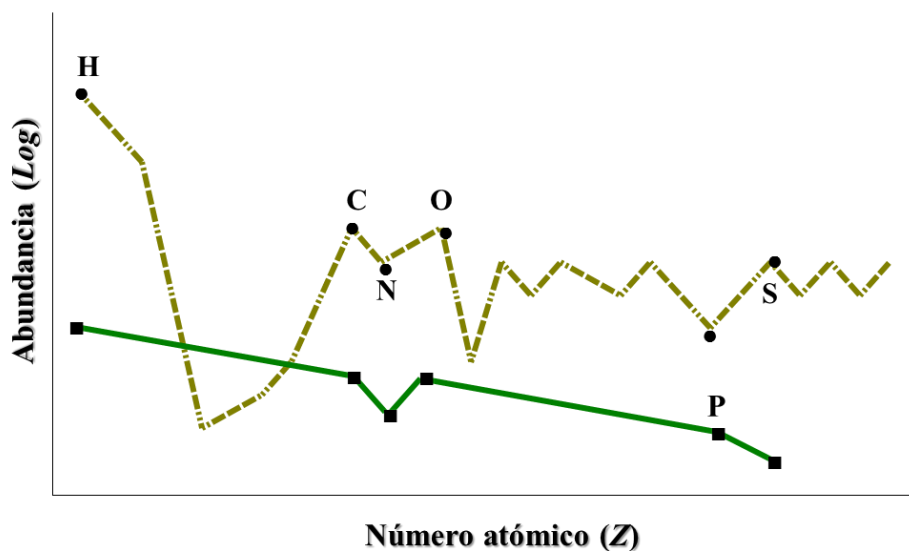


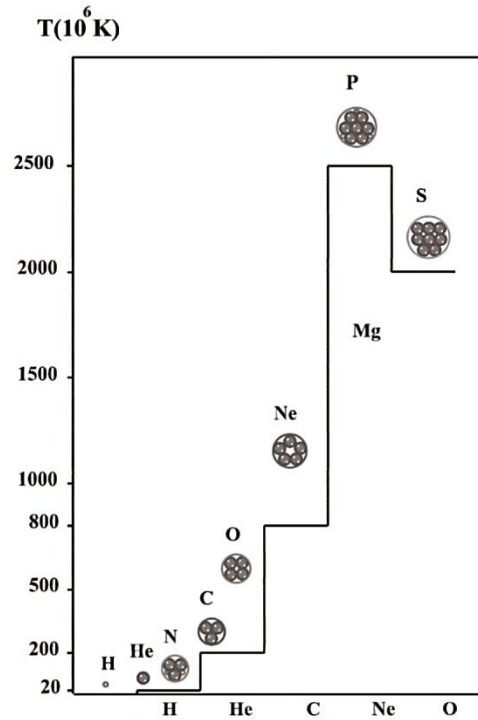
Figura 2. Análisis comparativo de la abundancia de los elementos biogénicos entre el Sistema Solar (*Cosmic reference standard*) (●) y la biomasa de un modelo biológico (lavadura) (■). La abundancia está en escala logarítmica (Log); los elementos están organizados por su número atómico (Tomado y modificado de Maciá, 2005; *The Royal Society of Chemistry*).

### *La dinámica química del fósforo y su importancia biológica*

La disponibilidad limitada del fósforo se debe a las condiciones extremas que se requieren para que se origine a partir de la fusión nuclear elemental ( $2-3 \times 10^9$  K,  $^{31}\text{P}$ ); condiciones que han sido observadas en un número muy reducido de estrellas y, al ser liberado, interacciona con otros elementos formando una diversos compuestos químicos (Figura 3) (Maciá, 2005; Pasek, 2008). Esta capacidad de interacción está asociada a sus propiedades intrínsecas; permitiéndole ser uno de los elementos más importantes en la evolución de la vida (Schwartz, 2006; Pasek et al., 2015).

El fósforo es un elemento endógeno que no puede ser fijado de la atmósfera ya que su ciclo no implica una fase gaseosa, siendo un factor que limita la productividad de los ecosistemas (Jones, 2002; Lampert and Sommer, 2007; Paytan and McLaughlin, 2007). La Tierra cuenta con dos fuentes principales de este elemento, una almacenada en la corteza terrestre (geológico) y otra (biológica) que está recirculando en los ecosistemas (Yamagata et al., 1991; Pasek, 2008). La fuente biológica de fósforo está formada por diferentes compuestos presentes en los seres vivos, en partículas suspendidas y en sedimentos (Paytan and McLaughlin, 2007; Pasek et al., 2015).

A



B

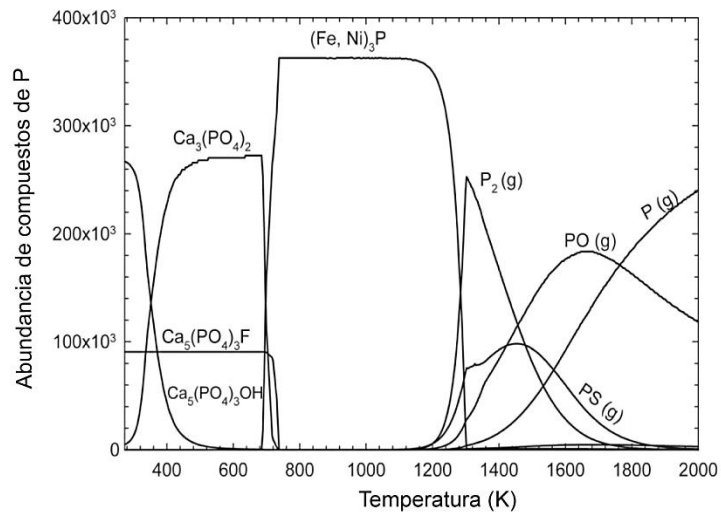


Figura 3. A) Síntesis elemental en núcleos de cuerpos estelares. Los procesos de nucleosíntesis de fósforo requieren elevadas temperaturas que pueden ser alcanzadas en número limitado de estrellas. B) Diversidad y abundancia de compuestos químicos del fósforo asociados a su temperatura de formación (Tomado de Maciá, 2005 y Pasek, 2008, respectivamente).



Para estimar la concentración total de fósforo en un ecosistema, se pueden cuantificar dos fracciones:

I. **Particulada:**

- a. *Componentes celulares:* ácidos nucleicos (DNA, RNA), nucleótidos (ADP, ATP, GDP, etc.), ésteres de bajo peso molecular (enzimas, vitaminas, etc).
- b. *Formas minerales:* hidroxiapatita ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ ), fluorapatita ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ ) y francolita ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_2.5(\text{CO}_3)_{0.5}\text{F}$ ).
- c. *Compuestos orgánicos.*

II. **Disuelta:**

- a. *Ortofosfatos* ( $\text{PO}_4^{3-}$ ).
- b. *Polifosfatos.*
- c. *Colides orgánicos.*

La fracción de fósforo particulado está constituida por compuestos orgánicos que están asociados a los seres vivos y a productos relacionados con su degradación; mientras, que la fracción de fósforo disuelto está constituida por compuestos inorgánicos, principalmente (Wetzel, 2001; Lampert and Sommer, 2007; Schwartz, 2006; Pasek, 2008).

En ecosistemas acuáticos, el 90% del fósforo orgánico se encuentra en componentes celulares y la principal fracción de fósforo inorgánico está en forma de ortofosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). Bajo condiciones anaerobias, el ortofosfato es reducido por acción enzimática a un compuesto volátil, denominado fosfina ( $\text{PH}_3$ ). La fosfina es un compuesto que reacciona fácilmente con el oxígeno; razón por la cual, no ha sido encontrado en agua y sedimentos de cuerpos acuáticos epicontinentales (Paytan and McLaughlin, 2007). En estos ecosistemas, la concentración total de fósforo se encuentra en un intervalo que va de  $<1\mu\text{g}$  a  $>200\text{mg L}^{-1}$  y, en aguas superficiales que no han sido impactadas por algún tipo de fertilizante, su concentración va de 10 a  $50\mu\text{g L}^{-1}$  (Jones, 2002; Paytan and McLaughlin, 2007). La amplia variación observada en sus valores de concentración puede estar relacionada con las características geológicas y con las actividades productivas del ecosistema. De acuerdo a estas estimaciones, cerca del 70% del fósforo orgánico total está en forma de materia orgánica particulada y el resto está

disuelto o en forma de coloides. Otras fracciones (pirofosfato, trifosfato y polifosfato) pueden formar complejos (quelatos) y sales insolubles con varios iones metálicos; que dependen de la concentración relativa de fosfatos, de la presencia de ligandos (carbonato, fluoruro, sulfato, etcétera) y del pH del sitio. Debido a que la concentración de fósforo generalmente es baja, la formación de estos complejos puede tener un efecto menor en la distribución de los iones metálicos; sin embargo, puede tener un efecto considerable en la disponibilidad del dicho elemento (Wetzel, 2001; Lampert and Sommer, 2007).

La mayor cantidad del fósforo orgánico está asociado a componentes y procesos biológicos primarios, como: el almacenamiento y transmisión de la información genética (ácidos nucleicos); precursor en la síntesis del DNA y RNA (nucleótidos); componente principal de la membrana celular (fosfolípidos); flujo de energía celular (ATP), y como constituyente estructural (fosfoproteínas), principalmente (Maciá, 2005; Schwartz, 2006; Jeyasingh and Weider, 2007). Por lo que, debido a la importancia estructural y funcional del fósforo, se ha observado que su disponibilidad puede tener efectos importantes en la adecuación de los seres vivos (p. eje. en diferentes grupos bacterianos) (Elser et al., 2000; Jeyasingh and Weider, 2007).

### *El fósforo y el efecto de su disponibilidad en bacterias*

Debido a sus características y propiedades celulares, los procariontes son considerados la primera forma de vida de nuestro planeta (Horneck, 1995; Des Marais and Walter, 1999; Kooning and Wolf, 2012). En dicho grupo celular, se encuentran bacterias pertenecientes a los Dominios Bacteria y Arquea (Figura 4) (Pace, 1997; Allers and Mevarech, 2005; Delsuc et al., 2005). Estos seres vivos son esenciales en todos los ciclos biogeoquímicos, y son considerados los más abundantes y diversos, genética y metabólicamente (Whitman et al., 1998; Oren, 2004; Tañase et al., 2010). Su capacidad de resistir los cambios ambientales les ha permitido sobrevivir y reproducirse de la misma forma por cerca de 4 mil millones de años; por lo que, se ha sugerido que su éxito evolutivo puede ser explicado por la dinámica y variabilidad de sus genomas (Gregory and DeSalle, 2005).

Las bacterias son los seres vivos más abundantes en los ecosistemas acuáticos ( $10^6$  células  $\text{ml}^{-1}$ , aprox.) (Oren, 2004). Bajo condiciones naturales, la mayoría de estos

ecosistemas se caracterizan por tener una baja concentración de fósforo, condición ambiental conocida como oligotrofia (Wetzel, 2001; Lampert and Sommer, 2007). Esta condición ha generado un impacto considerable en la distribución y estructuración de las comunidades microbianas (Dyhrman et al., 2007; Souza et al., 2008; Lauro et al., 2009). Por esta razón, la oligotrofia de estos ecosistemas ha sido considerada como una de las presiones ambientales que ha dirigido la evolución de las bacterias que los habitan (Johnson et al., 2006; Martiny et al., 2009; Luo et al., 2011).

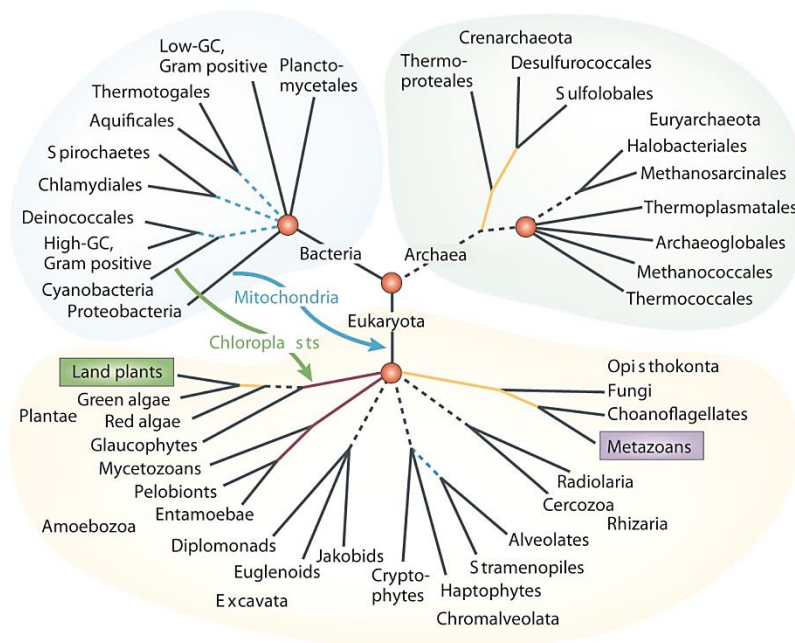


Figura 4. Los tres Dominios de la vida. Análisis filogenético realizado con genomas disponibles de diferentes organismos pertenecientes a los tres Dominios; en el cual, se muestra la relación evolutiva que existe entre estos. Se resaltan los eventos probables de transferencia horizontal genética que se han descrito experimentalmente (Tomado de Delsuc et al., 2005).

Durante el ciclo del fósforo, las diferentes formas orgánicas e inorgánicas en las que se encuentra dicho elemento son transformadas por la diversidad microbiana presente en los ecosistemas (Figura 5) (Dyrman et al., 2007). La principal fuente de fósforo que es utilizada por las bacterias se encuentra en el **detritus orgánico** (fósforo particulado); sin embargo, si el detritus es pobre en fósforo, las bacterias pueden extraerlo de la fracción inorgánica que esta disuelta en el agua.

Las bacterias tienen un papel importante en la liberación del fósforo almacenado en la corteza terrestre; por medio de la mineralización y disolución con ácidos orgánicos que ellas producen. Sin embargo, el papel más importante de la microbiota está ligado con la transformación del fósforo biológicamente activo. En comparación con el ciclo microbiano del nitrógeno o del azufre, en el fósforo no se llevan a cabo reacciones de oxidación o reducción, ya que permanece asociado con el oxígeno en forma de ortofosfato. Por otro lado, el ciclo del fósforo es uno de los menos complejos, dado que su estado de oxidación permanece constante a lo largo de su biotransformación (p. eje.  $P^{+5}$ ) (Jones, 2002; Paytan and McLaughlin, 2007).

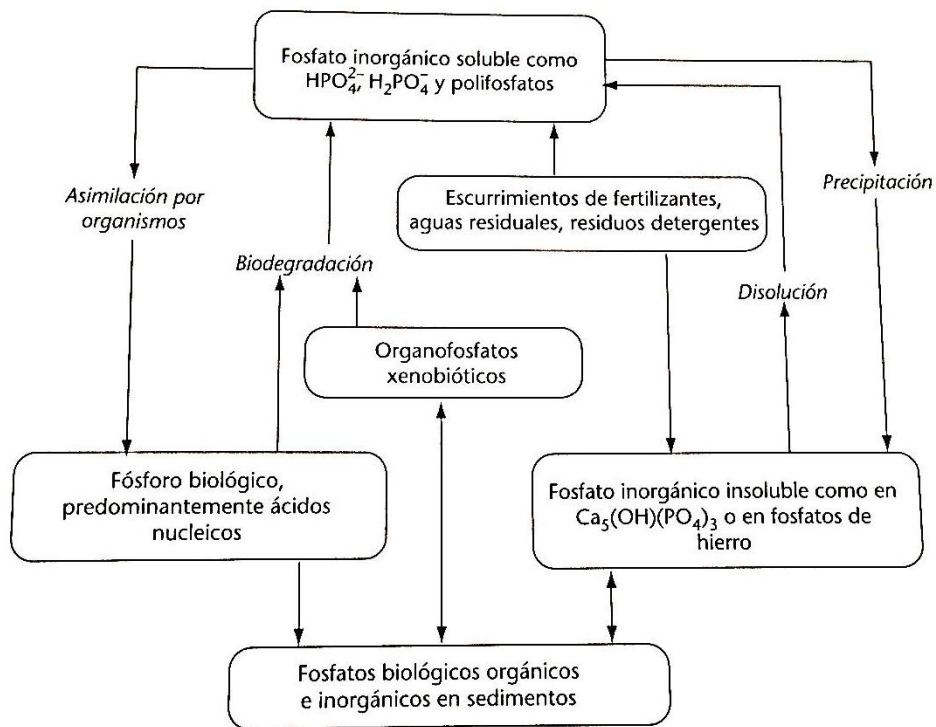


Figura 5. Ciclo del fósforo (P) (Tomado de Manahan, 2009).

Diferentes grupos de investigación han analizado los procesos bacterianos involucrados en cada uno de los pasos del ciclo del fósforo (Sterner and Elser, 2002; Dyhrman et al., 2007; Jeyasingh and Weider, 2007); sin embargo, en los últimos años, se ha puesto mayor interés en el análisis de los mecanismos de adaptación a la variación en la disponibilidad de este elemento en los diferentes ambientes a lo largo del tiempo. Particularmente, el análisis de las adaptaciones que han desarrollado las bacterias que habitan ecosistemas acuáticos oligotróficos; ya que esta condición ambiental ha sido considerada como la presión ambiental que ha dirigido su evolución en estos ecosistemas (Dyhrman et al., 2007; Souza et al., 2008; Lauro et al., 2009).

Las principales adaptaciones que disminuyen la demanda celular de fósforo en bacterias que habitan ecosistemas acuáticos oligotróficos, son las siguientes:

a. **Disminución del contenido de material genético:**

El **genoma** se define como la cantidad total de material genético que está contenido en cualquier tipo de célula (Gregory and DeSalle, 2005). Análisis comparativos a nivel genómico han mostrado importantes variaciones en su composición y organización a nivel intra- e interespecífico (Hudges, 2000; Gregory and DeSalle, 2005).

Las bacterias se caracterizan por tener genomas pequeños que van de los 490 Kb a 9 Mb, aproximadamente, y que presentan una densidad alta de genes funcionales (Gürtler and Mayall, 2001). Sin embargo, análisis genómicos han mostrado que la transferencia horizontal y la duplicación genética son procesos que están relacionados con su evolución (Hudges, 2000; Daubin et al., 2003). La explicación a esta dinámica es que la Selección Natural ha favorecido la eliminación de material genético que está duplicado o que no es funcional; lo cual, mantiene los genomas pequeños y asegura su cabida en el espacio intracelular (Gregory and DeSalle, 2005). Este proceso es conocido como **erosión del genoma** (Figura 6); el cual, ha sido estudiado ampliamente en bacterias simbiotes, que se caracterizan por la pérdida de una gran cantidad de material genético durante el proceso de especialización con su hospedero (Mira et al., 2001; Ochman and Davalos, 2006; Ochman et al., 2007). Sin embargo, este proceso de reducción ha sido observado en bacterias ambientales que habitan ecosistemas oligotróficos, siendo un mecanismo de respuesta a la disponibilidad limitada de fósforo que caracteriza a dichos ecosistemas (Alcaraz et al., 2008; Luo et al., 2011). Por esta razón, se ha sugerido que la variación en el contenido de material genético en los

genomas bacterianos es un mecanismo que les permite sobrellevar los cambios que ocurre en las condiciones ambientales de su ecosistema (Green et al., 2008).

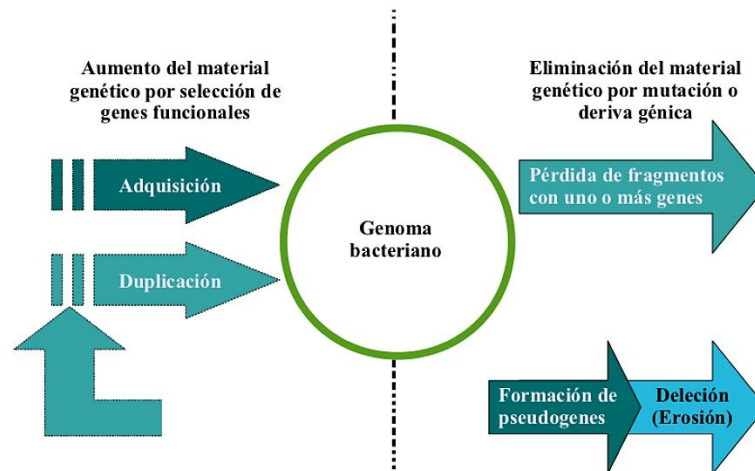


Figura 6. Evolución del genoma bacteriano. El material genético se incrementa por efecto de la transferencia horizontal y duplicación genética; sin embargo, la eliminación de material genético puede ocurrir a través de la eliminación de fragmentos que contienen uno o varios genes, o a través de la formación de genes disfuncionales (pseudogenes) que, posteriormente, son erosionados (Tomado de Mira et al., 2001).

Uno de los grupos bacterianos que presentan reducción en la cantidad de material genético en respuesta a la disponibilidad de fósforo ambiental, son las Cianobacterias; que se caracterizan por tener genomas muy pequeños (1.66-3.00 Mb, aprox.) (Dufresne et al., 2005; Luo et al., 2011). Por lo que, un genoma pequeño les permite disminuir considerablemente la demanda de fósforo que tienen que invertir para la replicación de su genoma; adaptándose mejor a las condiciones ambientales, como ha sido observado en cepas de *Prochlorococcus marinus* (Martiny et al., 2006; Van Mooy et al., 2006).

#### b. Síntesis de sulfolípidos:

De todos los componentes, la membrana citoplasmática contiene ~30% del fósforo celular total, siendo la segunda reserva de este elemento (Sternier and Elser, 2002; Jeyasingh and Weider, 2007). Las bacterias que habitan ecosistemas oligotróficos

han desarrollado mecanismos que economizan la demanda de fósforo para su síntesis (Van Mooy et al., 2006; Dyhrman et al., 2007). Cianobacterias del género *Prochlorococcus*, además de tener genomas pequeños, tienen una membrana compuesta por sulfolípidos y glicolípidos. Estos lípidos se caracterizan por tener en la parte polar un grupo sulfato ( $\text{SO}_4^{3-}$ ) o una azúcar, en lugar de un grupo fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). El principal sulfolípidos y glicolípidos en estas cianobacterias son el sulfoquinovosildiacilglicerol (SQDG) y el mono- o digalactosildiacilglicerol, respectivamente. Estos lípidos conforman el 94% de su membrana y son biológicamente equivalentes. Esta respuesta fue también identificada en otras cianobacterias de los géneros *Synechococcus*, *Crocospaera* y *Trichodesmium* (Van Mooy et al., 2006, 2009). Así también, en secuencias ambientales procedentes del mar de Sargazos, este gen *sqdB* para la síntesis de sulfolípidos se encontró asociado a diferentes picocianobacterias (Obernosterer et al., 2003; Van Mooy et al., 2006). Los trabajos anteriores, sugieren que la vía de síntesis de sulfolípidos fue un evento evolutivo que ocurrió en una etapa temprana en la historia de la Tierra. Sin embargo, no se ha identificado al linaje bacteriano en el que desarrollo esta innovación. Hasta el momento, dado que el gen *sqdB* se encuentra en cuatro de los siete linajes de cianobacterias, se ha planteado la hipótesis de un posible evento de radiación evolutiva de estos microorganismos permitiéndoles dominar la producción del carbono en estos ecosistemas, impactando de forma considerable la dinámica de los demás ciclos biogeoquímicos del océano (Sato, 2004; Van Mooy et al., 2006).

c. Adquisición y regulación de genes para metabolismo de fósforo:

A pesar de que la adquisición de material genético es uno de los dos procesos más importantes en la evolución de los genomas bacterianos, estos genes no siempre son mantenidos y en la mayoría de los casos son eliminados (Ochman and Davalos, 2006). Esto ha sido analizado a mayor escala comparando la dinámica de diferentes genomas bacterianos, mostrando que el número de **deleciones** es mayor en comparación al número de inserciones (Mira et al., 2001); por esta razón, se ha sugerido los genes que contribuyen menos en su adecuación son más susceptibles a ser eliminados. En bacterias que habitan ecosistemas acuáticos, se ha observado la presencia de diferentes genes adquiridos que les permiten disminuir la presión generada por la limitación de fósforo. Estos genes participan en la adquisición, metabolismo y regulación de diferentes compuestos químicos de fósforo; permitiéndole el aumento de

su adecuación (Johnson et al., 2006; Dyhrman et al., 2007).

La adquisición y eliminación de genes es un mecanismo acoplado que tiene efectos importantes en la regulación de la expresión bacteriana, generando cambios en la redes de interacción genética (Ochman et al., 2007; Wellner et al., 2007). Este es el caso del gen *pstS* que codifica a una proteína periplásmica que participa en la adquisición de fósforo, cuya expresión es inducida bajo condiciones limitantes de este elemento (Moore et al., 2005; Martiny et al., 2006). Así también, se ha observado que cianobacterias pertenecientes a un mismo grupo filogenético pueden tener diferente número y tipos de genes involucrados en la adquisición de fósforo dependiendo la región geográfica en la que habitan (Martiny et al., 2006, 2009). Por esta razón se ha considerado que la disponibilidad geográfica del fósforo puede controlar la abundancia de los genes para su adquisición.

Los análisis filogenéticos realizados tradicionalmente con el gen de rRNA 16S en cianobacterias del género *Prochlorococcus* no concuerdan con el agrupamiento en relación al contenido de material genético en su genoma. Esta incongruencia se ha relacionado con la disponibilidad de nutrientes en su sitio de aislamiento; sin embargo, es probable que otros factores estén influyendo, como la acción de bacteriófagos, el intercambio (*crossstalk*) entre circuitos de regulación y el efecto de otros factores ambientales (luz y temperatura). Por lo que, se ha sugerido que la adquisición y eliminación de genes es una estrategia ecológica que ha permitido a las cianobacterias adaptarse a la limitada disponibilidad de fósforo ambiental. Este mecanismo ha influido en el contenido de su material genético y ha complicado el análisis de su historia filogenética (Daubin et al., 2003; Kettler et al., 2007; Martiny et al., 2009).



## **ANTECEDENTES**

### *La ecología microbiana y los caracteres funcionales*

La ecología microbiana ha puesto un gran interés en la identificación de los componentes genéticos que están relacionados con la adaptación de las bacterias a diferentes condiciones ambientales (Arber, 2000; Martiny et al., 2013). Históricamente, la ecología analizaba a los organismos como una unidad que permitiría la comprensión de su proceso evolutivo. Sin embargo, en los últimos años, el análisis de **caracteres funcionales** (a nivel genético) relacionados con la adecuación biológica es considerado como el componente indicado para el estudio de la evolución (Weiher and Keddy, 1995; McGill et al., 2006; Hughes et al., 2008).

En la microbiología, estos caracteres funcionales han sido denominados como **estrategias ecológicas**; las cuales, han permitido comprender por qué una bacteria vive en un determinado ecosistema y cómo respondería a cambios en las condiciones ambientales (Green et al., 2008).

### *El número de copias del operón *rrn* como una estrategia ecológica asociada a la disponibilidad de fósforo ambiental*

Al observar el efecto que puede tener la disponibilidad de los elementos químicos sobre la evolución de los seres vivos, se ha puesto un gran interés en la descripción de los mecanismos que están involucrados en dicho proceso. El área de estudio que ha tratado de determinarlos es la **estequiometría ecológica**, que tiene como objetivo describir el efecto que tienen el balance energético y la disponibilidad de los elementos químicos en los procesos ecológicos (Elser et al., 2000; Elser, 2003). Esta área de estudio pretende unificar a la ecología ecosistémica, la biología evolutiva y la genómica funcional para explicar cómo influye la dinámica de los ciclos biogeoquímicos en el funcionamiento del ecosistema y, a su vez, en el funcionamiento de los organismos que lo habitan (Elser et al., 2003).

Dentro de la estequiometría ecológica, se encuentra la **estequiometría biológica**, que se encarga del estudio del efecto que tiene la disponibilidad de los elementos sobre el funcionamiento en los seres vivos; conectando la dinámica ecosistémica con la composición celular y genética de los organismos (Sturner and Elser, 2002). Debido a la importancia que tiene el fósforo en el funcionamiento de diferentes componentes

celulares, la estequiometría biológica ha propuesto que la disponibilidad de este elemento afecta la adecuación de los organismos; asociado a las diferentes adaptaciones que disminuyen su demanda a nivel celular (Sterner and Elser, 2002; Jeyasingh and Weider, 2007).

En 2005, Weider y colaboradores analizaron la relación que tiene la disponibilidad de fósforo ambiental en la composición genética y el crecimiento de tres especies de crustáceos planctónicos del género *Daphnia*. En dicho trabajo, describieron la dinámica de crecimiento de los crustáceos y cuantificaron la cantidad de DNA:RNA presente; considerando el efecto del número de copias de los genes ribosomales (rRNA) sobre la tasa de expresión genética. Los genes ribosomales fueron seleccionados por su importancia para la estructuración de los ribosomas; los cuales, son la maquinaria celular encargada de la síntesis de los componentes necesarios para el crecimiento y funcionamiento de todos los seres vivos. Este trabajo concluyó que existe una relación intrínseca entre la estructura genética y la disponibilidad de fósforo ambiental. Por lo que, los organismos que viven en ambientes con fósforo suficiente presentan una tasa de crecimiento alta y un mayor contenido de fósforo celular; asociado a un número elevado de genes ribosomales que mantienen una tasa de expresión elevada (Hipótesis de la Tasa de Crecimiento) (Figura 7) (Frost and Elser, 2008).

En bacterias, el número de copias del operón ribosomal (*rrn*) ha sido considerado como directamente proporcional con su tasa de crecimiento (Klappenbach et al., 2000; Stevenson and Schmidt, 2004). En análisis genómicos de bacterias que viven en ambientes oligotróficos se ha observado que, además de las adaptaciones que disminuyen la demanda celular de fósforo, tienen una o dos copias del operón *rrn* y tienen un crecimiento lento (Sterhl et al., 1999; Lauro et al., 2009). Por lo que, sea sugerido que en este tipo de ambientes mantener un número elevado de copias del operón podría representar un costo competitivo debido al papel que tiene dicho elemento en la duplicación de los ácidos nucleicos y en la síntesis de los componentes celulares (Maciá, 2005; Jeyasingh and Weider, 2007).

Ecológicamente, este tipo de análisis sugieren que el número de copias del operón *rrn* está ligado con la adaptación de las bacterias a cambios en las condiciones ambientales (Codon et al., 1995; Prüß et al., 1999; Green et al., 2008). Por esta razón, se ha considerado al operón como el marcador genético con el que se puede observar los efectos generados por la disponibilidad de fósforo ambiental (Elser, 2003; Weider et al.,

2005; Jeyasingh and Weider, 2007); ya que un número reducido de copias del operón les permitiría responder eficientemente a la disponibilidad limitada de recursos que caracteriza a los ecosistemas oligotróficos (Shrestha et al., 2007; Green et al., 2008).

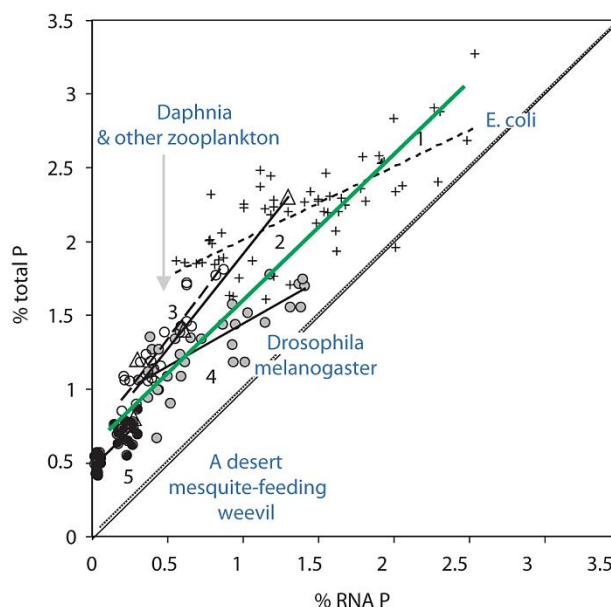


Figura 7. Hipótesis de la Tasa de Crecimiento. La variación del contenido de fósforo celular (%P-total en peso seco; eje Y) está correlacionada con el contenido de RNA (eje X) a nivel intraespecífico (líneas en gris) e interespecífico (línea verde). Un alto contenido de P y de RNA está asociado a organismos con una tasa de crecimiento elevada. En promedio, el RNA contribuye con el 50% del contenido total de P, aproximadamente (Tomado de Frost and Elser, 2008).

### *La oligotrofia extrema del Valle de Cuatro Ciénegas y su efecto sobre la evolución bacteriana*

El Valle de Cuatro Ciénegas (VCC) es un sistema hidrológico ubicado en la región noreste del desierto Chihuahuense; el cual, está compuesto por 300 pozas y manantiales, aproximadamente (Souza et al., 2006). El VCC es un oasis que alberga una gran diversidad bacteriana que vive bajo condiciones extremas de oligotrofia ( $<1 \mu\text{mol PO}_4^{3-}$ ) (Figura 8) (Peimbert et al., 2012; Souza et al., 2012).

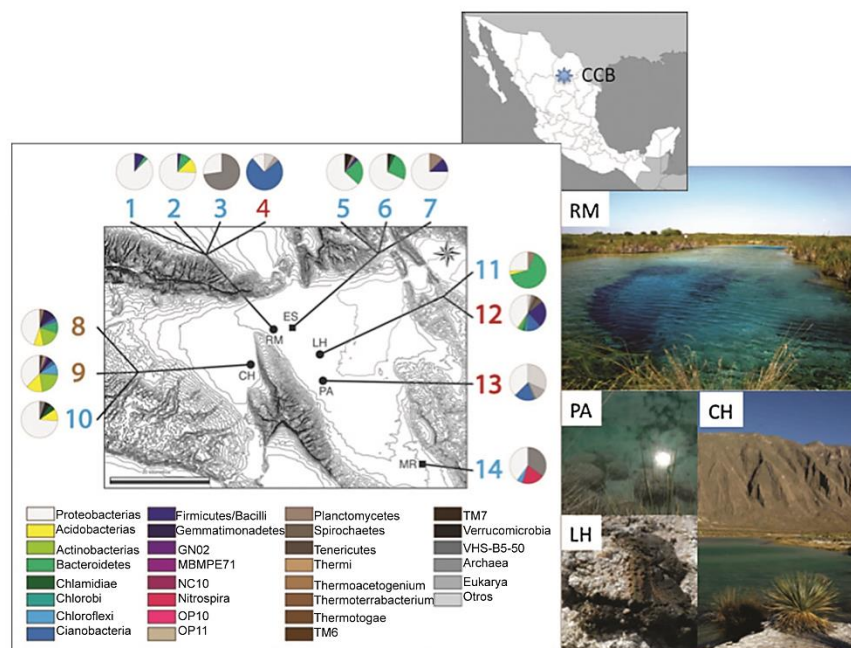


Figura 8. La diversidad microbiana presente en el sistema hidrológico del Valle de Cuatro Ciénegas en el desierto chihuahuense. El mapa de la parte superior muestra la ubicación del Valle (CCB = Cuatro Ciénegas Basin). Los grupos taxonómicos fueron identificados a través de la extracción de DNA ambiental y la amplificación del gen 16S rRNA. Los números representan las diferentes muestras de cada sitio: CH (Churince), RM (Río Mesquites), ES (Escobedo), LH (Los Hundidos, Poza Roja), PA (Pozas Azules), MR (Minas, muestra tomada 600m debajo de la superficie) (Tomado de Souza et al., 2012).

Análisis descriptivos de esta diversidad han mostrado que cerca del 50% de estas bacterias están estrechamente relacionados con comunidades microbianas que habitan en los mares actuales (Souza et al., 2012); a pesar de que la composición química del agua de este sistema presenta una concentración considerable de carbonatos y sulfatos (Souza et al., 2006; Escalante et al., 2008).

A lo largo de 15 años de investigación han sido identificados un gran número de aislados que se encuentran relacionados genéticamente con el género *Bacillus*; siendo uno de los grupos bacterianos más abundantes dentro de la diversidad del VCC (Souza et al., 2006; Cerritos et al., 2011; Alcaraz et al., 2008, 2010; Pérez-Gutiérrez et al., 2013). De este género, fue identificada una especie endémica moderadamente halófila aislada de una laguna en desecación, *B. coahuilensis* m4-4 (CECT 7197) (Cerritos et al., 2008, 2011). Este bacilo de vida libre presenta el genoma más pequeño que ha sido reportado dentro del género, reflejando una posible adaptación de una bacteria marina

ancestral a un nuevo ambiente; además, este bacilo tiene las mismas adaptaciones que caracterizan a bacterias que habitan otros ambientes limitados por fósforo, como genes adquiridos para la utilización eficiente del fósforo y para la producción de sulfolípidos en su membrana celular (Figura 9) (Alcaraz et al., 2008; Moreno-Letelier et al., 2011). Por esta razón, la concentración de fósforo en este Valle ha sido considerada como la principal presión selectiva que ha influido en la evolución y especiación de las bacterias que lo habitan (Souza et al., 2008, 2012).

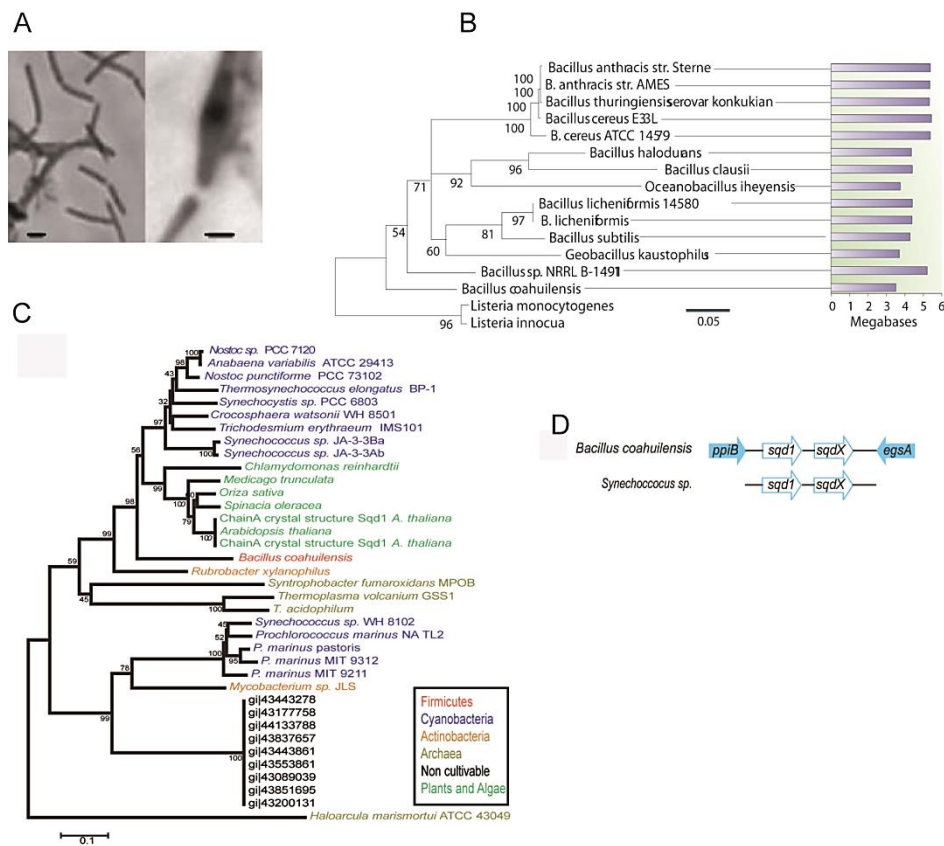


Figura 9. Adaptaciones a la oligotrofia extrema del Valle de Cuatro Ciénegas descritas en la especie endémica *Bacillus coahuilensis* m4-4: A) células vegetativas (izquierda) y espora de *B. coahuilensis* m4-4 (derecha); B) análisis filogenético realizado con el total de genes presentes en genomas de *Bacillus* spp., donde se observa la divergencia de *B. coahuilensis* y el tamaño de su genoma; C) árbol filogenético que describe la relación del gen *sulfoquinovosa sintetasa* (SQD1) que codifica para la síntesis de sulfolípidos; D) organización del operón que codifica para la síntesis de sulfolípidos; la cual, es idéntica a la observada en *Synechococcus* sp. (Tomado de Alcaraz et al., 2008; Cerritos et al., 2008; Souza et al., 2008).

## JUSTIFICACIÓN

El género *Bacillus* se caracteriza por la formación de esporas, otorgándole la versatilidad ecológica de dispersarse y tolerar las condiciones de estrés presentes en nuevos ambientes (Feldgarden et al., 2003; Conor et al., 2010). Este género se caracteriza por tener un número elevado de copias del operón *rrn* (6-15 copias; *rrnDB*, Stoddard et al., 2015); experimentalmente, se observó que este número de copias está estrechamente relacionado con la formación y germinación de sus esporas (Nanamiya et al., 2010; Yano et al., 2013). Trabajos anteriores han cuantificado el número de copias del operón *rrn* en algunos aislados ambientales de este género (Klappenbach et al., 2000; Shrestha et al., 2007; Viera-Silva and Rocha, 2010). Sin embargo, nunca se ha realizado la cuantificación del operón en diferentes individuos de *Bacillus* pertenecientes a una comunidad bacteriana y, mucho menos, bajo condiciones limitadas de nutrientes.

Por lo que, el análisis del número de copias del operón *rrn* en aislados de *Bacillus* obtenidos del Valle de Cuatro Ciénegas mostraría si dicho número de copias representa una presión selectiva por efecto de la oligotrofia de este ecosistema. Siendo el primer estudio en tratar de analizar la estequiometría biológica entre diferentes miembros del género *Bacillus* que coexisten en el mismo hábitat, conectando el número de copias del operón que contienen en su genoma con la disponibilidad de fósforo ambiental.

## **OBJETIVO GENERAL**

Analizar el efecto de la oligotrofia sobre el número de copias del operón *rrn* y en la dinámica de crecimiento del género *Bacillus* en el sistema hidrológico del Valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

i. Identificar y agrupar a los aislados relacionados con el género *Bacillus* obtenidos de diferentes sitios del VCC.

ii. Cuantificar el número de copias del operón *rrn* en los aislados de *Bacillus* del VCC como una estrategia ecológica asociada a la disponibilidad de fósforo ambiental.

iii. Describir la dinámica de crecimiento en los genotipos con diferente número de copias del operón *rrn* para describir las implicaciones fisiológicas relacionadas con la oligotrofia del VCC.

iv. Determinar la composición elemental de los genotipos con diferente número de copias del operón *rrn* durante la fase exponencial de crecimiento para describir el efecto de la oligotrofia sobre la estequiometría celular.

v. Cuantificar el contenido de proteínas totales de los genotipos con diferente número de copias del operón *rrn* para observar la variación de la expresión genética durante la dinámica de crecimiento.

## MÉTODOS

### *Selección de los aislados del género Bacillus obtenidos en el Valle de Cuatro Ciénegas*

En los 15 años de investigación realizada en el VCC se han aislado una gran cantidad de aislados relacionados genéticamente con el género *Bacillus*. Estos aislados forman parte de un gran cepario que mantienen el Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental del Instituto de Ecología, UNAM, y por el Laboratorio de Bacteriología Molecular del CINVESTAV, Unidad Irapuato.

Los aislados seleccionados en el presente estudio pertenecen a tres de los principales sitios de estudio del VCC (Figura 10A): *i*) el sistema Churince, conformado por un manantial del que surge agua que fluye a través de un río hasta llegar a una poza intermedia, que se conecta a una laguna de desecación (Figura 10B); *ii*) el Río Mesquites, que es un sistema estable formado por un río que presenta conexiones laterales con diversas pozas de desecación, y que se caracteriza por presentar un gran desbalance en la proporción de nutrientes [C:N:P, 900:150:1; Souza et al., 2012] (Figura 10C); y *iii*) las Pozas Rojas, ubicadas en el Valle de los Hundidos, conformadas por un lago poco profundo que está rodeado por aproximadamente 12 pozas temporales que se caracterizan por presentar fluctuaciones considerables en su salinidad y temperatura (Figura 10D).

De dicha colección se seleccionaron 71 aislados que fueron clasificados de acuerdo al sitio y tipo de muestra del que fueron aislados (agua, raíz o sedimento). De los cuales, 67 aislados pertenecen al sistema Churince, un aislado al Río Mesquites y tres aislados a las Pozas Rojas.

### *Identificación y agrupamiento de los aislados del género Bacillus*

Para obtener la biomasa necesaria para la extracción de DNA, cada aislado se creció en agar Marino (*Difco*<sup>TM</sup> 2216, *BD & Co*), que es el medio estándar utilizado en su aislamiento de las muestras colectadas en el VCC. La extracción de DNA se realizó con el kit *QIAmp*<sup>®</sup> *DNA Mini Kit* (USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la identificación de los aislados, se amplificó la región hipervariante-5' (HV) del gen 16S de rDNA que tiene una longitud de 275 pares de base (pb), y que se encuentra en la posición 70 a 344 de dicho gen (Goto et al., 2000). Esta región HV-5' ha sido utilizada por su gran nivel de conservación nucleotídica, que permite un



agrupamiento específico entre las diferentes especies pertenecientes al género *Bacillus*. Los productos obtenidos de la amplificación por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) fueron confirmados a través de su electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, seguido de su tinción con bromuro de etidio (EtBr). La secuenciación de los productos de amplificación de la región HV-5' fue realizada en el *High Throughput Genomics Center* (htSEQ) (Universidad de Washington, USA). Posteriormente, las secuencias de la región HV-5' fueron comparadas en el *GenBank* utilizando BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*; NCBI): *Standard Nucleotide BLAST, blastn suite*; Database: *Nucleotide collection (nr/nt)*; Query subrange: *1 to 275*; Program selection: *Highly similar sequences*.

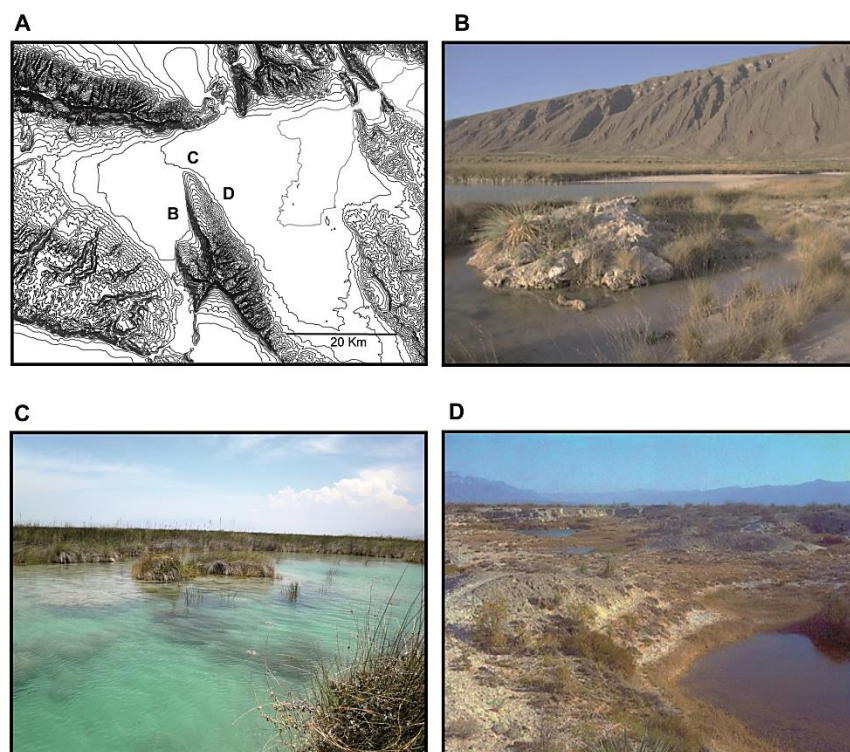


Figura 10. Sitios de muestreo en el Valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila. A) Ubicación de los sitios de origen de los aislados seleccionados en el presente estudio; B) sistema Churince; C) Río Mesquites; D) Pozas Rojas.

Finalmente, las secuencias fueron alineadas con CLUSTAL W (Thompson et al., 2002), y se construyó un árbol filogenético de máxima verosimilitud con un *bootstrap* de 1000 repeticiones con el programa MEGA5 (Tamura et al., 2011). Las secuencias de la región HV-5' de los *Bacillus* del VCC fueron registradas en el *GenBank* con los números de acceso: KT781592-KT781661.

#### *Cuantificación del número de copias del operón ribosomal (rrn)*

##### a) Mapa genómico de los aislados de *Bacillus* con la enzima de restricción I-*CeuI*

La enzima de restricción I-*CeuI* (*New England Biolabs*) reconoce una región de 26pb ubicada en la posición 1911 a 1936 del gen 23S de rRNA. El número de fragmentos obtenidos con esta enzima representan el número de operones ribosomales (*rrn*) en el genoma bacteriano. Por lo que, para la construcción del mapa genómico de los aislados de *Bacillus* del VCC se utilizó la técnica de electroforesis en gel por campos pulsados (PFGE), previa digestión del DNA con la enzima I-*CeuI*. Como marcadores de peso molecular, se utilizó el mapa genómico de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2 con I-*CeuI* debido a que el tamaño de los fragmentos ha sido previamente caracterizado (Liu et al., 1993), y el marcador de 0.1-200kb *Sigma Plus Marker*.

##### b) Preparación y digestión del DNA genómico de los aislados de *Bacillus*

Los aislados de *Bacillus* del VCC se crecieron en medio Marino (*Difco*<sup>TM</sup> 2216, *BD & Co*) en agitación (200 rpm) a 35°C por 12h (*overnight*). El DNA genómico de los aislados fue procesado en bloques de agarosa siguiendo los métodos de Nakasone et al., (2000) y Delgado et al., (2013). El DNA contenido en los bloques de agarosa fue purificado a través de dos procesos de incubación con Proteinasa K (12h a 37°C). Posteriormente, los bloques de agarosa fueron pre-incubados en 1X NEBuffer 4 (*New England Biolabs*) por 30min a 4°C. Finalmente, la digestión del DNA genómico se realizó con 100µl de 1X NEBuffer 4 con 15U de la enzima I-*CeuI*, en una incubación *overnight* a 37°C.

##### c) Electroforesis en gel por campos pulsados (PFGE) y transferencia de los fragmentos de DNA

Los fragmentos de DNA generados con la digestión de I-*CeuI* fueron separados con el sistema de electroforesis CHEF-DR II (*Bio-Rad*). Esta electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1% (*Seakem Gold agarose, BioWhittaker Molecular Applications*)

en buffer TBE 0.5X (*Bio-Rad*) a 11°C. Las condiciones de electroforesis se dividieron en dos fases para separar los fragmentos de diferente tamaño: Fase 1, tiempo del pulso de 6.75s a 2min por 20h a 4V cm<sup>-1</sup> y Fase 2, tiempo del pulso de 0.22s a 5.10min por 15h a 6V cm<sup>-1</sup>.

Finalizada la electroforesis, los geles se irradiaron con luz UV por 1min (*UV Crosslinker, UVP*) para fijar los fragmentos de DNA. Los geles fueron lavados en una solución HCl a 250mM por 15min con agitación moderada. Posteriormente, se realizó un lavado con un buffer de desnaturalización (1.5M NaCl, 0.5M NaOH) por 2h y, finalmente, los geles se lavaron en buffer de neutralización (0.5M Tris/HCl, 1.5M NaCl; pH 8.0) por 2h más. Los fragmentos de DNA fijados en los geles fueron transferidos a una membrana de nilón (*N+nylon, Amersham Biosciences*) por medio de *Southern blotting* (Sambrook et al., 1989). Finalmente, la membrana fue irradiada con luz UV para fijar el DNA transferido (1min; *UV Crosslinker, UVP*).

d) Preparación de las sondas de DNA para el análisis de hibridación

Los perfiles de los operones *rrn* de los aislados de *Bacillus* fueron confirmados en las membranas de nilón a través de la hibridación de regiones internas de los genes 16S (*rrs*) y 23S (*rri*) ribosomales. Para el análisis con el gen *rrs*, se utilizó la región HV-5' usada en el agrupamiento de los aislados; por lo que, se usaron los mismos *primers* y condiciones de amplificación por PCR (Goto et al., 2000).

Para la región interna del gen *rri* se diseñaron *primers* para amplificar un fragmento de 413pb que se encuentra en la posición 2283 a 2696 (23S<sub>3</sub>) del operón *rrn*. Los *primers* utilizados fueron: *forward* F23S<sub>3</sub> 5'-ACG GAG GCG CCC AAA GGT T-3 y *reverse* R23S<sub>3</sub> 5'-CCA GCG GTG CGT CCA TCC-3'; los cuales, fueron diseñados a través del análisis de los genomas secuenciados de *Bacillus* con el programa *Primer Select program* de *DNASTAR Lasergene 7 package* (*DNASTAR, Inc., Madison, WI*). Las condiciones de amplificación (PCR) fueron las siguientes: 95°C por 5min para la desnaturalización inicial del DNA; seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 40s, alineamiento a 60°C por 40s y una extensión a 72°C por 1min; finalmente, una extensión a 72°C por 5min (*Gene Amp, PCR System 9700*). La presencia y tamaño de los productos de amplificación fueron confirmados a través de su electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, seguido de su tinción con bromuro de etidio (EtBr).

Para ambas regiones fue utilizado el DNA de la cepa tipo *Bacillus horikoshii* ATCC700161 como templado. Posteriormente, los productos de PCR de ambas regiones fueron purificados con el kit *PCR Clean-up Gel Extraction Kit* (*Macherey-Nagel*

*products*), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para el marcaje de los productos de PCR (*DIG-labelled*) y obtención de las sondas de hibridación, se utilizó el método del kit del *DIG High Prime DNA Labelling system* (Roche).

Una vez obtenidas las sondas, las membranas de nilón que contenían los fragmentos de DNA transferidos fueron incubadas con 10ml de solución de hibridación (*DIG Easy Hyb buffer*), a una temperatura de 58°C con agitación suave y constante por 1h. Posteriormente, la sonda fue diluida en solución de hibridación para ser agregada a la membrana por 12h (*overnight*) a 58°C en agitación suave y constante. Finalmente, la membrana se expuso en una película de rayos-X después de ser lavada a alta astringencia (64°C).

Este procedimiento se realizó con cada una de las sondas de hibridación y de esta manera, confirmar el número de copias del operón *rrn* de los aislados de *Bacillus* del VCC.

#### *Determinación de los parámetros de crecimiento*

De todos los aislados analizados, se eligieron genotipos de *Bacillus* con diferente número de copias del operón *rrn* para la descripción de su dinámica de crecimiento. Antes de la determinación de los parámetros de crecimiento, los aislados seleccionados se crecieron en medio marino (*Difco<sup>TM</sup> 2216, BD & Co*) por 24h para la homogenización de sus condiciones metabólicas. Los cultivos fueron incubados a 35°C, que es la temperatura máxima del agua durante el verano en el VCC (Pérez-Gutiérrez et al., 2013), a 150rpm de agitación. Posteriormente, se realizó el mismo proceso simulando las condiciones nutricionales presentes en el VCC. Para lo cual, los aislados fueron inoculados en agua estéril procedente del sistema Churince que fue suplementada con triptona (5g L<sup>-1</sup>; *Bacto<sup>TM</sup> Tryptone, BD and Company*) (denominada como *CCBwt*) y se incubaron por 12h (*overnight*) bajo las mismas condiciones de crecimiento.

Los parámetros de crecimiento fueron determinados a partir de los cultivos *overnight* en el medio *CCBwt*. Por cada aislado, se utilizaron tres matraces con 50ml de medio *CCBwt* fresco que fueron inoculados hasta alcanzar una densidad óptica de 0.05 (600nm de longitud de onda; *BioPhotometer Plus, Eppendorf*), que equivale a  $\sim 10^7$  unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro. A lo largo del experimento, se cuantificaron las UFC's con al menos siete muestras que se tomaron en un período de

12h de crecimiento; con lo cual, se lograría describir las tres fases de una curva de crecimiento bacteriano. Cada muestra de los cultivos fue diluida en solución salina (NaCl, 0.85%) para realizar el análisis de conteo en placa de UFC's.

La dinámica de crecimiento de los aislados fue determinada a través del análisis de regresión no-lineal de los datos (programa *CurveExpert Professional 2.0.3*), aplicando el modelo de crecimiento de Gompertz (Zwietering et al., 1990). Con esta curva predictiva de crecimiento se estimó la duración de la fase Lag ( $\lambda$ ; horas), la tasa de crecimiento tangencial ( $G_{tan}$ ; células/h) y, la biomasa máxima alcanzada ( $A$ ;  $\ln(UFC/UFC_{(t=0)})$ ). La tasa de crecimiento tangencial ( $G_{tan}$ ) fue definida como la tangente del punto de inflexión de la curva; es decir, donde Lag ( $\lambda$ ) es el punto de intercepción de la línea tangencial a través del punto de inflexión (donde, eje X = tiempo), y  $A$  como el valor de Y de la asíntota (donde, eje Y =  $\ln(UFC/UFC_{(t=0)})$ ). Así también, fue estimada la tasa de crecimiento específica ( $\mu_{max}$ ; h<sup>-1</sup>):

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

y, el tiempo de duplicación (generacional):

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

Donde,  $N_0$  y  $N_e$  representan la densidad celular alcanzada al inicio y al final de la fase exponencial, respectivamente. Mientras que  $t_0$  y  $t_e$  representan el tiempo (h) inicial y final de la fase exponencial, respectivamente.

#### *Contenido celular de carbono (C), nitrógeno (N) y fósforo (P) durante la fase de crecimiento exponencial*

Las muestras de biomasa para el análisis de composición elemental, fueron colectadas en la fase exponencial durante la descripción de la dinámica de crecimiento de los genotipos de *Bacillus* que fueron seleccionados. Las muestras de biomasa fueron centrifugadas para su concentración y eliminación del medio de cultivo. Para evitar la influencia de residuos, se realizaron lavados por triplicado con 250µl de agua Mili-Q®. Después de cada lavado, el sobrenadante fue concentrado por centrifugación para su eliminación. Finalmente, las muestras de biomasa fueron secadas a vacío para ser enviadas a la Universidad del Estado de Arizona (USA) para su análisis.

En contenido total de fósforo fue cuantificado con el método modificado de ácido ascórbico con digestión de persulfato (APHA, 2005). Las muestras de biomasa fueron pesadas y sometidas a tratamiento con solución de persulfato de potasio y de

ácido sulfúrico; posteriormente, fueron se introducidas al autoclave por 30min a 121°C y entre 15-20psi. Las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente para ser neutralizadas, antes de la adición del reactivo colorante. Después de 30min, se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a 880nm de longitud de onda. Las muestras fueron comparadas en triplicado con una curva patrón y con material de referencia del NIST (*National Institute of Standards and Technology, US Department of Commerce*).

El contenido total de carbono y nitrógeno fue cuantificado por combustión en un analizador elemental (*Perkin Elmer model 2400*). Las muestras fueron calcinadas a 1760°C y la detección elemental fue realizada con un detector de conductividad termal.

El contenido de los tres elementos fue determinado en porcentaje de masa seca y se expresaron como: %C, %N y %P, respectivamente; así también, se calculó la relación entre los contenidos elementales a través de las proporciones C:N y N:P.

#### *Cuantificación de la expresión proteica durante la dinámica de crecimiento*

Durante la determinación de la dinámica de crecimiento de los aislados, se colectaron muestras de biomasa en las fases Lag, exponencial y estacionaria para la cuantificación de la expresión de proteínas totales. Las muestras de biomasa fueron ajustadas a una densidad óptica de 0.3 (*BioPhotometer Plus, Eppendorf*) y se concentraron por centrifugación a 10,000 Xg por 5min a 4°C (*Sorval® fresco centrifuge*).

La extracción de proteínas se realizó con el método de SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*). Las muestras de biomasa fueron lavadas con solución PBS (*Phosphate-buffered saline*), y la extracción se realizó con la solución de 50mM de Tris-HCl (pH 8.0), 150mM de NaCl, 0.5% (w/v) de deoxicolato de sodio, 0.5% (v/v) de Triton X-100, 0.5% (v/v) de SDS, 5mM de EDTA y 1mM de fluoruro de fenilmetilsulfonil, por 30min en hielo.

Los desechos celulares fueron eliminados por centrifugación a 10,000 Xg por 5min a 4°C (*Sorval® fresco centrifuge*). Los extractos de proteínas fueron analizados por SDS-PAGE y su cuantificación se realizó con el *Protocolo de Prueba en Microplaca*, siguiendo las instrucciones del *DC Protein Assay Instruction Manual (Bio-Rad)*. Los análisis de expresión se realizaron en triplicado con cada uno de los genotipos de *Bacillus* seleccionados.

### *Análisis estadísticos*

Todos los análisis estadísticos, como la estimación de los coeficientes de correlaciones de Pearson ( $r$ ) y de análisis de componentes principales (*PCA*), se realizaron con el lenguaje *R*, versión 3.3.1 (24-07-10).

## RESULTADOS

### Identificación y agrupamiento de los aislados de *Bacillus* del VCC

Con el análisis de la región HV-5', los 71 aislados del VCC se agruparon en 19 grupos filogenéticos enumerados arbitrariamente del I al XIX (Figura 11).

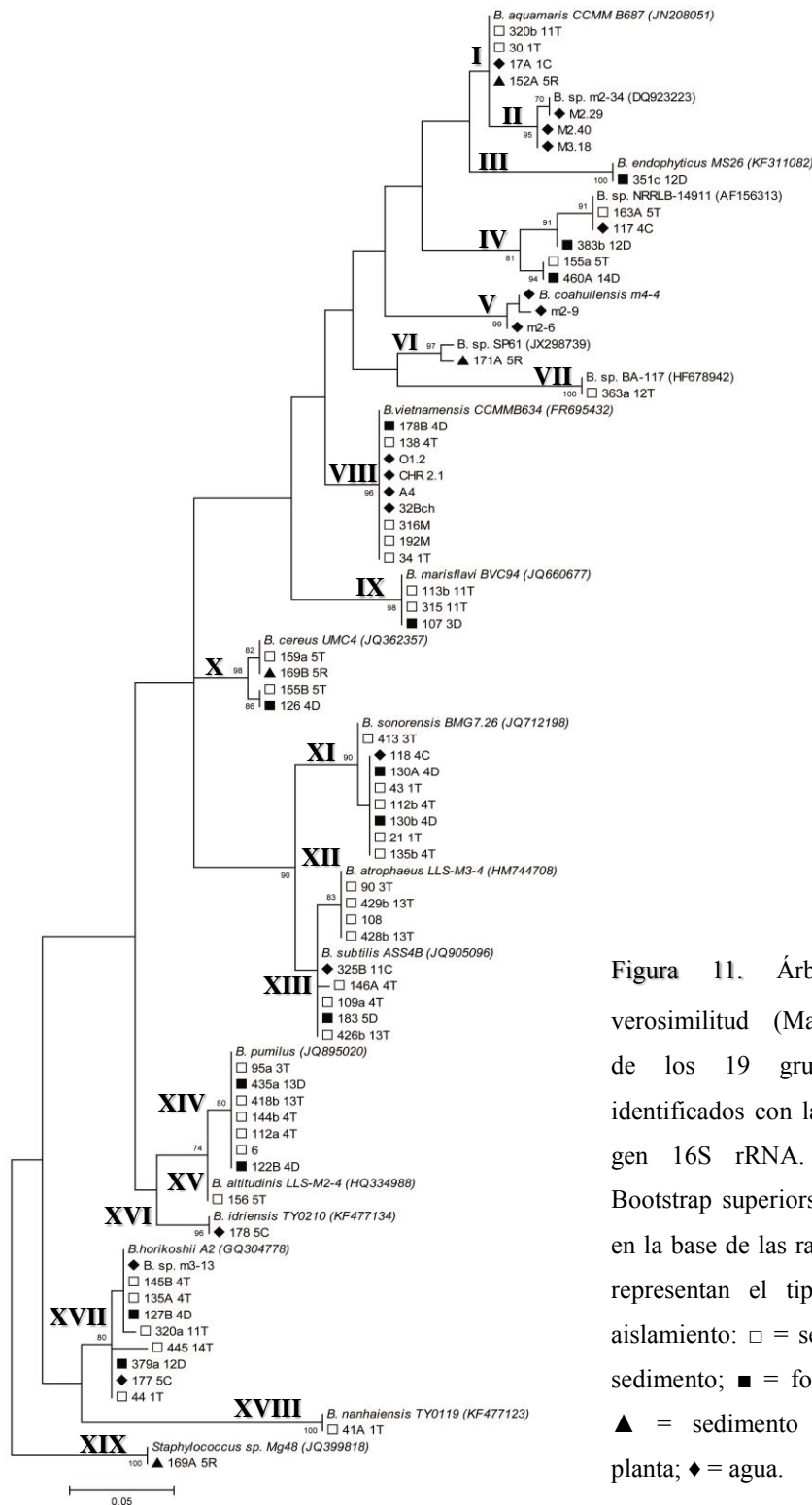


Figura 11. Árbol de Máxima verosimilitud (Maximum-likelihood) de los 19 grupos filogenéticos identificados con la región 5' HV del gen 16S rRNA. Los valores de Bootstrap superiores al 70% se ubican en la base de las ramas. Los símbolos representan el tipo de muestra de aislamiento: □ = sección superior del sedimento; ■ = fondo de sedimento; ▲ = sedimento adyacente a una planta; ◆ = agua.



Estos grupos, están relacionados genéticamente con bacilos descritos en diversos hábitats, como agua, suelo y sedimento. Así también, se observó la formación de cuatro *Clusters*: uno conformado por 30 aislados con afinidad con bacilos de ambientes marinos (I-IX); un *cluster* de cuatro aislados relacionados con *Bacillus cereus* (X); otro de cinco aislados relacionados con *B. subtilis* (XIII) y, un *cluster* de nueve aislados relacionados con *B. horikoshii* (XVII).

El “*cluster marino*” está compuesto, principalmente, por cepas aisladas de muestras de agua del VCC, como *B. sp.* m2-34 (II) y *B. coahuilensis* (V). Así también, tres grupos más se relacionaron con cepas aisladas en otros ambientes acuáticos, como *B. endophyticus* (III) aislada de un efluente industrial con la capacidad de degradar los contaminantes presentes en el sitio; *B. sp.* NRRLB-14911 (IV) y *B. marisflavi* (IX), ambas aisladas de agua de mar. Por otro lado, otros aislados se relacionaron con *B. aquamaris* (I), *B. sp.* SP61 (VI) y *B. vietnamensis* (VIII); cepas aisladas de ambientes hipersalinos (salineras y tapetes microbianos). Finalmente, el grupo VII se relacionó con una cepa presente en un *biofilm* de un lago (*B. sp.* BA-117). El *cluster* de *B. cereus* está formado por cepas de sedimentos marinos (X). Mientras que el grupo XI esta cercanamente relacionado con *B. sonorensis*, que fue aislada de suelo del desierto de Sonora. Los aislados del grupo XII se relacionaron con una cepa de *B. atrophaeus* aislada de muestras de agua y suelo. El *cluster* de *B. subtilis* se conformó de aislados relacionados con cepas descritas en muestras de suelo (XIII). Los aislados del grupo XIV se relacionaron con la especie cosmopolita de *B. pumilus*, que en este caso fue aislada de muestras de agua y suelo de una isla. Por otro lado, hubo aislados relacionados con una cepa de *B. altitudinis* aislada de muestras de agua y suelo (XV); mientras que los aislados del grupo XVI se relacionaron con una cepa de *B. idriensis* que fue aislada de suelo y que mostró capacidad de halotolerancia.

Finalmente, el *cluster* de *B. horikoshii* (XVII) contiene aislados relacionados con una cepa descrita en un tanque de cultivo de peces y, el grupo XVIII, se relacionó con una cepa halotolerante de *B. nanhaiensis*.

Sorpresivamente, el aislado *I69A 5R* se relacionó genéticamente con una cepa del género *Staphylococcus* aislada de un lago salino (*S. sp.* Mg48; JQ399818); sin embargo, la presencia de aislados relacionados con este género es común que sean encontrados durante el proceso de termo-selección de *Bacillus*, por lo que fue considerado para los análisis posteriores (grupo XIX).

## Variación del número de copias del operón *rrn* en los grupos filogenéticos del VCC

El número de copias del operón *rrn* fue cuantificado en cada uno de los 71 aislados pertenecientes a los grupos filogenéticos identificados anteriormente; lo cual, fue realizado con el análisis PFGE y su confirmación por hibridación nucleotídica (Figura 12).

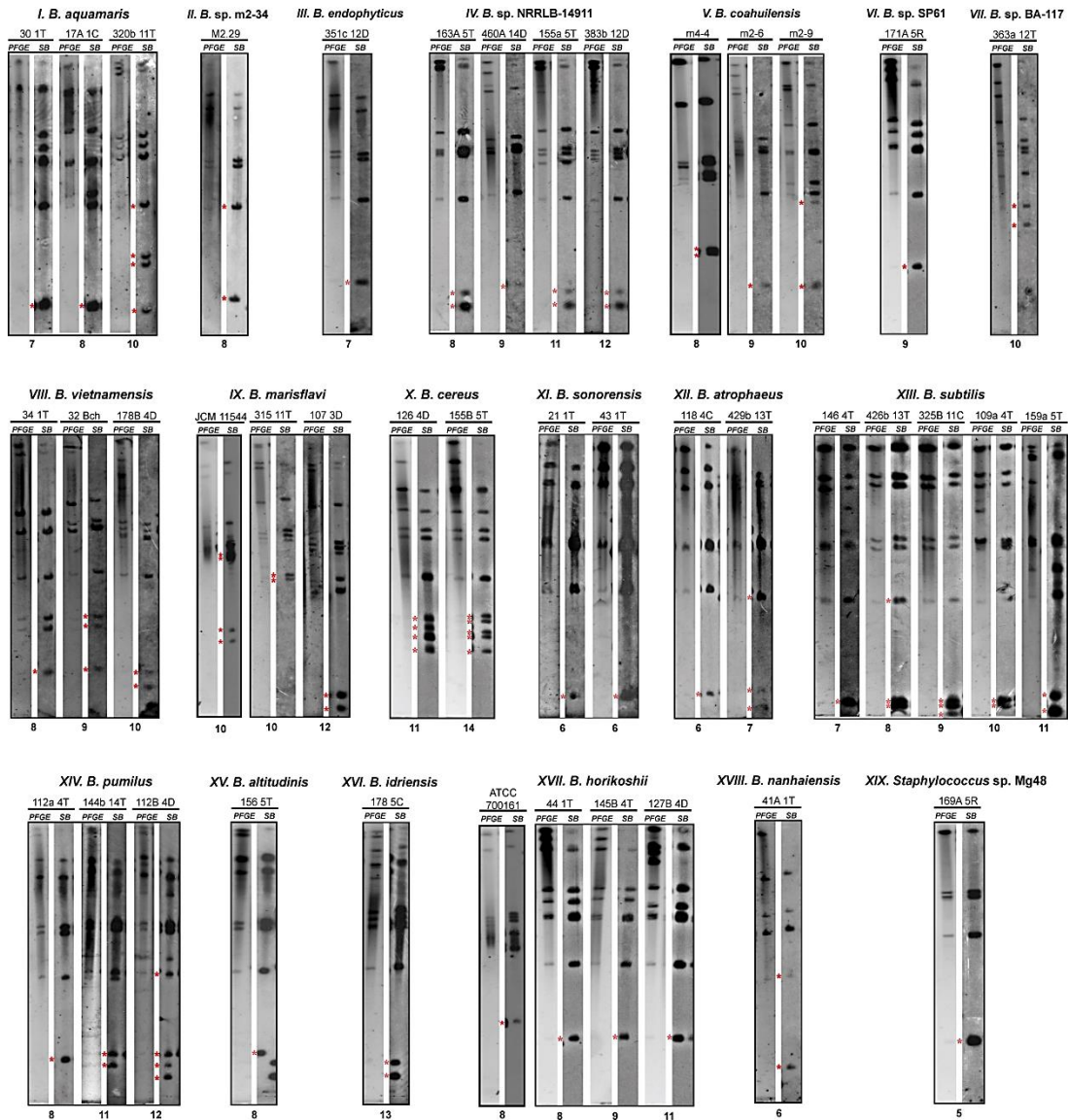


Figura 12. Número de copias del operón *rrn* en los grupos filogenéticos del VCC. Para cada aislado se muestran los fragmentos separados por PFGE (izquierda) y la confirmación por hibridación (SB; derecha). En la base de cada genotipo se encuentra el número de copias cuantificadas. Los asteriscos en rojo representan los fragmentos identificados con el análisis de hibridación.

Para obtener una referencia sobre el número de copias del operón en los *Bacillus* del VCC, se analizó a la cepa *B. coahuilensis* m4-4 (NRRL B-41737<sup>T</sup>) aislada del sistema Churince (Cerritos et al., 2008), de la cual ha sido analizado su genoma (Alcaraz et al., 2008). Después de la digestión genómica y del análisis de hibridación, se cuantificaron 8 copias del operón *rrn* en dicha cepa tipo (Figura 12; grupo V).

En los 70 aislados relacionados con *Bacillus* se cuantificaron entre 6 y 14 copias del operón *rrn* (Figura 13); algunos de los grupos filogenéticos mostraron una variación intraespecífica de 1 a 4 copias. Por otro lado, los grupos relacionados con *B. sonorensis* (XI), *B. atrophaeus* (XII) y *B. nanhaiensis* (XVIII) fueron los que mostraron 6 copias del operón, que es el menor número de copias cuantificado en otras cepas del género (*rrnDB*, Stoddard et al., 2015). Mientras que el mayor número de copias cuantificado fue de 14, presente en un aislado del grupo de *B. cereus* (X).

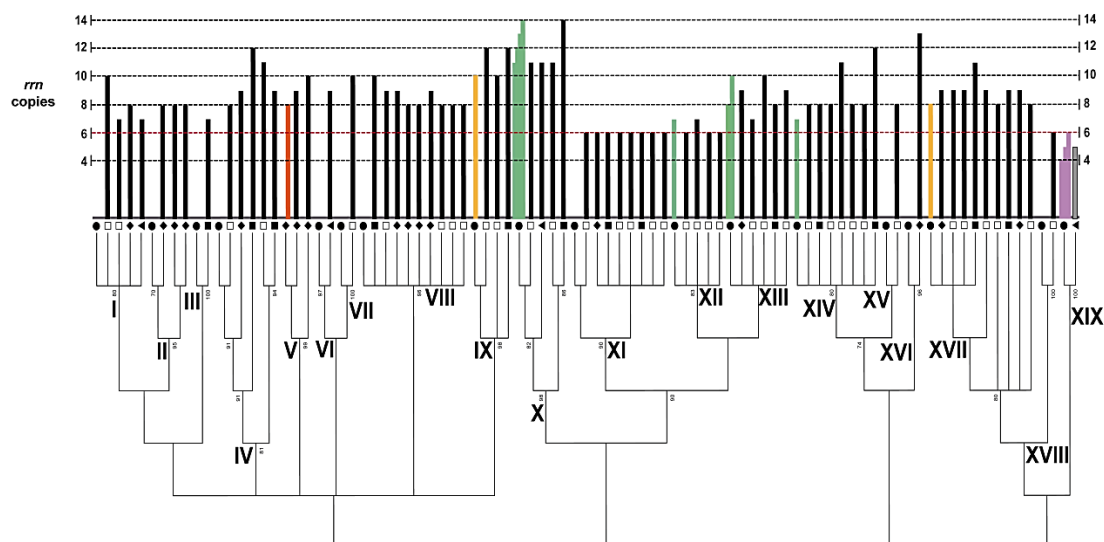


Figura 13. Variación del número de copias del operón *rrn* en la diversidad del género *Bacillus* del VCC. Los círculos en negro representan a las cepas tipo de cada grupo filogenético. Los cuadros, triángulos y rombos corresponden a los símbolos de los ambientes de los que fueron aislados, mencionados en la Figura 11 (□ = sección superior del sedimento; ■ = fondo de sedimento; ▲ = sedimento adyacente a una planta; ◆ = agua). La línea punteada en rojo representa al menor número de copias del operón cuantificado en el género de acuerdo a la base *rrnDB*. Las barras en negro representan el número de copias del operón en los aislados del VCC; las barras en verde representan el número de copias del operón de las cepas tipo reportadas en la base *rrnDB*. La barra en gris representa el número de copias del aislado relacionado con *Staphylococcus*; las barras en púrpura representan el número de copias del operón en las cepas tipo reportadas en la base *rrnDB*. La barra en naranja representa el número de copias cuantificadas en la cepa tipo *B. coahuilensis* (m4-4 = NRRL B-41737<sup>T</sup>), grupo V. Las barras en amarillo representan el número de copias cuantificadas en las cepas tipo *B. marisflavi* (JCM 11544 = KCCM 41588) y *B. horikoshii* (ATTC 700161), grupos IX y XVII, respectivamente.

Para conocer el número de copias del operón *rrn* en la diversidad del género *Bacillus*, se cuantificaron las copias del operón en dos cepas tipo comúnmente aisladas en el VCC: *B. horikoshii* (ATTCC 700161) y *B. marisflavi* (JCM 11544 = KCCM 41588). Hasta el momento, el genoma de ambas cepas no ha sido secuenciado; por lo que, se desconoce el número de copias del operón. El análisis mostró 10 copias en la cepa de *B. horikoshii* y 8 en la cepa de *B. marisflavi* (Figura 12). El número de copias cuantificado se encuentra dentro del rango observado en los aislados del VCC (Figura 13).

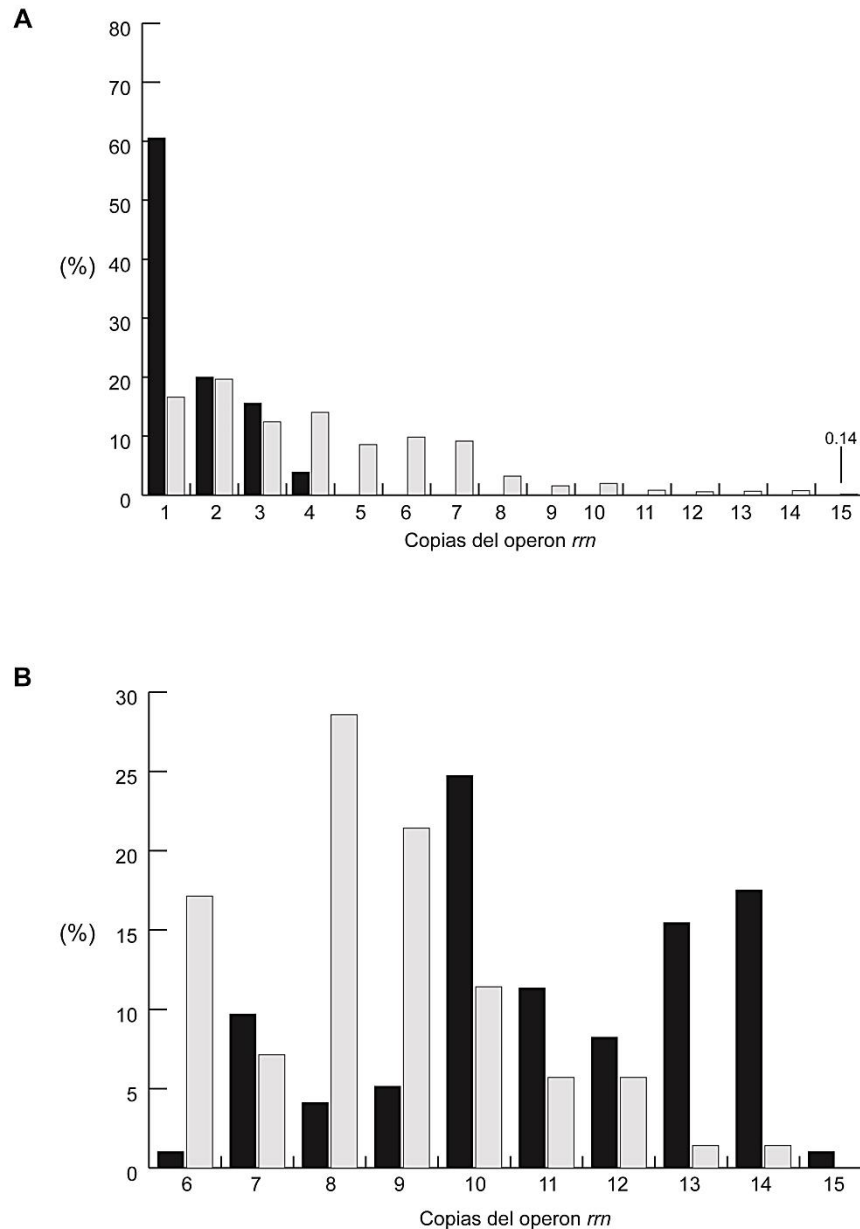
A nivel de grupo filogenético, se observó una considerable variación intraespecífica del número de copias del operón: *B. aquamaris* (I) de 7 a 9 copias; *B. sp.* NRRLB-14911 (IV): 8, 9 y 12 copias; *B. vietnamiensis* (VIII) de 8 a 10 copias; *B. subtilis* (XIII) de 7 a 11 copias; *B. pumilus* (XIV): 8, 11 y 12 copias; y *B. horikoshii* (XVII): 8, 9 y 11 copias. Por otro lado, sólo dos grupos filogenéticos mostraron un número homogéneo de copias del operón: *B. sp.* m2-34 (II) con 8 copias y, *B. sonorensis* (XI) con 6 copias. Así también, hubo grupos conformados por un solo aislado, en los que se cuantificaron los siguientes números de copias: *B. endophyticus* (III) 7 copias; *B. sp.* SP61 (VI) 10 copias; *B. sp.* BA-117 (VII) 9 copias; *B. altitudinis* (XV) 8 copias; *B. idriensis* (XVI) 13 copias; y *B. nanhaiensis* (XVIII) 6 copias (Figura 12). Mientras que el aislado relacionado con el género *Staphylococcus* mostró 5 copias del operón *rrn*.

#### *Análisis comparativo del número de copias del operón rrn de la diversidad de Bacillus del VCC con la base de datos rrnDB*

La base de datos *rrnDB* (*the ribosomal RNA operon copy number database*; <http://rrndb.umms.med.umich.edu/>; Stoddar et al., 2015) fue creada en 2001, como parte de un proyecto de investigación dirigido por el Dr. Thomas M. Schmidt (Michigan State University). Esta base de datos permite el acceso fácil a la información relacionada con la redundancia de los genes ribosomales en los genomas bacterianos secuenciados hasta el momento.

Hasta febrero de 2016, la base de datos contaba con 180 genomas del Dominio Arquea (Copias *rrn* = 1-4; Promedio = 1.63; Desviación estándar = 0.88; Moda = 1) y 2865 genomas del Dominio Bacteria (Copias *rrn* = 1-15; Promedio = 4.12; Desviación

estándar = 1.75; Moda = 2). De acuerdo con esta base de datos, la diversidad bacteriana de ambos dominios se caracteriza por tener un número reducido de copias del operón *rrn*: ~61% de los genomas de arqueobacterias tienen 1 copia del operón y, ~17% y ~19% de los genomas bacterianos tienen 1 y 2 copias del operón, respectivamente. Sólo el ~0.14% de los genomas bacterianos tienen 15 copias del operón y, en su mayoría, son especies formadoras de esporas, como *Bacillus* (Figura 14A).



**Figura 14.** Número de copias del operón *rrn* en la diversidad bacteriana. A) Número de copias del operón a nivel de dominio, las barras en negro y gris representan el porcentaje de copias en los genomas de Arquea y Bacteria, respectivamente. B) Número de copias del operón *rrn* en el género *Bacillus*, las barras en negro representan el porcentaje de copias en los genomas de la base *rrnDB*; mientras que las barras en gris representan el porcentaje de copias en los aislados del VCC.

Dentro del Dominio Bacteria, se encuentran 97 genomas de diferentes cepas del género *Bacillus*, que tienen entre 6 a 15 copias del operón *rrn* (Promedio = 10.92; Desviación estándar = 2.49; Moda = 10). En el presente trabajo, los aislados de *Bacillus* del VCC mostraron una tendencia a un número intermedio de copias del operón; ya que el 28.57% de los aislados tuvo 8 copias del operón (Promedio = 8.0; Desviación estándar = 1.85; Moda = 8) (Figura 14B).

Por lo que, esta información podría ser de utilidad para describir los mecanismos que determinan la variabilidad de este carácter funcional en la diversidad bacteriana. Sin embargo, se requiere de trabajo adicional para comprender las implicaciones asociadas a este proceso evolutivo en el mundo microbiano.

#### *Determinación de los parámetros de crecimiento*

Los parámetros de crecimiento fueron estimados en 15 aislados seleccionados a lo largo del árbol filogenético obtenido del análisis de agrupamiento (Figura 11). Estos aislados representan la diversidad de copias del operón *rrn* en los *Bacillus* del VCC y, también fue analizado el aislado relacionado con *Staphylococcus* (Tabla 2). Asociado a la gran diversidad observada en los *Bacilli* del VCC, los parámetros de crecimiento estimados mostraron una gran heterogeneidad (Figura 15). Los resultados mostraron fases Lag ( $\lambda$ ) variables que no se correlacionaron con la tasa de crecimiento específica ( $\mu_{max}$ ); sin embargo, la biomasa máxima alcanzada ( $A$ ) si es dependiente de la tasa de crecimiento específica ( $\mu_{max}$ ) (Figura 16).

Al realizar un análisis exploratorio entre los parámetros de crecimiento estimados y número de copias del operón *rrn* no se observó alguna correlación entre ambos (Tabla 3). Sin embargo, al realizar una categorización arbitraria del número de copias del operón, *low* (de 5 a 7 copias), *mid* (de 8 a 10 copias) y *high* (de 11 a 14 copias), se observó que los aislados con el menor número de copias presentaban una dispersión menor en los parámetros de crecimiento en comparación con los aislados con el mayor número de copias del operón, mostrando una dispersión mayor en dichos parámetros (Tabla 2). Este comportamiento fue descrito a través de un análisis de componentes principales (PCA); donde se observó la influencia de los parámetros de crecimiento estimados con cada una de las categorías del número de copias del operón

(Figura 17A). En este sentido, el 42.71% de la varianza fue explicada por el Componente 1; el cual, está definido por el tiempo de duplicación ( $t_d$ ), la tasa de crecimiento específica ( $\mu_{max}$ ) y la biomasa máxima alcanzada ( $A$ ). Mientras que el Componente 2 explica el 26.87% de la varianza y fue definido principalmente por el tiempo de adaptación (fase Lag,  $\lambda$ ) y el número de copias del operón *rrn* (Figura 17B). Estos resultados indican que el número de copias del operón *rrn* de los aislados de *Bacillus* del VCC podría estar relacionado funcionalmente al conjunto de parámetros que describen su dinámica de crecimiento, y no sólo a la tasa de crecimiento; por lo que, la heterogeneidad en la dinámica de crecimiento de los aislados de *Bacillus* podría ser una respuesta a la baja disponibilidad de nutrientes disponibles en el VCC y reflejaría el costo competitivo que representa tener un número elevado de copias del operón *rrn* bajo estas condiciones ambientales.

Tabla 2. Parámetros de crecimiento estimados en los aislados del VCC.

	Copias <i>rrn</i>	Aislado	Grupo filogenético	Parámetros			
				A	$\lambda$ (h)	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	$t_d$ (h)
A	14	155B_5T	X. <i>B. cereus</i>	9.98	0.92	0.26	2.66
B	6	118_4C	XI. <i>B. sonorensis</i>	9.89	1.13	0.24	2.88
C	8	m3-18	II. <i>B. sp.</i> m2-34	9.78	2.89	0.24	2.88
D	9	m2-9	V. <i>B. coahuilensis</i>	7.95	1.08	0.22	3.15
E	10	m2-6	V. <i>B. coahuilensis</i>	7.68	1.45	0.21	3.30
F	12	112B_4D	XIV. <i>B. pumilus</i>	7.35	1.70	0.31	2.23
G	5	169A_5R	XIX. <i>Staphylococcus</i>	7.30	0.92	0.26	2.66
H	12	107_3D	IX. <i>B. marisflavi</i>	7.28	0.25	0.19	3.64
I	13	178_5C	XVI. <i>B. idriensis</i>	7.02	2.56	0.57	1.21
J	11	126_4D	X. <i>B. cereus</i>	6.69	2.78	0.23	3.01
K	7	152A_5R	I. <i>B. aquamaris</i>	6.48	0.22	0.16	4.33
L	8	44_1T	XVII. <i>B. horikoshii</i>	5.20	4.12	0.19	3.64
M	10	315_11T	IX. <i>B. marisflavi</i>	4.44	1.44	0.12	5.77
N	11	144b_14T	XIV. <i>B. pumilus</i>	3.67	2.79	0.11	6.30
O	6	108	XII. <i>B. atropheus</i>	3.38	2.06	0.08	8.66
P	11	127B_4D	XVII. <i>B. horikoshii</i>	3.22	1.70	0.09	7.70

A= biomasa máxima alcanzada ( $\ln(\text{CFU}/\text{CFU}_{(t=0)})$ );  $\lambda$  = fase Lag;  $\mu_{max}$  = tasa de crecimiento específica;  $t_d$  = tiempo de duplicación (generacional).

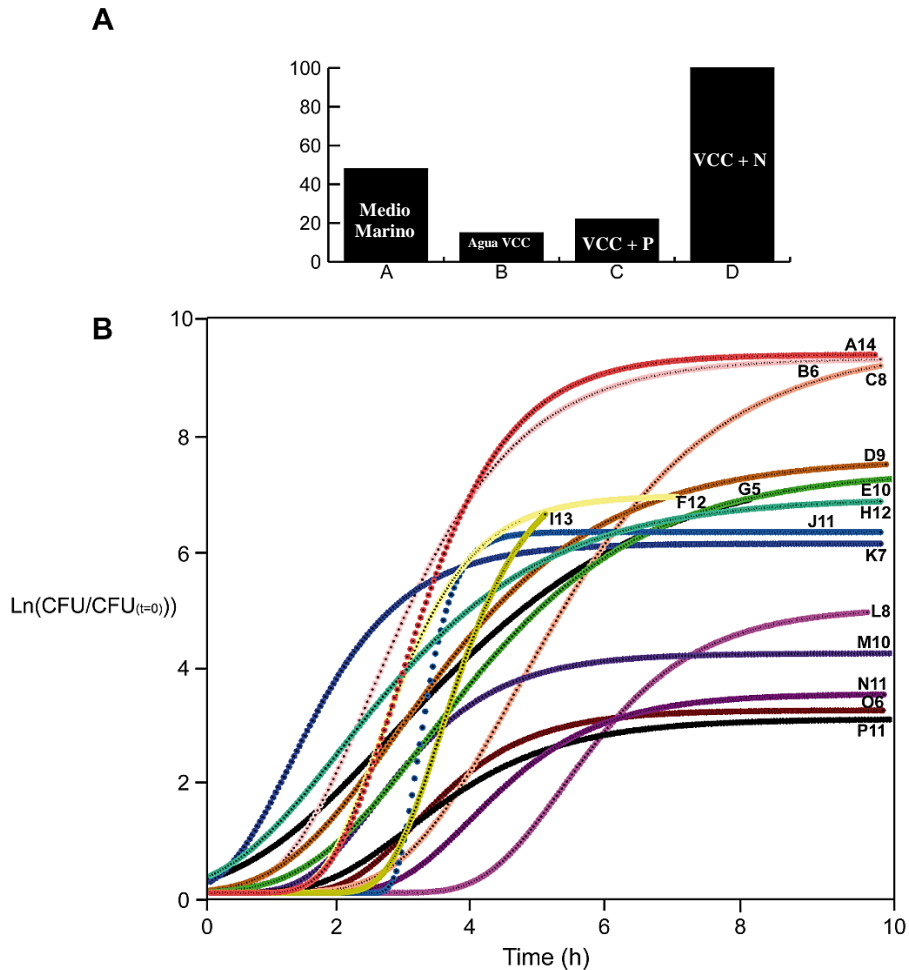


Figura 15. Condiciones y determinación de la dinámica de crecimiento de los aislados del VCC. A) Análisis nutricional para definir las condiciones óptimas para definir la dinámica de crecimiento de los aislados: A = medio Marino (Difco™ 2216); B = agua del VCC; C = agua del VCC + P ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $5 \text{ g L}^{-1}$ ); D = agua del VCC + N (tryptone,  $5 \text{ g L}^{-1}$ ). El crecimiento fue cuantificado por turbidez ( $\text{OD}_{600}$ ; BioPhotometer Plus, Eppendorf) después de 12 h, y los datos fueron normalizados para definir las condiciones óptimas. B) Curvas de crecimiento definidas después del análisis de regresión lineal de acuerdo con la ecuación de Gompertz. Los nombres de los aislados (letras de A a P) corresponden con la biomasa máxima alcanzada (A; Tabla 2), seguido del número de copias del operón.



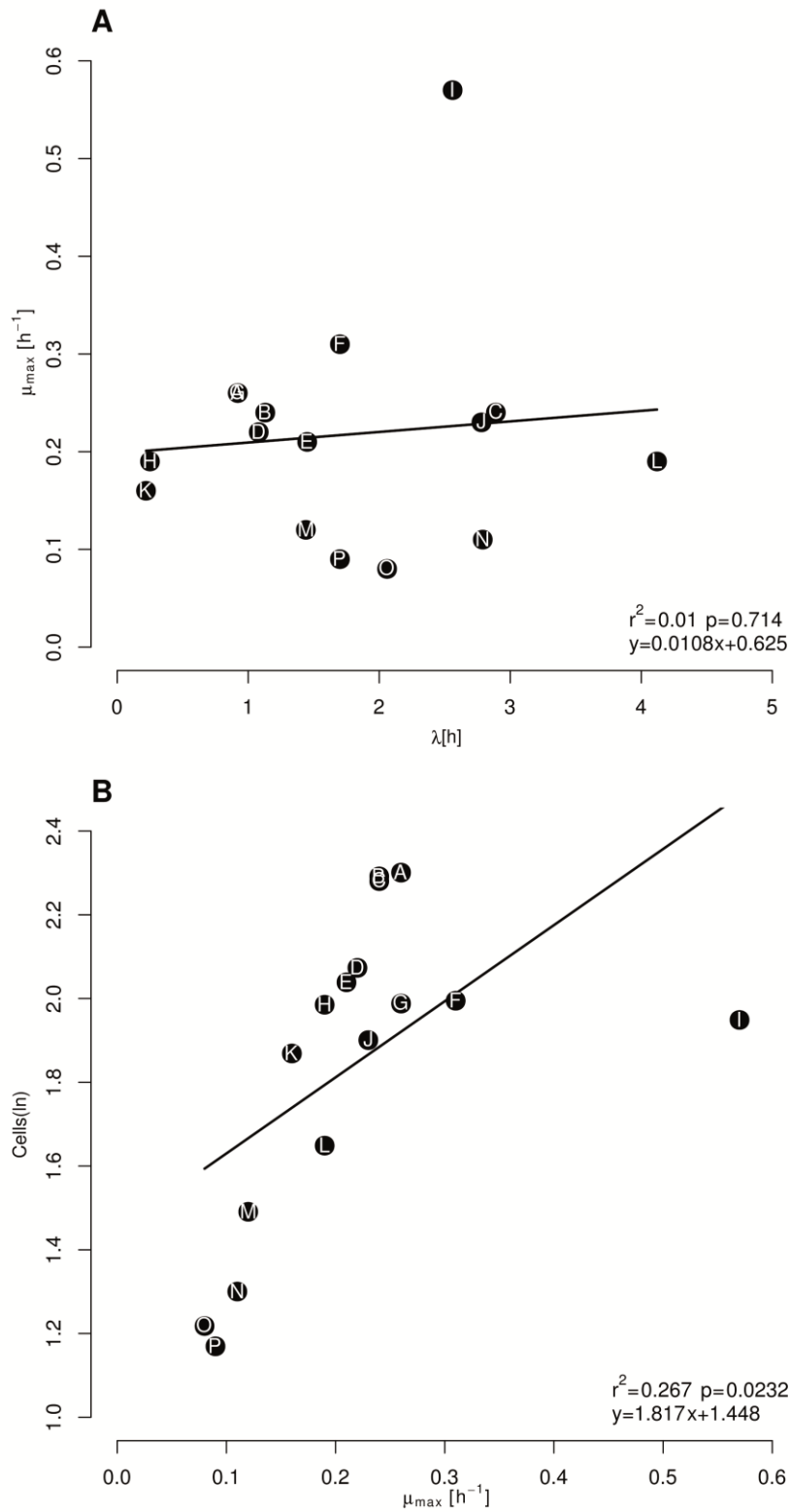


Figura 16. Correlación de los parámetros de crecimiento estimados en los aislados del VCC.

A)  $\lambda$  Vs  $\mu_{\max}$  y, B)  $\mu_{\max}$  Vs A. Los nombres de los aislados (letras de A a P) corresponden con la biomasa máxima alcanzada (A; Tabla 2), seguido del número de copias del operón. A = biomasa máxima alcanzada ( $\ln(\text{CFU}/\text{CFU}_{(t=0)})$ );  $\lambda$  = fase Lag;  $\mu_{\max}$  = tasa de crecimiento específica.

**Tabla 3.** Coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ) de los parámetros de crecimientos estimados en los aislados del VCC.

		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>1</b>	$rrn$				
<b>2</b>	$A$	0.043			
<b>3</b>	$\lambda$	0.039	-0.284		
<b>4</b>	$\mu_{max}$	0.337	0.511*	0.099	
<b>5</b>	$t_d$	-0.213	-0.804***	0.046	-0.804***

*\*P<0.05   \*\*P<0.01   \*\*\*P<0.001*

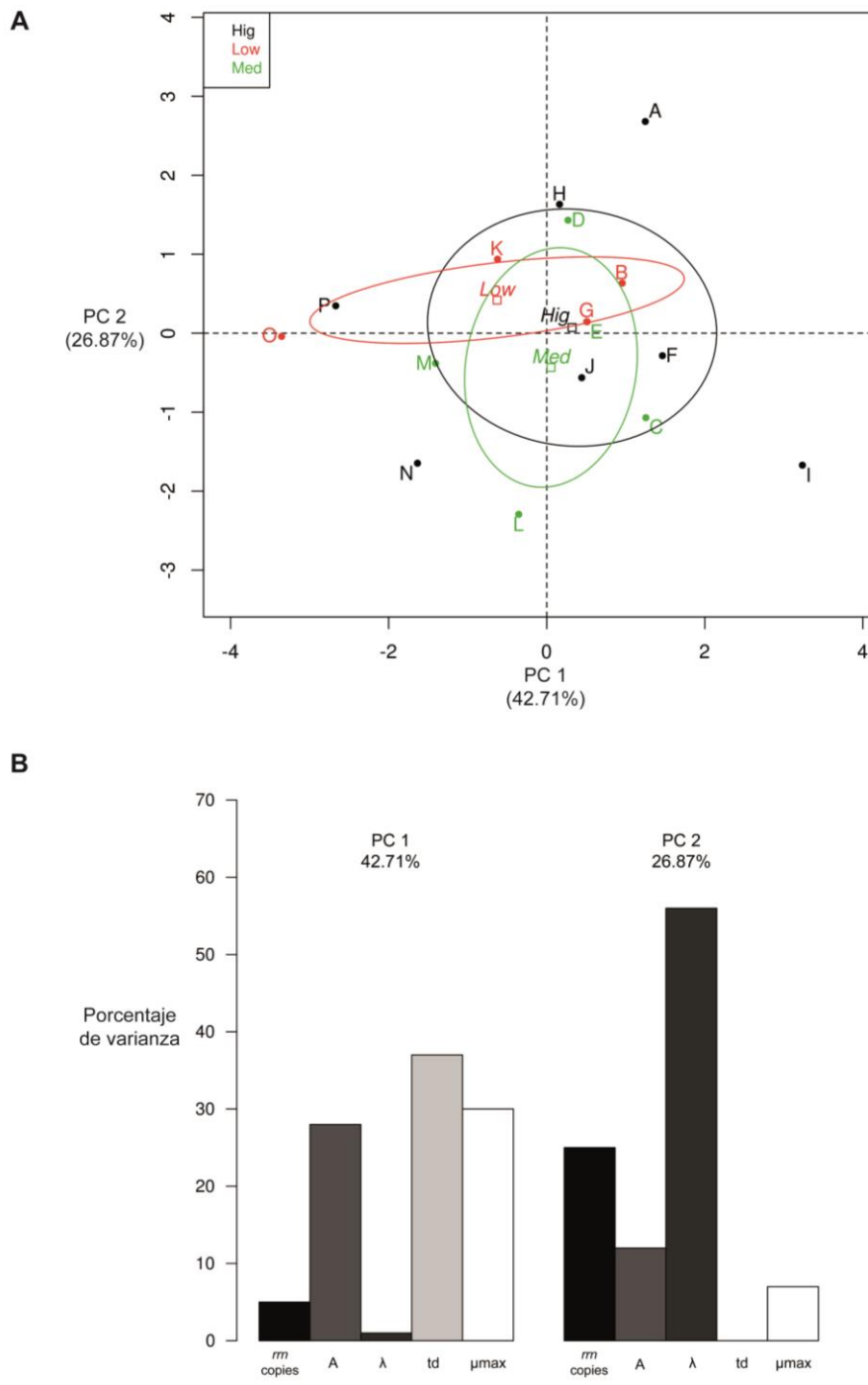


Figura 17. Análisis categórico del número de copias del operón *rrn* y los parámetros de crecimiento estimados en los aislados del VCC. A) Análisis de componentes principales (PCA) de los parámetros de crecimiento; los colores de las letras representan la categorización arbitraria del número de copias del operón *rrn*: en rojo, número reducido de copias (5-7); en verde, número intermedio de copias (8-10); en negro, número alto de copias (11-14). B) Contribución relativa (%) por variable en el análisis de PCA. A= biomasa máxima alcanzada;  $\lambda$  = fase Lag;  $\mu_{max}$  = tasa de crecimiento específica;  $t_d$  = tiempo de duplicación (generacional).

### *Contenido celular de C, N y P (%) y, las proporciones C:N y N:P durante la fase de crecimiento exponencial*

Para describir las implicaciones fisiológicas asociadas a la oligotrofia del VCC sobre la diversidad del género *Bacillus*, se cuantifico el contenido de C, N y P (%) en muestras de biomasa colectada durante la fase exponencial durante la dinámica de crecimiento de los aislados seleccionados (Tabla 4). Todos los aislados mostraron un contenido relativamente bajo y variable de P (%) (Promedio = 0.496; Desviación estándar = 0.616; Mediana = 0.258); mientras que el contenido de C (%) y N (%) mostraron una gran variabilidad entre todos los aislados [N (%): Promedio = 7.14; Desviación estándar = 5.61; Mediana = 5.49; C (%): Promedio = 64.64; Desviación estándar = 26.63; Mediana = 59.63].

En relación a las proporciones C:N (Promedio = 13.18; Desviación estándar = 7.18; Mediana = 12.32) y N:P (Promedio = 126.7; Desviación estándar = 235.1; Mediana = 52.1), ambas mostraron un amplio rango de valores (Tabla 4). Sin embargo, la proporción N:P estimada en los *Bacillus* del VCC es considerablemente mayor a lo reportado en otros bacilos (*B. subtilis* 10.6; Loladze and Elser, 2011).

Considerando los principios de la Hipótesis de la Tasa de Crecimiento, se analizó la correlación entre el contenido celular de P (%) durante la fase exponencial con la tasa de crecimiento específica ( $\mu_{max}$ ). Dicho análisis mostró una relación nula entre ambas variables (Figura 18A). Sin embargo, el número de copias del operón *rrn* se encuentra correlacionado negativamente y de forma significativa con el contenido de P (%) celular (Figura 18B). Considerando lo anterior, el aislado G que tuvo el menor número de copias (5 *rrn*; *Staphylococcus*) fue el que tuvo el mayor contenido celular de P (%) y de N (%); mientras que los aislados B y O (*B. sonorensis* y *B. atrophaeus*, respectivamente), ambos con 6 copias del operón, tuvieron contenidos altos de P (%). Caso opuesto, el aislado A que mostró el mayor número de copias del operón (14 *rrn*; *B. cereus*), tuvo el menor contenido de P (%) de todos los aislados que fueron analizados; sin embargo, fue el aislado que ocupó el segundo lugar en relación al contenido de N (%). Por otro lado, los aislados D y E que están relacionados con la especie endémica *B. coahuilensis* (9 y 10 *rrn*, respectivamente), tuvieron bajos contenidos de P (%) y N (%).

Tabla 4. Contenido de C, N y P (%) y, proporciones C:N y N:P durante la fase exponencial de aislados del VCC.

<i>rrn</i>	Isolate	Phylogenetic group	%C	%N	%P	C:N	N:P	
A	14	155B_5T	<i>X. B. cereus</i>	74.61	17.57	0.041	4.94	965.38
B	6	118_4C	XI. <i>B. sonorensis</i>	84.61	5.11	1.133	19.28	10
C	8	m3-18	II. <i>B. sp. m2-34</i>	48.97	6.83	0.053	8.35	286.47
D	9	m2-9	V. <i>B. coahuilensis</i>	51.92	2.44	0.07	24.82	79.09
E	10	m2-6	V. <i>B. coahuilensis</i>	27.76	1.79	0.076	18.18	52.91
F	12	112B_4D	XIV. <i>B. pumilus</i>	57.07	3.55	0.043	18.77	194.61
G	5	169A_5R	XIX. <i>Staphylococcus</i>	112.3	22.75	1.95	5.75	25.83
H	12	107_3D	IX. <i>B. marisflavi</i>	33.26	4.35	0.495	8.87	19.55
I	13	178_5C	XVI. <i>B. idriensis</i>	89.92	5.87	0.321	17.85	40.67
J	11	126_4D	<i>X. B. cereus</i>	62.19	2.93	0.097	24.73	67.41
K	7	152A_5R	I. <i>B. aquamaris</i>	3.43	6.3	0.195	0.62	72.58
L	8	44_1T	XVII. <i>B. horikoshii</i>	44.61	3.77	1.807	13.79	4.61
M	10	315_11T	IX. <i>B. marisflavi</i>	73.07	5.1	0.137	16.7	82.72
N	11	144b_14T	XIV. <i>B. pumilus</i>	53.46	9.45	0.415	6.59	50.75
O	6	108	XII. <i>B. atrophaeus</i>	72	7.81	0.731	10.77	23.6
P	11	127B_4D	XVII. <i>B. horikoshii</i>	81.03	8.69	0.374	10.85	51.32
			Promedio $\pm$ DS.	60.64 $\pm$ 26.63	7.14 $\pm$ 5.61	0.496 $\pm$ 0.616	13.18 $\pm$ 7.18	126.72 $\pm$ 235.13

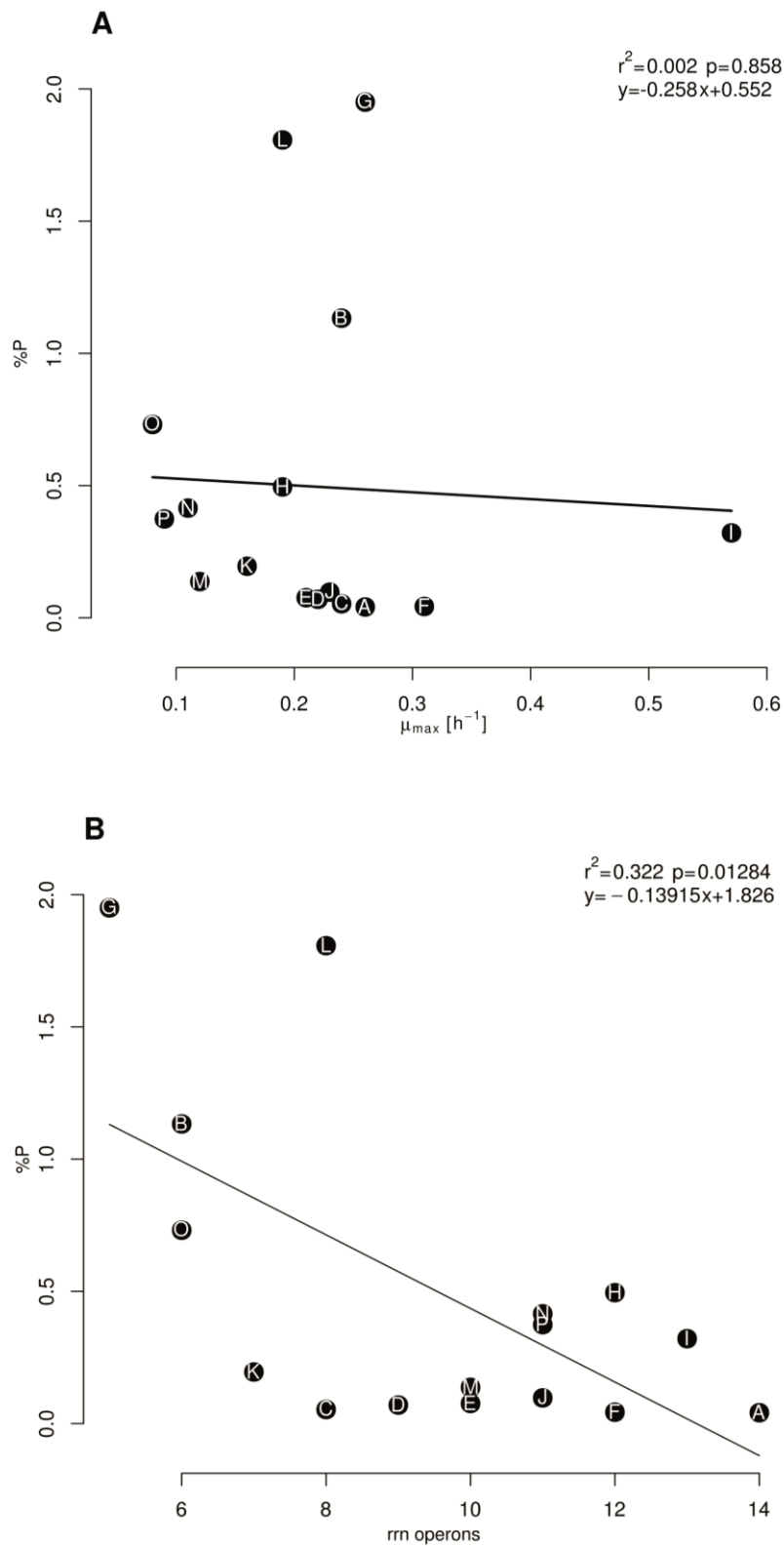


Figura 18. Relación entre la tasa específica de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ) (A) y el número de copias del operón (B), con el contenido de P (%) durante la fase exponencial de crecimiento. Los nombres de los aislados (letras de A a P) corresponden con la biomasa máxima alcanzada (A; Tabla 2)

En relación a las proporciones elementales, los valores de C:N fueron muy heterogéneos y no se observó relación alguna con el número de copias del operón ni con los parámetros de crecimiento. Sin embargo, los aislados con el menor número de copias fueron los que tuvieron la menor proporción de N:P (B, G y O). Mientras que el aislado A, que tiene el mayor número de copias, presentó la mayor proporción de N:P (Tabla 4). Por otro lado, los aislados relacionados con *B. coahuilensis* (D y E) tuvieron valores intermedios de esta proporción elemental. Estos resultados tienen un sentido opuesto a lo establecido en la Hipótesis de la Tasa de Crecimiento; por lo que, los aislados con el menor número de copias del operón podrían estarse adaptando mejor a la oligotrofia del VCC; a pesar de que el número de copias cuantificado en estos aislados es considerablemente mayor a lo observado en otros grupos bacterianos que viven en otros ecosistemas limitados en P (p. eje., las cianobacterias; Fegatella et al., 1998).

#### *Variación del contenido de proteínas durante la dinámica de crecimiento*

Otra forma de evaluar el efecto de la oligotrofia sobre la fisiología de los aislados del VCC, fue cuantificando el contenido de proteínas durante la dinámica de crecimiento. El promedio del contenido de proteínas durante las fases de crecimiento fue: Lag ( $\lambda$ ) = 10.11  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (DS $\pm$  1.96), exponencial = 11.80  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (DS $\pm$  2.39) y estacionaria = 10.13 (DS $\pm$  4.06) (Figura 19).

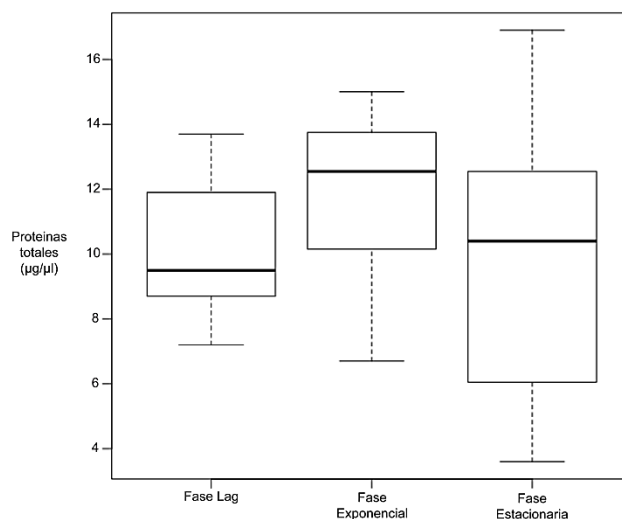


Figura 19. Variación del contenido de proteínas durante la dinámica de crecimiento de los aislados del VCC. La línea negra dentro de las cajas representa la mediana de los datos cuantificados.

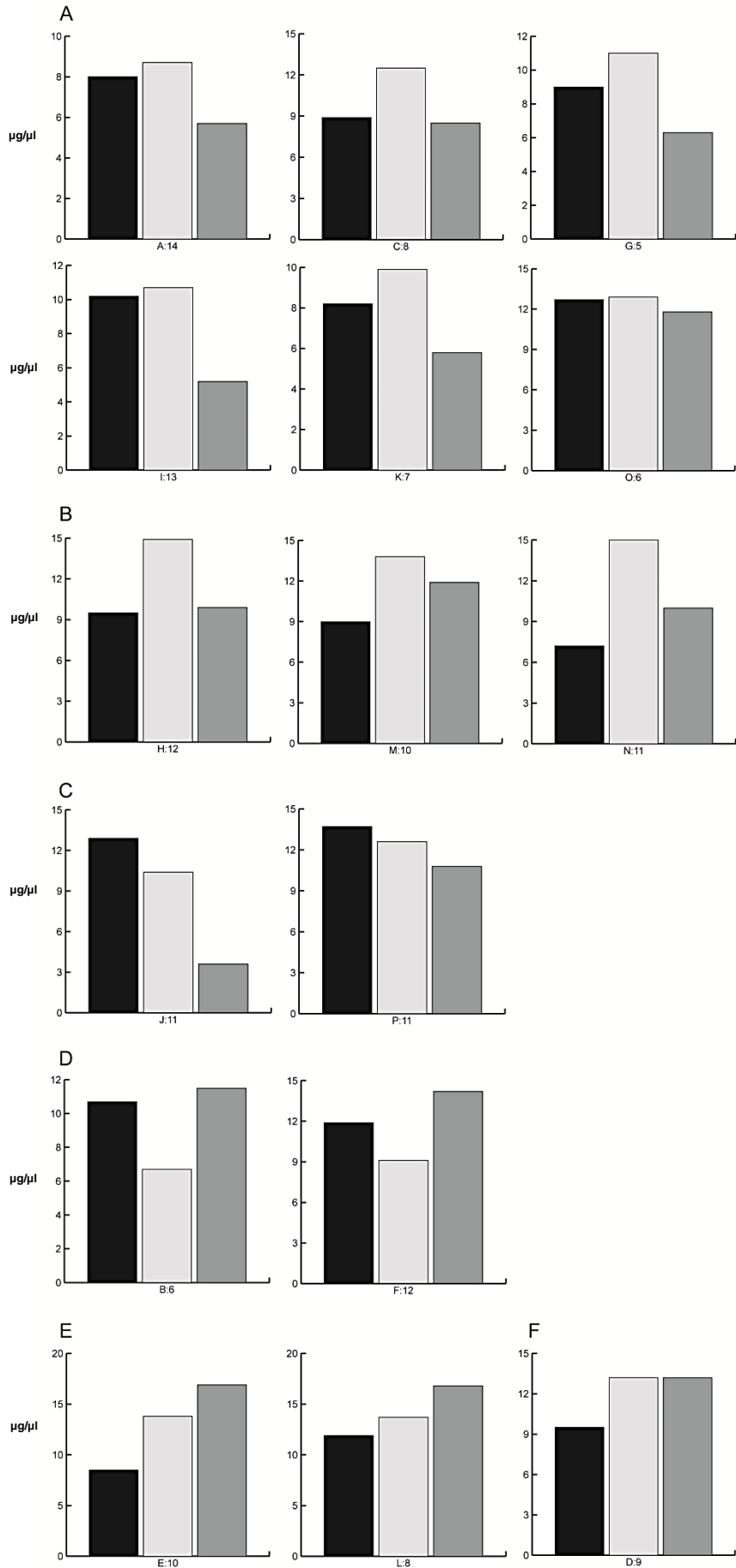
El contenido de proteínas fue muy variable; sin embargo, algunos aislados mostraron similitudes a lo largo de la dinámica de crecimiento (aislado:copias *rrn*) (Figura 20):

- i. Los aislados A:14, C:8, G:5, I:13, K:7 y O:6 mostraron un elevado contenido proteico en la fase exponencial, seguido de la fase Lag ( $\lambda$ ) y, el menor contenido fue cuantificado en la fase estacionaria.
- ii. Los aislados H:12, M:10 y N:11 mostraron un elevado contenido proteico en la fase exponencial, seguido de la fase estacionaria y, el menor contenido fue cuantificado en la fase Lag ( $\lambda$ ); los aislados H:12 y M:10 se encuentran filogenéticamente relacionados con *B. marisflavi* (IX).
- iii. Los aislados J:11 y P:11 mostraron el mayor contenido proteico en la fase Lag ( $\lambda$ ); el cual, fue disminuyendo de forma sucesiva en las siguientes fases.
- iv. Los aislados B:6 y F:12 mostraron el mayor contenido proteico en la fase estacionaria, seguido de la fase Lag ( $\lambda$ ) y, el menor contenido fue cuantificado en la fase exponencial.
- v. Los aislados E:10 y L:8 mostraron un incremento del contenido proteico continuo de la fase inicial a la fase final de crecimiento (Lag ( $\lambda$ ), exponencial y estacionaria).
- vi. Finalmente, el aislado D:9 mostró el menor contenido proteico en la fase Lag ( $\lambda$ ); el cual, se incrementó de forma considerable en la fase exponencial y se mantuvo el nivel de expresión hasta la fase estacionaria.

Figura 20. Patrones del contenido de proteínas durante la dinámica de crecimiento de los aislados del VCC. Las proteínas totales fueron cuantificadas en  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . La barra en negro representan a la fase Lag, la barra en gris claro representa a la fase exponencial y la barra en color gris oscuro representa a la fase estacionaria. A) Aislados con mayor contenido de proteínas durante la fase exponencial, seguida de la fase Lag y de la fase estacionaria; B) aislados con mayor contenido de proteínas durante la fase exponencial, seguida de la fase estacionaria y fase Lag; C) aislados con mayor contenido de proteínas durante la fase Lag y que fue disminuyendo en las fases posteriores; D) aislados con mayor contenido de proteínas durante la fase estacionaria, seguida de la fase Lag y fase exponencial; E) aislados con un incremento continuo de la fase Lag hasta la fase estacionaria; F) aislado con el menor contenido de proteínas en la fase Lag y con contenido constante en las siguientes fases de crecimiento

(Ver página siguiente).





## DISCUSIÓN

El objetivo general del presente trabajo fue analizar la variabilidad del número de copias del operón *rrn*, como una estrategia ecológica relacionada con la disponibilidad de fósforo (P) ambiental. Este análisis fue realizado en aislados del género *Bacillus* procedentes de un ecosistema extremadamente oligotrófico y así comprender las implicaciones fisiológicas asociadas a la variación numérica de dicho operón bajo esta condición ambiental. Se analizaron 71 aislados del VCC que mostraron una variación considerable de copias del operón *rrn* (6 a 14 copias); siendo 8, el número de copias más común en estos aislados. Asociado a la variabilidad del número de operones, los aislados mostraron una gran variabilidad en su dinámica de crecimiento, composición elemental y expresión proteica. A pesar de lo anterior, se observaron algunas asociaciones a nivel fisiológico que se relacionan con la Hipótesis de la Tasa de Crecimiento (p. eje. el aislado con la tasa de crecimiento más lenta tuvo el contenido más bajo de P (%) y, por lo tanto, la mayor proporción N:P). Sin embargo, no se observó ninguna asociación entre el número de copias del operón y los parámetros de crecimiento determinados. Por lo que, es probable que existan otras estrategias de expresión y regulación genética más allá del número de copias del operón y que estarían definiendo la dinámica de crecimiento de estos *Bacillus*; lo cual, estaría influyendo en la coexistencia de la comunidad microbiana del VCC.

### *Análisis filogenético de los aislados de Bacillus del VCC*

La construcción filogenética realizada con la región HV-5' mostró que los aislados del VCC se relacionan con diversas cepas del género *Bacillus* que han sido aisladas en hábitats con diferentes condiciones ambientales. Por lo que, en cada sitio dentro del VCC se encuentran diversas especies coexistiendo. Trabajos anteriores han caracterizado la diversidad microbiana del sistema Churince, describiendo diversos grupos termo- y halotolerantes de *Bacillus* (Cerritos et al., 2011). En este grupo de bacilos, se identificaron cepas con propiedades diferentes a lo observado anteriormente en el género; considerándose como endémicas. Estas cepas han sido analizadas genéticamente; de las cuales, la especie *B. coahuilensis* y la cepa *Bacillus* m3-13 mostraron diversas adaptaciones relacionadas con la oligotrofia del VCC (Alcaraz et al., 2008, 2010). El origen y evolución de estas adaptaciones se relacionan con origen antiguo en dicho ecosistema (Moreno-Letelier et al., 2011) y con los mecanismos de

interacción (antagonismo) que estarían contribuyendo con los niveles de diversidad; propiciando la diferenciación local a través de procesos de resistencia o elusión (modelo de piedra-papel-tijeras) (Aguirre-von-Wobeser et al., 2013; Pérez-Gutiérrez et al., 2013).

A lo largo de los 15 años de trabajo en campo y laboratorio, se han aislado los mismos grupos filogenéticos de *Bacillus* en muestras de sedimento obtenidas de diferentes sitios del VCC (Souza et al., 2006, 2012); por lo que, se ha argumentado que éste podría ser el principal hábitat donde coexisten las diferentes especies de dicho género por su persistencia temporal (Pérez-Gutiérrez et al., 2013). Los resultados del presente estudio podrían ser el producto de la correlación entre los niveles de diversidad del ecosistema y de las interacciones bióticas de la comunidad; ligado a la historia geológica, a la baja disponibilidad de nutrientes y a la variación de las condiciones ambientales del ecosistema (Souza et al., 2012).

#### *Variación del número de copias del operón *rrn**

El número de copias del operón *rrn* es un carácter funcional que está relacionado con la historia y estilo de vida de las bacterias; considerado una estrategia ecológica relacionada con la disponibilidad de nutrientes (Klappenbach et al., 2000; Stevenson and Schmidt, 2004; Green et al., 2008). La variación del número de copias del operón en los aislados de *Bacillus* del VCC no puede ser explicada sencillamente. En estudios previos, han cuantificado el número de copias del operón en diversas cepas ambientales que incluyen algunos aislados de *Bacillus* (Klappenbach et al., 2000; Shrestha et al., 2007; Viera-Silva and Rocha, 2015). Sin embargo, este es el primer trabajo que se enfoca en analizar el número de copias del operón en un grupo diverso de aislados de *Bacillus* que se encuentran coexistiendo bajo condiciones extremas de limitación de nutrientes.

El análisis genómico de *B. coahuilensis*, mostró 9 copias del operón *rrn* (Alcaraz et al., 2008, 2010); sin embargo, en el presente estudio se cuantificaron 8 copias del operón. Esta discrepancia pudo ser el resultado de similitudes en el tamaño de algunos de los fragmentos obtenidos de la digestión del genoma, complicando su diferenciación. Estas variaciones son comunes al comparar los resultados con diferentes técnicas de análisis (p. eje. *Exiguobacterium*; Vishnivetskaya et al., 2009). Los aislados de *Bacillus* del VCC, tuvieron entre 6 y 14 copias del operón; similar a lo cuantificado por la base

de datos *rrnDB* (de 6 a 15 copias; Stoddard et al., 2015). Sin embargo, en Enero del 2015 fueron publicadas las propiedades genómicas de *Bacillus pumilus* WP8, cepa aislada de la rizosfera de trigo (*Triticum aestivum* L.) en China (Kang et al., 2015). La base *rrnDB* reportó un solo operón *rrn* en dicha cepa. Este número de copias del operón es característico de bacterias endosimbiontes o que habitan ambientes oligotróficos (Dini-Andreote et al., 2012). A pesar de que este número tan bajo de copias del operón sería lo esperado en los aislados del VCC por su oligotrofia extrema, es un número improbable por el estilo de vida y la relación que existe de un número elevado de copias con la formación de esporas en *Bacillus* (Feldgarden et al., 2003; Nanamiya et al., 2010; Yano et al., 2013).

Desde una perspectiva ecológica, el número de copias del operón *rrn* que fue cuantificado en los aislados de *Bacillus* del VCC no fue el esperado; ya que el análisis de las propiedades genéticas de otras bacterias de ambientes oligotróficos y de predicciones teóricas, se esperaba un número reducido de copias siguiendo los principios que explican las estrategias tipo *K* (Pianka, 1970; Lauro et al., 2009; Lipowsky et al., 2012). Sin embargo, los resultados obtenidos aún podrían tener algunas asociaciones a esta teoría ecológica, como podría ser el caso de los aislados con 6 copias del operón relacionados con *B. sonorensis* (Palmisano et al., 2001; Souza et al., 2006, 2012). Por lo que, se buscaron algunas asociaciones ecológicas comparando de los resultados obtenidos de los aislados del VCC con la base *rrnDB*. Este análisis mostró una variación intraespecífica considerable entre ambas fuentes (p. eje. los genomas de *B. pumilus* de la *rrnDB* tienen 7 y 8 copias del operon y, los aislados del VCC tienen 8, 11 y 12 copias). Esta variación intraespecífica había sido descrita en diferentes genomas bacterianos (Acinas et al., 2004); mostrando una variación de una a 3 copias del operón en tres especies de *Bacillus*. Posteriormente, Rastogi et al., (2009), analizaron un número mayor de genomas de *Bacillus*, observando un nivel de variación intraespecífica similar (1-4 copias); variación similar a la observada en los aislados de *B. pumilus* del VCC. Esta variación intraespecífica podría ser explicada como una forma de generar diversas respuestas fisiológicas que le permitirían superar las condiciones presentes en ecosistemas oligotróficos: mientras algunos *Bacillus* almacenan fósforo en sus ribosomas y presentan un crecimiento lento (estrategia *K*); otros pueden mantener una tasa de crecimiento rápida (estrategia *r*) que es compensada con los cambios en la composición de la membrana celular, con diversos sistemas de asimilación de fósforo y

la disminución del contenido de su genoma (Alcaraz et al., 2008; Moreno-Letelier et al., 2011).

### *Los parámetros de crecimiento y el número de copias del operón *rrn**

La dinámica de crecimiento es considerada una herramienta importante para el análisis y caracterización de los microorganismos; porque, desde una perspectiva ecológica, describe su capacidad para responder a cambios en las condiciones ambientales y a la presencia de otros microorganismos (Monod, 1949; Neidhardt, 1999). El análisis de la dinámica de crecimiento de los *Bacillus* del VCC mostró una gran variabilidad en los parámetros cuantificados. La heterogeneidad de la tasa de crecimiento ha sido observada en otras cepas ambientales con diferente número de copias del operón *rrn* (Dethlefsen and Schmidt, 2007). Los valores de los parámetros determinados en los aislados del VCC son similares a los observados en cepas de *Bacillus* bajo condiciones extremas de crecimiento (Anexo 1); algunas de las cuáles, son especies tipo o cepas de importancia económica relacionadas con la producción o contaminación de alimentos. En trabajos previos se ha resaltado la importancia ecológica que tiene el número de copias del operón *rrn* en la adaptación bacteriana a diferentes condiciones ambientales (Elser et al., 2000; Klappenbach et al., 2000; Shrestha et al., 2007; Green et al., 2008). La variación del número de copias de este operón ha sido relacionada con su tasa de crecimiento potencial, al ligarse con la capacidad de sintetizar niveles elevados de rRNA (Codon et al., 1995; Nanamiya et al., 2010; Yano et al., 2013). Pero, de forma inesperada, el número de copias del operón en los *Bacillus* del VCC no se correlacionó con los parámetros de crecimiento estimados. Sin embargo, la dinámica de crecimiento de las cepas del VCC podría estarse definiendo por la combinación de diversas respuestas fisiológicas que no están acopladas al número de copias del operón, como podrían ser variaciones en la tasa transcripcional o en los procesos de asignación de recursos a nivel intra- e intercelular.

En las diferentes dinámicas de crecimiento descritas por los aislados de *Bacillus* del VCC, no sólo se observó que varios de los parámetros estaban fuera de lo estimado en otras cepas del género; sino que presentaban una gran variación que parecía no estar relacionada con la historia evolutiva, con el sitio de aislamiento o con el número de copias del operón *rrn*. Por lo que, es probable que la oligotrofia extrema del ecosistema está influyendo significativamente en la dinámica de crecimiento de estas bacterias. En

este sentido, los tiempos de adaptación largos están relacionados con condiciones de estrés que restringen la velocidad de crecimiento, como lo es la limitación en la disponibilidad de nutrientes (Chorin et al., 1997; Schaechter, 2006; Antolinos et al., 2011, 2012). Además, la variabilidad en la biomasa de crecimiento que fue alcanzada por cada aislado no sólo fue determinada por cantidad de nutrientes disponibles, ya que puede ser afectada por los desechos acumulados durante la fase exponencial (Buchanan et al., 1997; Chorin et al., 1997). Además, los tiempos largos de duplicación son característicos de bacterias que viven en otros ambientes oligotróficos (Vieria-Silva and Rocha, 2010). De hecho, algunas bacterias que viven bajo condiciones de extrema limitación nutricional pueden tener tiempos de generación que alcanzan los cientos de años (Jørgensen and Boetius, 2007; Labonté et al., 2015). Por lo tanto, las propiedades de crecimiento de los *Bacillus* que viven bajo la extrema oligotrofia del VCC están involucradas respuestas complejas a las condiciones ambientales que están determinadas por su potencial genético.

#### *El número de copias del operón *rrn* y la disponibilidad de fósforo en el VCC*

El sistema hidrológico del VCC se caracteriza por tener una baja disponibilidad de fósforo (P) en el agua, suelo y sedimento (Elser et al., 2006; Peimbert et al., 2012); condición ambiental que hace que la elevada variación del número de copias del operón *rrn* sea algo notable, debido a que los ecosistemas que se encuentran limitados en este elemento se caracterizan por una dominancia de grupos bacterianos que tienen un número reducido de copias del operón. Trabajos previos han analizado la relación que existe entre el número de copias del operón y la disponibilidad de P ambiental; describiendo una conexión de este número con la tasa de crecimiento y con la producción de RNA ribosomal con un alto contenido de P (Elser, 2003; Jeyasingh and Weider, 2007). En este sentido, se ha observado que las bacterias que habitan en ecosistemas oligotróficos tienen un número reducido de copias del operón *rrn*, de 1 a 2 copias (Fegatella et al., 1998; Strehl et al., 1999; Lauro et al., 2009). Por lo que, múltiples copias del operón otorgarían una ventaja en la tasa de crecimiento cuando los recursos son abundantes; pero representarían un costo competitivo cuando los recursos son limitados, por la sobreproducción de RNA ribosomal (Weider et al., 2005; Dethlefsen and Schmidt, 2007; Jeyasingh and Weider, 2007). En el presente estudio, se observó que algunos aislados de *Bacillus* tienen 6 copias del operón; sin embargo, es un

número relativamente alto en comparación a grupos bacterianos que viven bajo condiciones oligotróficas (Fegatella et al., 1998; Strehl et al., 1999; Lauro et al., 2009). El número de copias del operón *rrn* es un carácter funcional que está relacionado con la historia evolutiva del género *Bacillus* y, que además, estaría ligado a su versatilidad ecológica y adaptabilidad a diferentes condiciones ambientales (Klappenbach et al., 2000; Feldgarden et al., 2003; Stevenson and Schmidt, 2004; Connor et al., 2010).

Una posible explicación a la incongruencia observada en este estudio, sería que los *Bacillus* del VCC no están pagando el costo de tener un número elevado de copias del operón bajo las condiciones limitadas de nutrientes del ecosistema; debido a su capacidad de formar esporas que pueden germinar en mejores condiciones ambientales. Esta capacidad de respuesta a condiciones de estrés ha sido relacionada con la multiplicidad de copias en este género (Nanamiya et al., 2010; Yano et al., 2013). De hecho, las bacterias endémicas como *B. coahuilensis* m4-4 y *B. sp.* m3-13 tienen 8 y 9 copias del operón, respectivamente; número de copias que es similar a otras cepas formadoras de esporas, como *B. halodurans* C-125 (8 copias) y *B. amyloliquefaciens* CC178 (9 copias). Sin embargo, la formación de esporas en los *Bacillus* del VCC no es algo común, ya que sus genomas han mostrado una pérdida considerable de genes relacionados con la esporulación (Alcaraz et al., 2010). Esto ha sido confirmado en análisis exploratorios con algunos de los aislados utilizados en el presente estudio (datos sin publicar). Por lo tanto, la variación del número de copias del operón *rrn* podría representar a una gama amplia de estrategias de historia de vida que permiten a cada taxón utilizar diferentes tipos de recursos o de vivir en diferentes hábitats que disminuyen los niveles de competencia, como podría ocurrir en los sedimentos que presentan una mayor estructuración en comparación a la columna de agua. De hecho, este tipo de estrategias han sido observadas en otras comunidades microbianas que presentan una heterogeneidad funcional similar en otros caracteres de importancia ecológica (Martínez-Alonso et al., 2004; Giovannoni and Stingl, 2005; Martiny et al., 2006). Sin embargo, es necesario realizar trabajos adicionales que permitan comprender la importancia de mantener un número elevado de copias del operón *rrn* por los *Bacillus* del VCC.

Los resultados obtenidos sobre la diversidad de copias del operón *rrn* en los aislados del género *Bacillus* del VCC no se ajustan al contexto planteado por la

Hipótesis de la Tasa de Crecimiento (HTC) (Elser et al., 2000; Elser, 2006). Por ejemplo, el aislado con el mayor número de copias del operón *rrn* (A:14, *B. cereus*), tuvo la tasa de crecimiento más lenta y la mayor proporción N:P (965). Además de que varios de los aislados que tuvieron el menor número de copias del operón fueron los que mostraron el mayor contenido de P (%), contrario a lo estipulado por dicha Hipótesis. Sin embargo, el crecimiento lento y la proporción elevada de N:P del aislado A, concuerdan con lo esperado en una bacteria con un elevado número de copias del operón que habita un ambiente oligotrófico. Por lo que, pareciera que los aislados que tuvieron el menor número de copias del operón *rrn* pueden desenvolverse mejor en las condiciones limitadas de P del VCC. Sin embargo, para probar eficientemente el fundamento genético de la HTC cada aislado debe de ser analizado en condiciones nutricionales óptimas que permitan la identificación de las implicaciones asociadas a capacidad de crecimiento máximo. De hecho, esta predicción es apoyada por la enorme dispersión observada en los parámetros de crecimiento en los aislados con mayor número de copias. Es decir, los aislados con menos copias del operón tienen una gama limitada de formas de crecimiento, sin importar el medio (nutrientes); mientras que los aislados con el mayor número de copias del operón pueden tener una gama amplia de formas de crecimiento, que dependen de las condiciones presentes en el ambiente. Otra probable explicación al desacoplamiento que se observó entre el número de copias del operón, la tasa de crecimiento y la estequiometría celular, sería que los *Bacillus* que habitan el VCC han sido seleccionados por una fina señalización ligada al suministro de nutrientes o por la variación en la tasa de expresión de los genes ribosomales (rRNA); por lo que, de este modo, se desconecta el número de copias del operón de la tasa de crecimiento y de la producción de RNA (p. ej. los aislados con pocas copias del operón pueden tener niveles elevados de transcripción en cada copias; mientras que los aislados con más copias regulan de forma rigurosa la expresión de cada copia). Dado que los datos obtenidos en el presente estudio no proporcionan una explicación clara de la importancia del fundamento genético de la HTC en la diversidad del *Bacillus* del VCC, sería importante considerar el análisis de un mayor número de grupos taxonómicos bajo diversas condiciones de crecimiento; diseñando estrategias experimentales que superen las limitaciones asociadas a la fisiología, a la inercia filogenética y a las estrategias específicas del ciclo de vida de los taxones, para evitar confusiones durante la interpretación de los resultados.



La diversidad de patrones de crecimiento descritos por los aislados de *Bacillus* del VCC, así como la variación en el número de copias del operón *rrn*, podrían estar representando estrategias ecológicas que les permiten persistir en este ecosistema extremadamente oligotrófico. Estrategias análogas han sido descritas en diversos organismos, en los que sus parámetros de crecimiento han sido afectados por factores bióticos y ambientales (Pianka, 1970; Page, 2002; Lipowsky et al., 2012). La variación en el tiempo de duración de la fase Lag podría ayudar a la adaptación de los organismos a cambios en las condiciones ambientales, obteniendo un crecimiento óptimo con tiempos generacionales largos (Crooks, 2005; Wangen and Webster, 2006; Daehler, 2009). Así también, la disminución en la tasa de crecimiento es el resultado de una estrecha interacción entre diversos organismos y diferentes factores de estrés (Gao et al., 2013; Tsugama et al., 2014). Hasta la fecha, en diversos grupos bacterianos, estas estrategias ecológicas sólo han sido relacionadas con la disponibilidad de nutrientes (Klappenbach et al., 2000; Fierer et al., 2007; Shrestha et al., 2007). Sin embargo, la intensidad a la que ocurren las interacciones interespecíficas que establecen la coexistencia bacteriana, podrían estar influyendo en la dinámica de crecimiento de los *Bacillus*; las cuales, tienen una magnitud particular en el VCC (Souza et al., 2012; Aguirre-von-Wobeser et al., 2013; Pérez-Gutiérrez et al., 2013). Las inferencias anteriores sugieren la presencia de una estrategia tipo *bet-hedging* por parte de las bacterias del VCC. El *bet-hedging* es una teoría evolutiva que trata de explicar y describir las respuestas adaptativas a cambios ambientales impredecibles y temporales; aumentando la adecuación de diversos fenotipos dentro de una población (Simons, 2011; Starrfelt and Kokko, 2012). Esta teoría ha sido utilizada para analizar la heterogeneidad fenotípica en poblaciones de animales y plantas (Childs et al., 2010; Gremer and Venable, 2014; Rajon et al., 2014); sin embargo, está teniendo un impacto importante en el estudio de la diversidad y evolución microbiana (de Jong et al., 2011). El *bet-hedging* en los microorganismos está siendo vinculado con la generación de fenotipos heterogéneos en respuesta a cambios inesperados en el ambiente; los cuales, desarrollan estrategias que les permiten estar capacitados para desempeñarse de forma diferente a lo largo del tiempo y, así favorecer su sobrevivencia y permanencia (Siebring et al., 2014; Grimbergen et al., 2015). Por lo que, la regulación de la expresión de los genes ribosomales podría depender de la oligotrofia del ecosistema (reflejado en el bajo contenido de P y en las altas proporciones de N:P); favoreciendo la formación de

diferentes genotipos (copias del operón *rrn*) y, como consecuencia, de diversas formas de crecimiento.

### *La expresión de proteínas y la disponibilidad de nutrientes*

La disponibilidad de nutrientes es determinante para la síntesis de proteínas durante el crecimiento bacteriano (Dethlefsen and Schmidt, 2007; Klumpp et al., 2009; Scott et al., 2010). Por lo que, la determinación de la dinámica de crecimiento bajo condiciones similares a las presentes en los ambientes naturales es la mejor forma de comprender la fisiología bacteriana (Neidhardt, 1999; Schaechter, 2006). La cuantificación del contenido de proteínas durante el crecimiento de los aislados de *Bacillus* del VCC mostró una tendencia general de una mayor expresión durante la fase exponencial, seguida de la fase Lag ( $\lambda$ ) y con el menor nivel de expresión durante la fase estacionaria. Trabajos previos sólo describen la disminución del contenido proteico de la fase exponencial a la fase estacionaria (Goelzer and Fromion, 2011; Chubukov and Sauer, 2014). Sin embargo, Peleg and Corradine (2011), sugieren que para poder comprender la influencia de las condiciones ambientales sobre el crecimiento bacteriano es necesario analizar todas las fases de crecimiento. El contenido proteico de los aislados de *Bacillus* del VCC fue tan heterogéneo que mostró poca relación con los parámetros de crecimiento determinados; lo cual, podría ser el resultado de la variabilidad en las dinámicas que mostraron dichos aislados. Anteriormente, se ha sugerido que la tasa de crecimiento máxima es una consecuencia de la cantidad de recursos que son utilizados para la síntesis de proteínas y de la eficiencia del proceso de traducción molecular (Scott and Hwa, 2011). Los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron una gran heterogeneidad entre la tasa de crecimiento específica ( $\mu_{max}$ ) y el contenido de proteínas que fue expresado durante la fase exponencial. El aislado que mostró la mayor tasa de crecimiento no fue el que tuvo el mayor nivel de expresión de proteínas; además, de que algunos aislados que fueron más lentos en su crecimiento mostraron mayor contenido proteico en comparación con dicho aislado. Estas discrepancias podrían estar reflejando que bajo ciertas condiciones ambientales, la tasa de crecimiento no es un parámetro que está siempre acoplado a la distribución de recursos para obtener una tasa de expresión elevada. Una posible explicación a esta discrepancia podría ser la variación en estrategias de crecimiento, que incluyen la prolongación de la fase exponencial para aumentar la expresión de proteínas

asimilativas que permite el aprovechamiento máximo de los recursos disponibles bajo condiciones limitadas (Bren et al., 2013). Por un lado, esto podría estar explicando la variación en las dinámicas de crecimiento de los *Bacillus* del VCC o, por otro lado, esta heterogeneidad en la expresión de proteínas podría ser una consecuencia del medio experimental que fue utilizado para la determinación de los parámetros de crecimiento. Aunque, este experimento fue diseñado para imitar las condiciones ambientales y nutricionales del VCC; es obvio que existen otros factores ecológicos que están influyendo en dinámica de crecimiento bacteriano, como lo son los mecanismos de competencia y de *cross feeding* de la comunidad; siendo más complejos y variables que las condiciones de laboratorio (Neidhardt, 1999; Schaechter, 2006; Goelzer and Fromion, 2011).

Por otro lado, la disminución de la tasa de crecimiento durante la fase estacionaria es un mecanismo importante para tolerar las condiciones de estrés y para extender la síntesis de proteínas que permitirían la sobrevivencia y metabolización de los recursos restantes en el medio, y esperar la siguiente llegada de nutrientes (Golzer and Fromion, 2011). Lo anterior, podría explicar la variabilidad en la expresión proteica de los *Bacillus* del VCC y, como consecuencia, en la heterogeneidad de la biomasa máxima alcanzada (*A*) y en los tiempos de duplicación estimados (*td*). Hasta donde ha sido investigado, este es el primer trabajo donde es analizado el contenido de proteínas durante las tres fases del crecimiento bacteriano en aislados ambientales que proceden de un ambiente oligotrófico. Estos resultados, podrían estar indicando que la expresión de proteínas no sólo depende del número de copias del operón *rrn* y que tampoco está ligada a los parámetros de crecimiento. Por lo tanto, la variación observada en el crecimiento y en la expresión proteica podrían ser mecanismos importantes para la adaptación bacteriana a diversas condiciones ambientales; como fue observado en los aislados de *Bacillus* del oligotrófico VCC.

## CONCLUSIONES

- i. El análisis filogenético realizado con la región HV 5' del gen 16S rRNA permitió la identificación de los aislados del VCC; la cuales, se relacionaron con diversas cepas que fueron aisladas en hábitats con diferentes condiciones ambientales. Este análisis confirmó la presencia de diversos grupos de *Bacillus* descritos en trabajos anteriores realizados en este ecosistema; sin embargo, dado el nivel de conservación de esta región genética, se logró la corrección de la identidad de un aislado que se relacionó con el género *Staphylococcus*. Por lo que, esta región nucleotídica permite la identificación rápida y veraz de cepas ambientales relacionadas con el género *Bacillus*.
- ii. El número de copias del operón *rrn* en los aislados del VCC se encuentra dentro del intervalo observado en análisis genómicos en diferentes cepas del género *Bacillus*. Estos resultados apoyan la hipótesis sobre la relación que existe entre el número de copias del operón y la historia de vida de los géneros bacterianos; ya que los bacilos del VCC no mostraron una tendencia de disminuir el número de copias del operón en respuesta a la disponibilidad de P. Sin embargo, algunos de los grupos filogenéticos identificados mostraron una variabilidad intraespecífica que no había sido observada en algunas especies del género. Por lo que, el presente trabajo contribuyó en el conocimiento del número de copias de este carácter funcional que ayudaría a comprender sus propiedades fisiológicas y el papel ecológico del género *Bacillus* en diferentes condiciones ambientales.
- iii. El análisis de la dinámica de crecimiento en los aislados del VCC mostró una heterogeneidad similar a lo observado en otras bacterias ambientales; reflejando una gran variabilidad de respuestas fisiológicas que no están correlacionadas con el número de copias del operón *rrn*. Por lo que, es probable que el potencial genético de cada una de las cepas de *Bacillus* este definiendo su crecimiento a través de redes de respuestas a las condiciones ambientales y nutricionales del VCC que disminuirían los niveles de competencia por los recursos.
- iv. El desacoplamiento del número de copias del operón *rrn* con la dinámica de crecimiento de los aislados del VCC dejó fuera del contexto a la Hipótesis de la Tasa de Crecimiento; lo cual, se vio reflejado en la variación de su composición química durante la fase exponencial. Sin embargo, los aislados con el menor

número de copias del operón parecen estar mejor adaptados a la oligotrofia del VCC, a pesar de tener un número de copias considerablemente mayor a lo observado en otras bacterias que habitan otros ecosistemas limitados en fósforo.

- v. La cuantificación del contenido de proteínas en los aislados del VCC mostró una heterogeneidad similar a lo observado en los parámetros estimados para describir su dinámica de crecimiento. Por lo que, el contenido de proteínas durante la dinámica de crecimiento puede ser el resultado de la presión fisiológica que genera la limitada disponibilidad de fósforo que caracteriza al sistema hidrológico del VCC.
- vi. Los resultados del presente trabajo muestran que el número de copias del operón *rrn* tiene una variación considerable en los aislados ambientales del género *Bacillus*; variación que se vio reflejada en sus estrategias de crecimiento, composición química y contenido de proteínas. Sin embargo, el número de copias del operón parece estar desligado considerablemente del crecimiento y de la composición química de este clado bacteriano. Es probable que la oligotrofia extrema del VCC haya impuesto restricciones fisiológicas importantes en la distribución de recursos y en la tasa de crecimiento de las bacterias; afectando la producción de ribosomas a través de regulación de la expresión de los genes ribosomales de cada una de las copias del operón. Por lo que, se requiere de investigación adicional sobre influencia de la regulación genética en la síntesis de ribosomas y en la expresión de proteínas, y como ambas influyen en la estequiometría celular. Así también, se requieren diversos experimentos de competencia entre diferentes cepas de *Bacillus* aislados de diferentes sitios del VCC bajo diversas restricciones nutricionales; para así comprender la importancia ecológica y evolutiva de la variación del número de copias del operón *rrn* en la diversidad microbiana que habita el VCC.

## PERSPECTIVAS

- I. Análisis comparativo de la dinámica de crecimiento y de las implicaciones fisiológicas en los genotipos del género *Bacillus* asociadas con la disponibilidad de nutrientes del VCC.

La determinación de los parámetros de crecimiento en condiciones limitadas y enriquecidas de nutrientes mostrará si la dinámica de crecimiento de los genotipos descritos en el presente trabajo es dependiente de la disponibilidad de recursos del VCC. La descripción de las implicaciones fisiológicas se realizará a través de la cuantificación del contenido de RNA y de proteínas totales en muestras de biomasa colectadas en cada una de las etapas de crecimiento; así como, con el análisis del contenido de C, N y P (%) durante la fase exponencial. Con lo cual, se podrá confirmar si los bacilos del VCC se siguen encontrando fuera de los establecido por la Hipótesis de la Tasa de Crecimiento de la Estequiometria biológica.

- II. Análisis de genómica comparada de los genotipos de *Bacillus* del VCC con diferente número de copias del operón *rrn*.

El análisis genómico de los genotipos del género *Bacillus* del VCC, permitirá la identificación y descripción de propiedades genéticas específicas que podrían estar vinculadas con la variación del número de copias del operón *rrn* y que podrían verse reflejadas en su dinámica de crecimiento. Así también, se podrá observar si la diversidad de bacilos del VCC presenta las misma capacidad de adaptación que la especie endémica *Bacillus coahuilensis* o si utilizan estrategias diferentes para disminuir la presión ambiental que representa la oligotrofia de este sistema hidrológico.

- III. Análisis de la expresión de las copias del operón *rrn* en los genotipos de *Bacillus* del VCC.

El análisis de la expresión de los operones ribosomales cuantificados en los genotipos de bacilos, mostrará si su funcionalidad es dependiente de la disponibilidad de nutrientes del VCC. Para lo cual, se pueden cuantificar su expresión por medio RT-PCR en tiempo real utilizando sondas tipo *Taq-man* específicas para cada copia de operón *rrn*. Se realizarán ensayos en condiciones limitadas y enriquecidas de nutrientes. En cada ensayo, se utilizará el genotipo con el número completo de copias del operón

(control) que será comparado con mutantes del mismo genotipo; las cuales, contiene inserciones en alguna de las copias de operón que resultan en un “codón de paro” (*stop codon*). Estas mutaciones se realizarán en cada copia de operón de forma independiente; con la finalidad de analizar su funcionalidad y así, poder correlacionar la expresión y la función del operon ribosomal durante la dinámica de crecimiento de los bacilos en diferentes condiciones nutricionales.

#### IV. Análisis comparativo de la dinámica de crecimiento y de las implicaciones fisiológicas relacionadas con la disponibilidad de nutrientes diferentes grupos bacterianos característicos del VCC.

El Valle de Cuatro Ciénegas es un sistema hidrológico que puede presentar la dominancia o distribución heterogénea de diferentes grupos bacterianos en cada una de las pozas que lo conforman. Por lo que, al cuantificar el número de copias del operón *rrn* y describir la dinámica de crecimiento en diferentes aislados pertenecientes a distintos grupos bacterianos, se podrá determinar si presentan mecanismos de respuesta similares a los observados en el género *Bacillus* o si utilizan estrategias diferenciales que permiten su coexistencia en este ecosistema oligotrófico.

## REFERENCIAS

1. Acinas, S.G., Marcelino, L.A., Klepac-Ceraj, V. and Polz, M.F. (2004). Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. *J. Bacteriol.* 186 (9), 2629-2635.
2. Aguirre-von-Wobeser, E., Soberón-Chávez, G., Eguiarte, L.E., Ponce-Soto, G.Y., Vázquez-Rosas-Landa, M. and Souza, V. (2013). Two-role model of an interaction network of free-living  $\gamma$ -proteobacteria from an oligotrophic environment. *Environ. Microbiol.* 16 (5), 1366-1377. doi:10.1111/1462-2920.12305. Epub 2013 Nov 6.
3. Alcaraz, L.D., Olmedo, G., Bonilla, G., Cerritos, R., Hernández, G., Cruz, A., et al., (2008). The genome of *Bacillus coahuilensis* reveals adaptations essential for survival in the relic of an ancient marine environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 5803-5808. doi: 10.1073/pnas.0800981105. Epub 2008 Apr 11.
4. 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, 332. doi: 10.1186/1471-2164-11-332.
5. Allers, T. and Mevarech, M. (2005). Archaeal genetics-the third way. *Nat. Rev. Genet.* 6 (1), 58-73.
6. Antolinos, V., Muñoz, M., Ros-Chumillas, M., Aznar, A., Periago, P.M. and Fernández, P.S. (2011). Combined effect of lysozyme and nisin 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. Epub 2010 Aug 1.
7. Antolinos, V., Muñoz-Cuevas, M., Ros-Chumillas, M., Periago, P.M., Fernández, 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 (1), 36-41. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.06.017. Epub 2012 Jul 2.
8. APHA. (2005). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Washington, DC: American Publish Health Association.
9. Arber, W. (2000). Genetic variation: molecular mechanism and impact on microbial evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* 24 (1), 1-7.



10. Bernstein, M. (2006). Prebiotic materials from on and off the early Earth. *Phil. Trans. R. Soc. B. Biol. Sci.* 361 (1474), 1689–1700. doi:10.1098/rstb.2006.1913.
11. Bertini, I., Gray, H.B., Lippard, S.J. and Selverstone-Valentine, J. (1994). *Bioinorganic chemistry*. University Science Books. Mill Valley, California. USA.
12. Bren, A., Hart, Y., Dekel, E., Koster, D. and Alon U. (2013). The last generation of bacterial growth in limiting nutrient. *BMC Syst. Biol.* 7, 27. doi: 10.1186/1752-0509-7-27.
13. Buchanan, R.L., Whiting, R.C. and Damert, W.C. (1997). When in simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. *Food Microbiol.* 14 (4), 313-326.
14. Burdett, I.D.J., Kirkwood, T.B.L. and Whalley, J.B. (1986). Growth kinetics of individual *Bacillus subtilis* cells and correlation with nucleoid extension. *J. Bacteriol.* 167 (1), 219-230.
15. Cerritos, R., Vinuesa, P., Eguiarte, L.E., Herrera-Estrella, L., Alcaraz-Peraza, L.D., Arvizu-Gómez, J.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 (Pt.4), 919-923. doi: 10.1099/ijs.0.64959-0.
16. Cerritos, R., Eguiarte, L.E., Avitia, M., Siefert, J., Travisano, M., Rodríguez-Verdugo, A. and Souza, V. (2011). Diversity of culturable thermo-resistant aquatic bacteria along an environmental gradient in Cuatro Ciénegas, Coahuila, México. *Antonie Van Leeuwenhoek* 99 (2), 303-318. doi: 10.1007/s10482-010-9490-9. Epub 2010 Aug 15.
17. Childs, E., Metcalf, C.J. and Rees, M. (2010). Evolutionary bet-hedging in the real world: empirical and challenges revealed by plants. *Proc. Biol. Sci.* 277 (1697), 3055-3064. doi: 10.1098/rspb.2010.0707. Epub 2010 Jun 23.
18. Chorin, E., Thuault, D., Cléret, J.J. and Bourgeois, C.M. (1997). Modeling *Bacillus cereus* growth. *Int. J. Food Microbiol.* 38 (2-3), 229-234.
19. Chubukov, V. and Sauer, U. (2014). Environmental dependence of stationary-phase metabolism in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 80 (9), 2901-2909. doi: 10.1128/AEM.00061-14. Epub 2014 Feb 28.
20. Cleaves II, H.J. (2013). Prebiotic chemistry: geochemical context and reactions screening. *Life (Basel)* 3 (2), 331-345. doi:10.3390/life3020331.

21. Codon, C., Liveris, D., Squires, C., Schwartz, I. and Squires, C.L. (1995). rRNA operon multiplicity in *Escherichia coli* and the physiological implications of *rrn* inactivation. *J. Bacteriol.* 177 (4), 4152-4156.
22. Collins, J.F. and Richmond, M.H. (1962). Rate of growth of *Bacillus cereus* between divisions. *J. Gen. Microbiol.* 28, 15-33.
23. Connor, N., Sikorski, J., Rooney, A.P., Kopac, S., Koeppel, A.F., Burger, A., et al., (2010). Ecology of speciation in the genus *Bacillus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (5), 1349-1358. doi: 10.1128/AEM.01988-09. Epub 2010 Jan 4.
24. Crooks, J.A. (2005). Lag times and exotic species: the ecology and management of biological invasions in slow-motion. *Ecoscience* 12(3), 316-329. doi.org/10.2980/i1195-6860-12-3-316.1
25. Daehler, C.C. (2009). Short lag times for invasive tropical plants: evidence from experimental planting in Hawaii. *PLoS ONE* 4(2), e4462. doi:10.1371/journal.pone.0004462.
26. Daubin, V., Moran, N.A. and Ochman, H. (2003). Phylogenetics and the cohesion of bacterial genomes. *Science* 301 (5634), 829-832.
27. de Jong, I.G., Haccou, P. and Kuipers, O.P. (2011). Bet hedging or not? A guide to proper classification of microbial survival strategies. *Bioessays* 33 (3), 215-223. doi: 10.1002/bies.201000127. Epub 2011 Jan 21.
28. Delgado, G, Souza, V., Morales, R., Cerritos, R., González-González, A., Méndez, J.L., et al., (2013). Genetic characterization of atypical *Citrobacter freundii*. *PLoS ONE* 8(9), e74120. doi:10.1371/journal.pone.0074120.
29. Delsuc, F., Brinkmann H. and Philippe, H. (2005). Phylogenomics and the reconstruction of the tree of life. *Nat. Rev. Genet.* 6 (5), 361-375.
30. Des Marais, D.J. and Walter, M.R. (1999). Astrobiology: exploring the origins, evolution, and distribution of life in the universe. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 30, 397-420.
31. Dethlefsen, L., and Schmidt, T.M. (2007). Performance of the translational apparatus varies with the ecological strategies of bacteria. *J. Bacteriol.* 189 (8), 3237-3245.
32. Dufresne, A., Garczarek, L. and Partensky, F. (2005). Accelerated evolution associated with genome reduction in a free-living prokaryote. *Genome Biol.* 6 (2), R14.
33. Dyhrman, S.T., Ammerman, J.W. and Van Mooy, B.A.S. (2007). Microbes and

- the marine phosphorus cycle. *Oceanography* 20 (2), 110-116.
34. Elser, J.J., Sterner, R.W., Gorokhova, E., Fagan, W.F., Markow, T.A., Cotner, J.B., et al., (2000). Biological stoichiometry from genes to ecosystems. *Ecol. Lett.* 3, 540-550.
  35. Elser, J.J. (2003). Biological stoichiometry: a theoretical framework connecting ecosystem ecology, evolution, and biochemistry for application in astrobiology. *Int. J. Astrobiology* 2, 185-193. doi.org/10.1017/S1473550403001563.
  36. Elser, J.J., Acharya, K., Kyle, M., Cotner, J., Makino, W., Markow, T., Watts, T., Hobbie, S., Fagan, W., Schade, J., Hood, J. and Sterner, R.W. (2003). Growth rate-stoichiometry couplings in diverse biota. *Ecol. Lett.* 6, 936-943. doi: 10.1046/j.1461-0248.2003.00518.x
  37. Elser, J.J., Watts, J., Schampel, J.H. and Farmer, J. (2006). Early Cambrian food webs on a trophic knife-edge? A hypothesis and preliminary data from a modern stromatolite-based ecosystem. *Ecol. Lett.* 9 (3), 295-303. doi: 10.1111/j.1461-0248.2005.00873.x
  38. Elser, J.J. (2006). Biological stoichiometry: a chemical bridge between ecosystem ecology and evolutionary biology. *Am. Nat.* 168 Suppl. 6, S25-S35.
  39. Escalante, A.E., Eguiarte, L.E., Espinosa-Asuar, L., Forney, L.J., Noguez, A.M. and Souza, V. (2008). Diversity of aquatic prokaryotic communities in the Cuatro Ciénegas Basin. *FEMS Microbiol. Ecol.* 65 (1), 50-60. doi: 10.1111/j.1574-6941.2008.00496.x. Epub 2008 May 8.
  40. Fegatella, F., Lim, J., Kjelleberg, S. and Cavicchioli, R. (1998). Implications of rRNA operon copy number and ribosome content in the marine oligotrophic ultramicrobacterium *Sphingomonas* sp. strain RB2256. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (11), 4433-4438.
  41. Feldgarden, M., Byrd, N. and Cohan, F.M. (2003). Gradual evolution in bacteria: evidence from *Bacillus* systematics. *Microbiology* 149 (Pt 12), 3565-3573.
  42. Fierer, N., Brandford, M.A. and Jackson, R.B. (2007). Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology* 88 (6), 1354-1364.
  43. Folmsbee, M.J., McInerney, M.J. and Nagle, D.P. (2004). Anaerobic growth of *Bacillus Mojavensis* and *Bacillus subtilis* requires deoxyribonucleosides or DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (9), 5252-5257.
  44. Frost, P.C. and Elser, J.J. (2008). Biological stoichiometry. In: *Encyclopedia of Life Sciences* (ELS). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.

doi:10.1002/9780470015902.a0021229

45. Gao, R., Wan, Z.Y. and Wong, S.M. (2013). Plant growth retardation and conserved miRNAs are correlated to hibiscus chlorotic ringspot virus infection. *PLoS ONE* 8 (12), e85476. doi:10.1371/journal.pone.0085476.
46. Giovannoni, S.J. and Stingl, U. (2005). Molecular diversity and ecology of microbial plankton. *Nature* 437 (7057), 343-348.
47. Goelzer, A. and Fromion, V. (2011). Bacterial growth rate reflects a bottleneck in resource allocation. *Biochim. Biophys. Acta* 1810 (10), 978-988. doi: 10.1016/j.bbagen.2011.05.014. Epub 2011 Jun 12.
48. Goto, K., Omura, 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), 1-8.
49. Green, J.L., Bohannan, B.J.M. and Whitaker, R.J. (2008). Microbial biogeography: from taxonomy to traits. *Science* 320 (5879), 1039-1042. doi: 10.1126/science.1153475.
50. Gregory, T.R. and DeSalle, R. (2005). The evolution of genome size in prokaryotes. In: *The evolution of the genome* (Ed. T.R. Gregory). Elsevier, San Diego. 631-640.
51. Gremer, J.R. and Venable, D.L. (2014). Bet hedging in desert winter annual plants: optimal germination strategies in a variable environment. *Ecol. Lett.* 17 (3), 380-387. doi: 10.1111/ele.12241. Epub 2014 Jan 7.
52. Grimbergen, A.J., Siebring, J., Solopova, A. and Kuipers, O.P. (2015). Microbial bet-hedging: the power of being different. *Curr. Opin. Microbiol.* 25, 67-72. doi: 10.1016/j.mib.2015.04.008. Epub 2015 May 27.
53. Gürtler, V. and Mayall, B.C. (2001). Genomic approaches to typing, taxonomy and evolution of bacterial isolates. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51 (Pt.1), 3-16.
54. Horneck, G. (1995). Exobiology, the study of the origin, evolution and distribution of life within the context of cosmic evolution: a review. *Planet. Space Sci.* 43 (1-2), 189-217.
55. Hughes, A.R., Inouye, B.D., Johnson, M.T.J., Underwood, N. and Vellend, M. (2008). Ecological consequences of genetic diversity. *Ecol. Lett.* 11 (6), 609-623. doi: 10.1111/j.1461-0248.2008.01179.x. Epub 2008 Apr 8.
56. Jeyasingh, P.D. and Weider, L.J. (2007). Fundamental links between genes and elements: evolutionary implications of ecological stoichiometry. *Mol. Ecol.* 16

- (22), 4649-4661. doi:10.1111/j.1365-294X.2007.03558.x.
57. Johnson, Z.I., Zinser, E.R., Coe, A., McNulty, N.P., Woodward, E.M. and Chisholm S.W. (2006). Niche partitioning among *Prochlorococcus* ecotypes along ocean-scale environmental gradients. *Science* 311 (5768), 1737-1740.
58. Jones, R.D. (2002). Phosphorus cycling. In: *Manual of environmental microbiology* (Eds. C.J. Hurst, R.L. Crawford, G.R. Knudsen, M.J. McInerney, L.D. Stelzenbach). ASM Press, Washington DC (USA), 450-455.
59. Joyce, G.F. (2002). The antiquity of RNA-based evolution. *Nature* 418 (6894), 214-221.
60. Jørgensen, B.B. and Boetius, A. (2007). Feast and famine--microbial life in the deep-sea bed. *Nat. Rev. Microbiol.* 5 (10), 770-81.
61. Kacena, M.A., Merrell, G.A., Manfredi, B., Smith, E.E., Klaus, D.M. and Todd, P. (1999). Bacterial growth in space flight: logistic growth curve parameters for *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51 (2), 229-234.
62. Kasting, J.F. and Siefert, J.L. (2002). Life and the evolution of Earth's atmosphere. *Science* 296 (5570), 1066-1068.
63. Kettler, G.C., Martiny, A.C., Huang, K., Zucker, J., Coleman, M.L., Rodriguez, S., Chen, F., Lapidus, A., Ferreira, S., Johnson, J., Steglich, C., Church, G.M., Richardson, P. and Chisholm, S.W. (2007). Patterns and implications of gene gain and loss in the evolution of *Prochlorococcus*. *PLoS Genet.* 3 (12), e231.doi:10.1371/journal.pgen.0030231
64. Klappenbach, J.A., Dunbar, J.M. and Schmidt, T.M. (2000). rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (4), 1328-1333.
65. Kleidon, A. (2010). Life, hierarchy, and the thermodynamic machinery of planet Earth. *Phys. Life Rev.* 7 (4), 424-460. doi:10.1016/j.plrev.2010.10.002
66. Klumpp, S., Zhang, Z. and Hwa, T. (2009). Growth rate-dependent global effects on gene expression in bacteria. *Cell* 139 (7), 1366-1375. doi: 10.1016/j.cell.2009.12.001.
67. Kooning, E.V. and Wolf, Y.I. (2012). Evolution of microbes and virus: a paradigm shift in evolutionary biology? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2 (Article 119), 1-15. doi: 10.3389/fcimb.2012.00119
68. Labonté, J.M., Field, E.K., Lau, M., Chivian, D., Van Heerden, E., Wommack,

- K.E., et al., (2015). Single cell genomics indicates horizontal gene transfer and viral infections in a deep subsurface Firmicutes population. *Front. Microbiol.* 6, 349. doi: 10.3389/fmicb.2015.00349. eCollection 2015.
69. Lampert, W. and Sommer, U. (2007). *Limnoecology*. 2nd edition. Oxford University Press Inc., New York. USA.
70. Lauro, F.M., McDougald, D., Thomas, T., Williams, T.J., Egan, S., Rice, S., et al., (2009). The genomic basis of trophic strategy in marine bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106 (37), 5527-15533. doi: 10.1073/pnas.0903507106. Epub 2009 Sep 8.
71. Lipowsky, A., Roscher, C., Schumacher, J. and Schmid, B. (2012). Density-independent mortality and increasing plant diversity are associated with differentiation of *Taraxacum officinale* into r- and K-strategists. *PLoS ONE* 7 (1), e28121. doi:10.1371/journal.pone.0028121
72. Liu, S., Hessel, A. and Sanderson, K.E. (1993). Genomic mapping with I-CeuI, an intron-encoded endonuclease specific for genes for ribosomal RNA, in *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, and other bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 (14), 6874–6878.
73. 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 (3), 244-250. doi: 10.1111/j.1461-0248.2010.01577.x
74. Luo, H., Friedman, R., Tang, J. and Hughes, A. (2011). Genome reduction by deletions of paralogs in the marine cyanobacterium *Prochlorococcus*. *Mol. Biol. Evol.* 28 (10), 2751-2760. doi: 10.1093/molbev/msr081. Epub 2011 Apr 29.
75. Maciá, E. (2005). The role of phosphorus in chemical evolution. *Chem. Soc. Rev.* 34 (8), 691-701.
76. Manahan, SE. (2009). The phosphorus cycle. In: *Environmental Chemistry*. 9th edition. CRC Press. USA.
77. Martínez-Alonso, M., Mir, J., Caumette, P., Gaju, N., Guerrero, R. and Esteve, I. (2004). Distribution of phototrophic populations and primary production in a microbial mat from the Ebro Delta, Spain. *Int. Microbiol.* 7 (1), 19-25.
78. 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 (33), 12552-7.

79. Martiny, A.C., Huang, Y. and Li, W. (2009). Occurrence of phosphate acquisition genes in *Prochlorococcus* cells from different ocean regions. *Environ. Microbiol.* 11 (6), 1340-1347. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.01860.x. Epub 2009 Feb 2.
80. Martiny, A.C., Treseder, K. and Pusch, G. (2013). Phylogenetic conservatism of functional traits in microorganisms. *ISME J.* 7 (4), 830–838. doi: 10.1038/ismej.2012.160. Epub 2012 Dec 13.
81. McGill, B.J., Enquist, B.J., Weiher, E. and Westoby, M. (2006). Rebuilding community ecology from functional traits. *Trends Ecol. Evol.* 21 (4), 178-185.
82. Membré, J.M., Leporq, B., Vialette, M., Mettler, E., Perrier, L., Thuault, D. and Zwietering, M. (2005). Temperature effect on bacterial growth rate: quantitative approach including cardinal values and variability estimates to perform growth simulations on/in food. *Int. J. Food Microbiol.* 100 (1-3), 179-186.
83. Mira, A., Ochman, H. and Moran, A. (2001). Deletional bias and the evolution of bacterial genome. *Trends Genet.* 17 (10), 589-596.
84. Monod, J. (1949). The growth of bacterial cultures. *Annu. Rev. Microbiol.* 3, 371-394.
85. Moreno-Letelier, A., Olemdo, G., Eguiarte, L.E., Martinez-Castilla, L. and Souza, V. (2011). Parallel evolution and horizontal gene transfer of the *pst* operon in Firmicutes from oligotrophic environments. *Int. J. Evol. Biol.* 2011:781642. doi: 10.4061/2011/781642.
86. Nakasone, K., Noriaki, M., Yoshihiro, T., Rumie, S., Go, M., Tokuki, S., et al., (2000). Characterization and comparative study of the *rrn* operons of alkaliphilic *Bacillus halodurans* C-125. *Extremophiles* 4 (4), 209-214.
87. Nanamiya, 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 (Pt. 10), 2944-2952. doi: 10.1099/mic.0.035295-0. Epub 2010 Jul 15.
88. Neidhardt, F.C. (1999). Bacterial growth: constant obsession with  $dN/dt$ . *J. Bacteriol.* 181 (24), 7405-7408.
89. Ng, T.M. and Schaffner, D.W. (1997). Mathematical models for the effects of pH, temperature, and sodium chloride on the growth of *Bacillus*

- stearothermophilus* in salty carrots. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (4), 1237-1243.
90. Obernosterer, I., Kawasaki, N. and Benner, R. (2003). P-limitation of respiration in the Sargasso Sea and uncoupling of bacteria from P-regeneration in size-fractionation experiments. *Aquat. Microb. Ecol.* 32, 229-237
91. Ochman, H. and Davalos, L.M. (2006). The nature and dynamics of bacterial genomes. *Science* 311 (5768), 1730-1733.
92. Ochman, H., Liu, R. and Rocha, E.P.C. (2007). Erosion of interaction networks in reduced and degraded genomes. *J. Exp. Zool. B. Mol. Dev. Evol.* 308 (1), 97-103.
93. Oren, A. (2004). Prokaryote diversity and taxonomy: current status and future challenges. *Philos. Trans. R. Soc. B. Biol. Sci.* 359 (1444), 623-638.
94. Pace, N.R. (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276 (7613), 734-740. doi: 10.1126/science.276.5313.734
95. Page, C.N. (2002). Ecological strategies in fern evolution: a neopteridological overview. *Rev. Palaeobot. Palynol.* 119 (1-2), 1-33.
96. Palmisano, M.M., Nakamura, L.K., Duncan, K.E., Istock, C.A. and Cohan, F.M. (2001). *Bacillus sonorensis* sp. nov., a close relative of *Bacillus licheniformis*, isolated from soil in the Sonoran Desert, Arizona. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51 (Pt. 5), 1671-1679.
97. Pasek, M.A. (2008). Rethinking early Earth phosphorus geochemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105 (3), 853-858. doi\_10.1073\_pnas.0708205105.
98. Pasek, M., Herschy, B. and Kee, T.P. (2015). Phosphorus: a case for mineral-organic reactions in prebiotic chemistry. *Orig. Life Evol. Biosph.* 45 (1-2), 207-218. doi: 10.1007/s11084-015-9420-y.
99. Paytan, A. and McLaughlin K. (2007). The oceanic phosphorus cycle. *Chem. Rev.* 107 (2), 563-576.
100. Peimbert, M., Alcaraz, L.D., Bonilla-Rosso, G., Olmedo-Alvarez, G., García-Oliva, F., Segovia, L., et al., (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), 648-658. doi: 10.1089/ast.2011.0694.
101. Peleg, M. and Corradini, M.G. (2011). Microbial growth curves: what the models tell us and what they cannot. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 51 (10), 917-945. doi:10.1080/10408398.2011.570463
  102. Pérez-Gutiérrez, R.A., López-Ramírez, V., Islas, A., Alcaraz, L.D., Hernández-González, I., Luna Oliviera, et al., (2013). Antagonism influences assembly of a *Bacillus* guild in a local community and is depicted as a food-chain network. *ISME J.* 7 (3), 487-497. doi: 10.1038/ismej.2012.119. Epub 2012 Oct 25.
  103. Pianka, E.R. (1970). On r- and K-Selection. *Am. Nat.* 104 (940), 592-597.
  104. Powell, E.O. (1956). Growth rate and generation time of bacteria, with special reference to continuous culture. *J. Gen. Microbiol.* 15 (3), 492-511.
  105. Prüß, B.M., Francis, K.P., von Stetten, F. and Scherer, S. (1999). Correlation of 16S ribosomal DNA signature with temperature-dependent growth rates of mesophilic and psychrotolerant strains of the *Bacillus cereus* group. *J. Bacteriol.* 181 (8), 2624-2630.
  106. Rajon, E., Desouhant, E., Chevalier, M., Débias, F. and Menu, F. (2014). The evolution of bet hedging in response to local ecological conditions. *Am. Nat.* 184 (1), E1-15. doi: 10.1086/676506. Epub 2014 May 23.
  107. Rastogi, R., Wu, M., Dasgupta, I. and Fox, G.E. (2009). Visualization of ribosomal RNA operon copy number distribution. *BMC Microbiol.* 9: doi: 10.1186/1471-2180-9-208.
  108. Ratkowsky, D.A., Lowry, R.K., McMeekin, T.A., Stokes, A.N. and Chandler, R.E. (1983). Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. *J. Bacteriol.* 154 (3), 1222-1226.
  109. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. 9.31–9.40.
  110. Sato, N. (2004). Roles of the acidic lipids sulfoquinovosyl diacylglycerol and phosphatidylglycerol in photosynthesis: their specificity and evolution. *J. Plant Res.* 117 (6), 495-505.
  111. Schaechter, M. (2006). From growth physiology to system biology. *Int. Microbiol.* 9 (3), 157-161.

112. Schwartz, A.W. (2006). Phosphorus in prebiotic chemistry. *Philos. Trans. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 361 (1474), 1743-1749; discussion 1749.
113. Scott, M. and Hwa, T. (2011). Bacterial growth laws and their applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22 (4), 559-565. doi: 10.1016/j.copbio.2011.04.014. Epub 2011 May 16.
114. Scott, M., Gunderson, C.W., Mateescu, E.M., Zhang, Z. and Hwa, T. (2010). Interdependence of cell growth and gene expression: origins and consequences. *Science* 330 (6007), 1099-1102. doi: 10.1126/science.1192588.
115. Shrestha, P.M., Noll, M. and Liesack, W. (2007). Phylogenetic identity, growth-response time and rRNA operon copy number of soil bacteria indicate different stages of community succession. *Enviro. Microbiol.* 9 (10), 2464-2474.
116. Siebring, J., Elema, M.J., Drubi Vega, F., Kovács, A.T., Haccou, P. and Kuipers, O.P. (2014). Repeated triggering of sporulation in *Bacillus subtilis* selects against a protein that affects the timing of cell division. *ISME J.* 8 (1), 77-87. doi: 10.1038/ismej.2013.128. Epub 2013 Aug 8.
117. Simons, A.M. (2011). Modes of response to environmental change and the elusive empirical evidence for bet hedging. *Proc. Biol. Sci.* 278 (1712), 1601-1609. doi: 10.1098/rspb.2011.0176. Epub 2011 Mar 16.
118. Souza, V., Espinosa-Asuar, L., Escalante, A.E., Eguiarte, L.E., Farmer, L.E., Forney, L., et al., (2006). An endangered oasis of aquatic microbial biodiversity in the Chihuahuan desert. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (17), 6565-6570.
119. Souza, V., Eguiarte, L.E., Siefert, J.S. and Elser, J.J. (2008). Microbial endemism: does phosphorous limitation enhance speciation?. *Nat. Rev. Microbiol.* 6 (7), 559-564. doi: 10.1038/nrmicro1917. Epub 2008 Jun 3.
120. 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), 641-647. doi: 10.1089/ast.2011.0675.
121. Spitzer, J. (2013). Emergence of life from multicomponent mixtures of chemicals: the case for experiments with cycling physicochemical gradients. *Astrobiology* 13 (4), 404-413. doi: 10.1089/ast.2012.0924.
122. Spitzer, J., Pielak, G.J. and Poolman, B. (2015). Emergence of life: physical chemistry changes the paradigm. *Biol. Direct.* 10, 33. doi: 10.1186/s13062-015-0060-y.

123. Starrfelt, J. and Kokko, H. (2012). Bet-hedging—a triple trade-off between means, variances and correlations. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 87 (3), 742-755. doi: 10.1111/j.1469-185X.2012.00225.x. Epub 2012 Mar 10.
124. Sterner, R.W. and Elser, J.J. (2002). *Ecological stoichiometry: the biology of elements from molecules to the biosphere*. Princeton University Press, Princeton, N.J.
125. Sterhl, B., Holtzendorff, J., Partensky, F. and Hess, W.R. (1999). A small and compact genome in the marine cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* CCMP 1375: lack of an intron in the gene for tRNA<sup>r</sup>(Leu)<sup>UAA</sup> and a single copy of the rRNAop. *FEMS Microbiol. Lett.* 181 (2), 261-266.
126. Stevenson, B.S. and Schmidt, T.M. (2004). Life history implications of rRNA gene copy number in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (11), 6670-6677.
127. Stoddard, S.F., Smith, B.J., Hein, R., Roller, B.R.K. and Schmidt, T.M. (2015). *rrnDB*: improved tools for interpreting rRNA gene abundance in bacteria and archaea and a new foundation for future development. *Nucleic Acids Res.* 43. doi: 10.1093/nar/gku1201.
128. Sutherland, J.P., Aherne, 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 (3), 359-372.
129. 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 (10), 2731-2739. doi: 10.1093/molbev/msr121. Epub 2011 May 4.
130. Tañase, A.M., Vassu T. and Stoica, I. (2010). The concept of bacterial species. *Bacteriol. Virusol. Parazitol. Epidemiol.* 55 (1), 5-10.
131. Thompson, J.D., Gibson, T.J. and Higgins, D.g. (2002). Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Curr Protoc Bioinformatics*, Chapter 2: Unit 2.3. doi:10.1002/0471250953.bi0203s00.
132. Tsugama, D., Liu, S. and Takano, T. (2014). Analysis of functions of VIP1 and its close homologs in osmosensory responses of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 9(8):e103930. doi:10.1371/journal.pone.0103930.
133. Valík, L., Görner, F. and Lauková, D. (2003). Growth dynamics of *Bacillus cereus* and self-life of pasteurised milk. *Czech J. Food Sci.* 21, 195-202.

134. Van Mooy, B.A.S., Rocap, G., Fredricks H.F., Evans, C.T. and Devol, A.H. (2006). Sulfolipids dramatically decrease phosphorus demand by picocyanobacteria in oligotrophic marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (23), 8607-8612.
135. Van Mooy, B.A.S., Fredricks, H.F., Pedler, B.E., Dyhrman, S.T., Karl, D.M., Koblížek, et al., (2009). Phytoplankton in the ocean use non-phosphorus lipids in response to phosphorus scarcity. *Nature* 458 (7234), 69-72. doi: 10.1038/nature07659.
136. Viera-Silva, S. and Rocha, E.P.C. (2010). The systemic imprint of growth and its uses in ecological (Meta) genomics. *PLoS Genet.* 6 (1): e1000808. doi:10.1371/journal.pgen.1000808
137. Vishnivetskaya, T.A., Kathariou, S. and Tiedje, J.M. (2009). The *Exiguobacterium* genus: biodiversity and biogeography. *Extremophiles* 13 (3), 541-555. doi: 10.1007/s00792-009-0243-5. Epub 2009 Apr 19.
138. Wangen, S.R. and Webster, C.R. (2006). Potential for multiple lag phases during biotic invasions: reconstructing an invasion of the exotic tree *Acer platanoides*. *J. Appl. Ecol.* 43 (2), 258-268.
139. Warth, A.D. (1978). Relationship between the heat resistance of spores and the optimum and maximum growth temperatures of *Bacillus* species. *J. Bacteriol.* 134 (3), 699-705.
140. 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. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 36, 219-242.
141. Weiher, E. and Keddy, P.A. (1995). Assembly rules, null models, and trait dispersion: new questions from old patterns. *OIKOS* 74 (1), 159-164.
142. Wellner, A., Lurie, M.N. and Gophna, U. (2007). Complexity, connectivity, and duplicability as barriers to lateral gene transfer. *Genome Biol.* 8 (8): R156 (doi:10.1186/gb-2007-8-8-r156).
143. Wetzel, R.G. (2001). *Limnology. Lake and river ecosystems*. Elsevier Academic Press, USA, 239-288.

144. Whitman, W.B., Coleman, D.C. and Wiebe, W.J. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (12), 6578-6583.
145. Williams, R.J. (1997). The natural selection of the chemical elements. *Cell. Mol. Life Sci.* 53 (10), 816-829.
146. Yamagata, Y., Watanabe, H., Saitoh, M. and Namba, T. (1991). Volcanic production of phosphates and its relevance to prebiotic evolution. *Nature* 352 (6335), 516-519.
147. Yano, K., Wada, T., Suzuki, S., Tagami, K., Matsumoto, T., Shiwa, Y., et al., (2013). Multiple rRNA operons are essential for efficient cell growth and sporulation as well as outgrowth in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 159 (Pt. 11), 2225-2236. doi: 10.1099/mic.0.067025-0. Epub 2013 Aug 22.
148. Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M. and van't Riet, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (6), 1875-1881.

## ANEXOS

Anexo 1. Parámetros de crecimiento estimados en diferentes cepas de *Bacillus*.

Parámetros de crecimiento								
Especie	Cepa	$\lambda$ (h)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	$t_d$ (h)	$G_t$ (h)	Temp. (°C)	Especificaciones	Referencia
<i>B. mycooides</i>		-	-	-	0.48	35	Tryptic meat broth	En Powell, 1956
<i>B. cereus</i>	569/H	-	3.27	-		35	Measurements of bacterial length among divisions	Collins and Richmond, 1962
<i>B. cereus</i>	B687	-	2.8	-		42		
<i>B. cereus</i> subsp. <i>mycooides</i>		-	1.2	-		25		
<i>B. subtilis</i>	P	-	3.2	-		46	Maximum growth rate temperature*	Warth, 1978
<i>B. subtilis</i>	168	-	2.9	-		46		
<i>B. subtilis</i>	B692	-	2.8	-		46		
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>niger</i>		-	2.5	-		43		
<i>B. subtilis</i>		-	-	-		7 to 43	Predictions to obtain the minimum, maximum and optimum growth temperature*	Ratkowsky et al., 1983
<i>B. subtilis</i>	168/S	-	0.0058 <sup>†</sup>	2.0		35	Growth rate calculated with the Collins-Richmont principle modified	Burdett et al., 1986
<i>B. cereus</i>	F2797/87, F3351/87, F3752A/86, F196/73, F3748/75 and	-	-	0.25 to 3.77		10 to 30	Predictions of doubling time in different foods and growth conditions. Mixed inoculum.	Shuterland et al., 1996

B-6/Ac							
<i>B. cereus</i>		-	-	-	7 to 30	Predictions at different temperature, pH and water activity	Chorin et al., 1997
<i>B. stearo-thermophilus</i>	ATCC 12980	-	0.916	-	45 to 65	Salty carrot medium	Ng and Schaffner, 1997
<i>B. subtilis</i>	ATCC 6051	9-10	0.31-0.33	-	37	Space flight cultures	Kacena et al., 1999
<i>B. cereus</i>		~20 to 180	~0.1 to 0.35	-	5, 7, 9, 11 and 13	Growth in pasteurised milk	Valík et al., 2003
<i>B. mojavensis</i>	ATCC 39307	-	0.6-1-3	-	37	Use of deoxyribonucleosides or DNA to growth under anaerobic conditions	Folmsbee et al., 2004
<i>B. cereus</i>		-	-	-	2 to 48	Isolated from different foods and grow at different temperature	Membré et al., 2005
<i>B. cereus</i>	INRA-AVZ421	3.41 1.11	0.37 1.34	- -	16 25	Growth under stressful conditions	Antolinos et al., 2011
<i>B. weihenstephanensis</i>	KBAB4	1.3 1.6 1.8	1.558 1.253 0.979	- - -	30	Effects on growth parameters after shifts in temperature and water activity	Antolinos et al., 2012
<i>B. subtilis</i>	TF8A	-	-	-	37	Nutrient influence in the stationary phase	Chubukov and Sauer, 2014

$\lambda$  = fase Lag. \*Grupos similares a los descritos en el VCC. †Tasa de crecimiento específica ( $k$ ) en duplicaciones por min.  $t_d$  = tiempo de duplicación.  $G_t$  = tiempo generacional.

**ARTÍCULO:**

Variability of rRNA operon copy number and growth rate  
dynamics of *Bacillus* isolated from an extremely  
oligotrophic aquatic ecosystem.





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

Jorge A. Valdivia-Anistro<sup>1</sup>, Luis E. Eguiarte-Frums<sup>1</sup>, Gabriela Delgado-Sapién<sup>2</sup>, Pedro Márquez-Zacarias<sup>3</sup>, Jaime Gasca-Pineda<sup>1</sup>, Jennifer Learned<sup>4</sup>, James J. Elser<sup>4</sup>, Gabriela Olmedo-Alvarez<sup>5</sup> and Valeria Souza<sup>1\*</sup>

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

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Roland Hatzenpichler,  
California Institute of Technology, USA

### Reviewed by:

Sebastian Kopf,  
Princeton University, USA  
Albert Leopold Mueller,  
Stanford University, USA

### \*Correspondence:

Valeria Souza  
souza@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:** 05 January 2016

### Citation:

Valdivia-Anistro JA, Eguiarte-Frums LE, Delgado-Sapién G, Márquez-Zacarias P, 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.* 6:1486. doi: 10.3389/fmicb.2015.01486

The ribosomal RNA (*rrn*) 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 *rrn* 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 *rrn* operon copies (6–15 copies). The main goal of this study was to analyze the variation in the number of *rrn* 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 18 phylogenetic groups within the *Bacilli* clade and documented a range of from six to 14 copies of the *rrn* 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 *rrn* 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 *rrn* 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 *rrn* 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; Hughes et al., 2008). 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., 1995; Pr  b 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; Jeyasingh 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 macro-biota (r- and K-strategies), (Pianka, 1970; Elser et al., 2000; Dethlefsen 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*DB, 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; Connor et al., 2010). If the new environment is rich in phosphorus (P), high *rrn* operon

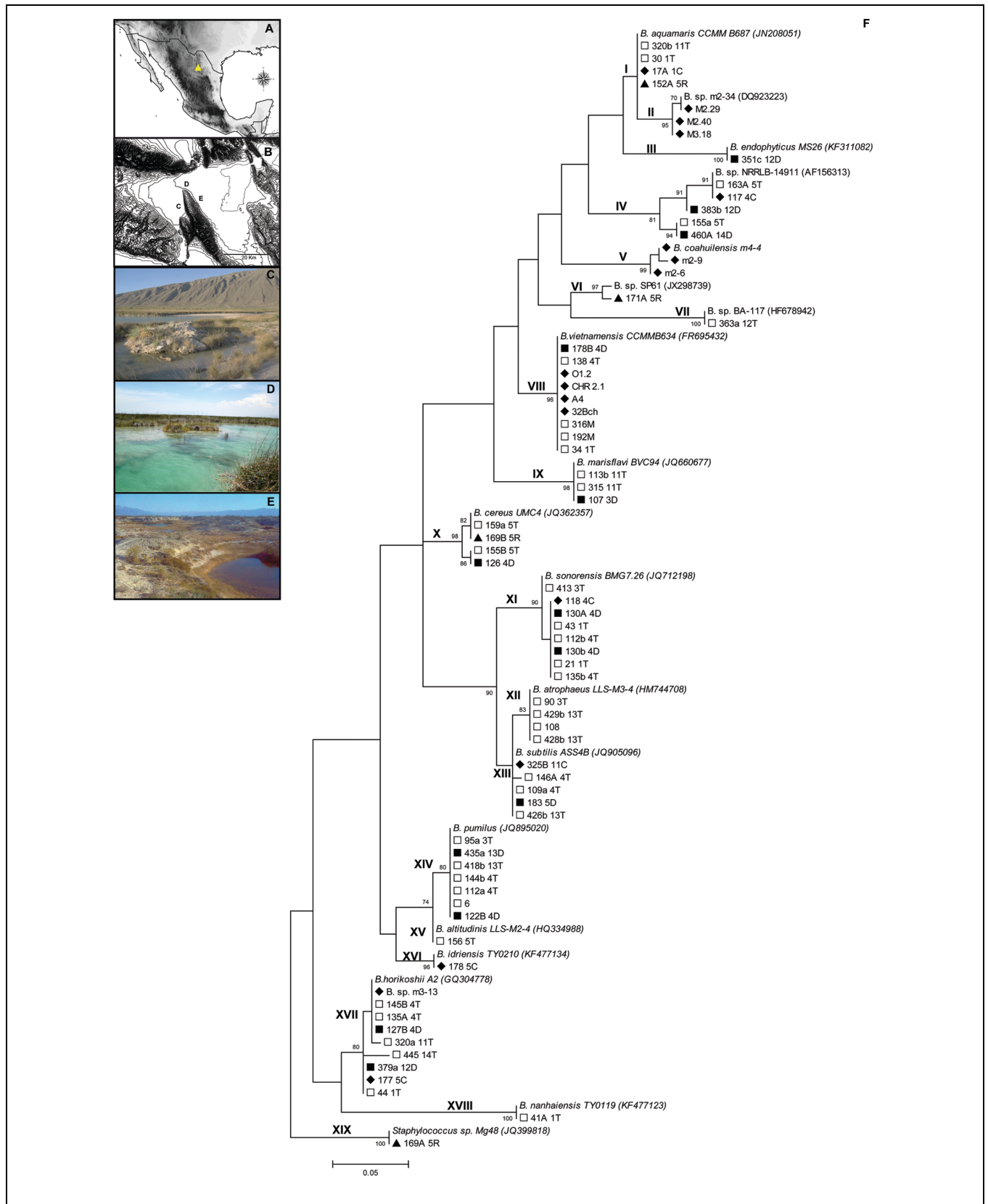
copy number may be favored because the rich P supply could then support the rapid production of P-rich *rrn* to meet the protein demands of rapid growth, as stated by the "Growth Rate Hypothesis" (GRH), a core idea within the theory of biological stoichiometry (Elser et al., 2000; Elser, 2006). However, 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, 2002; Maciá, 2005; Jeyasingh and Weider, 2007). Indeed, aquatic bacteria isolated from oligotrophic environments usually have low *rrn* operon copy numbers (Fegatella et al., 1998; Strehl et al., 1999; Lauro 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; Jeyasingh 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<sup>T</sup>), (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., 2003; 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 1 | The Cuatro Ciénegas Basin (CCB) in the Chihuahuan Desert, in northeastern México (A,B) and the sites where *Bacillus* strains were previously isolated. (C) The Churince system, (D) Pozas Rojas (Los Hundidos), and (E) Río Mesquites. (F) Maximum-Likelihood (ML) tree of the 19 phylogenetic groups identified using the 5' HV region of the 16S rDNA. Bootstrap values higher than 70% are shown. Symbols represent the sample type of isolation: □ = Top section of sediment, ■ = Bottom section of sediment, ▲ = Water sediment adjacent to a plant, and ◆ = Water.**

conditions ( $<1 \mu\text{mol PO}_4^{3-}$ ; Peimbert 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; Alcaraz et al., 2008, 2010; Cerritos et al., 2010; Pérez-Gutiérrez et al., 2013), (**Figure 1B**).

Our isolates are from three primary sampling sites within the basin: (i) the Churince 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 Hundidos 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 Churince, 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, Difco™ 2216). Genomic DNA extractions were performed using the QIAmp® 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., (2000). 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 (Liu 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 Difco™ 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 (Nakasone 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  $\mu\text{l}$  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  $\text{cm}^{-1}$  and in a second stage, pulse time ramped from 0.22 to 5.10 s for 15 h at 6 V  $\text{cm}^{-1}$ .

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 N+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 (23S<sub>3</sub>) of the *rrn*. Then, the 23S<sub>3</sub> region (413 bp) was amplified using the



forward primer F23S<sub>3</sub> 5'-ACG GAG GCG CCC AAA GGT T-3' and the reverse primer R23S<sub>3</sub> 5'-CCA GCG GTG CGT CCA TCC-3'. The primer set used to amplify the 23S<sub>3</sub>, 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., 2013), 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 Churince 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 50 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<sup>-1</sup>. 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 ( $\lambda$ ; units: hours), the tangential growth rate ( $G_{tan}$ ; units: cells/h), and maximal biomass reached [ $A$ ; units:  $\ln(CFU/CFU_{(t=0)})$ ] 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  $G_{tan}$  as the tangent of the inflection point of the curve,  $\lambda$  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  $\ln(CFU/CFU_{(t=0)})$ ] for plate-count assays. In addition,

we estimated the maximum specific growth rate ( $\mu_{max}$ ; units: hours<sup>-1</sup>) 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  $\mu$ l water (Mili-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 3.3.1 (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

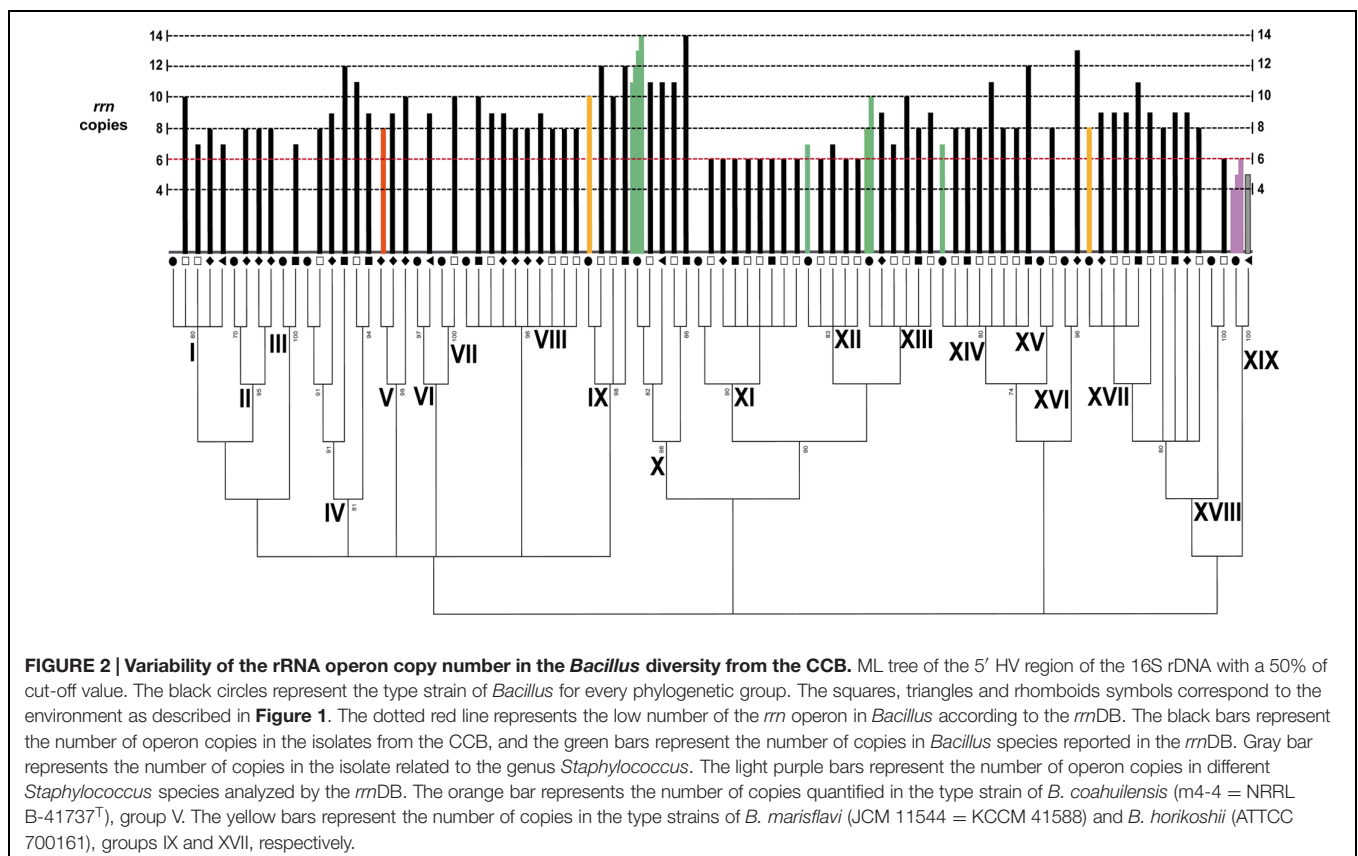
include representatives from a variety of habitats (e.g., soil, water, sediment); however, some “marine” groups included strains only sampled from water, while the *B. atrophaeus* lineage was only found in the top layers of sediment. Strains related to *B. pumilus* were also only found in sediment (Figure 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 II) 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. marisflavi* (group IX), both isolated from seawater. The *B. aquamaris* (group I), *B. sp.* SP61 (group VI), and *B. vietnamensis* (group VIII) groups are related to strains isolated from hypersaline environments (salterns 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 XIII), 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 XII are related to a *B. atrophaeus* 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. altitudinis* strain (group XV), were present in soil and water

samples; *B. idriensis* isolates (group XVI), were related to strains from soil samples with halotolerance. Finally, the *B. horikoshii* 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 5R 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-41737<sup>T</sup>) that was isolated from the Churince 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



as *B. sonorensis* (XI), *B. atrophaeus* (XII), and *B. nanhaiensis* (XVIII); the lowest number of copies quantified in other strains of the genus (*rrn*DB, 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. sonorensis* (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 (VI; ten copies), *B. sp.* BA-117 (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 ( $\mu_{\max}$ ; Supplementary Figure S3A). In addition, the maximum biomass reached was correlated with the maximum specific growth rate ( $\mu_{\max}$ ; 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 ( $\mu_{\max}$ ) and the maximum biomass

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

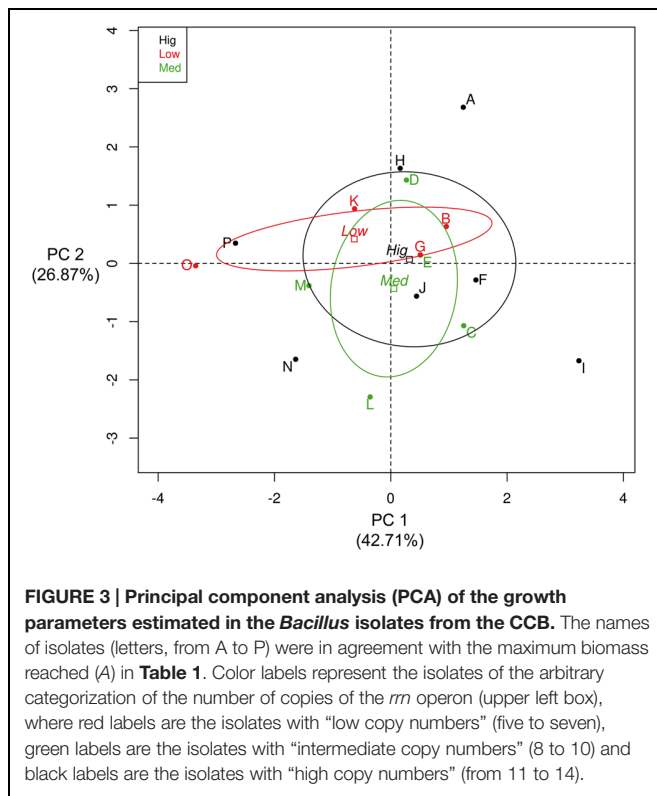
	<i>rrn</i> copies	Isolate	Phylogenetic group	Growth parameters			
				A	$\lambda$ (h)	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	$t_d$ (h)
A	14	155B_5T	<i>X. B. cereus</i>	9.98	0.92	0.26	2.66
B	6	118_4C	XI. <i>B. sonorensis</i>	9.89	1.13	0.24	2.88
C	8	m3-18	II. <i>B. sp.</i> m2-34	9.78	2.89	0.24	2.88
D	9	m2-9	V. <i>B. coahuilensis</i>	7.95	1.08	0.22	3.15
E	10	m2-6	V. <i>B. coahuilensis</i>	7.68	1.45	0.21	3.30
F	12	112B_4D	XIV. <i>B. pumilus</i>	7.35	1.70	0.31	2.23
G	5	169A_5R	XIX. <i>Staphylococcus</i>	7.30	0.92	0.26	2.66
H	12	107_3D	IX. <i>B. marisflavi</i>	7.28	0.25	0.19	3.64
I	13	178_5C	XVI. <i>B. idriensis</i>	7.02	2.56	0.57	1.21
J	11	126_4D	<i>X. B. cereus</i>	6.69	2.78	0.23	3.01
K	7	152A_5R	I. <i>B. aquamaris</i>	6.48	0.22	0.16	4.33
L	8	44_1T	XVII. <i>B. horikoshii</i>	5.20	4.12	0.19	3.64
M	10	315_11T	IX. <i>B. marisflavi</i>	4.44	1.44	0.12	5.77
N	11	144b_14T	XIV. <i>B. pumilus</i>	3.67	2.79	0.11	6.30
O	6	108	XII. <i>B. atrophaeus</i>	3.38	2.06	0.08	8.66
P	11	127B_4D	XVII. <i>B. horikoshii</i>	3.22	1.70	0.09	7.70

A = maximum biomass reached [ $\ln(\text{CFU}/\text{CFU}_{(t=0)})$ ];  $\lambda$  = lag phase;  $\mu_{\max}$  = maximum specific growth rate;  $t_d$  = doubling (generation) time.

reached (A). Component 2 explained 26.87% of the variance, and was principally defined by adaptation time ( $\lambda$ ) 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 = 0.496; SD = 0.616; Median = 0.258). 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 (A) in **Table 1**. Color labels represent the isolates of the arbitrary categorization of the number of copies of the *rrn* operon (upper left box), where red labels are the isolates with “low copy numbers” (five 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	155B_5T	<i>X. B. cereus</i>	4.94	965.38
B	118_4C	<i>XI. B. sonorensis</i>	19.28	10
C	m3-18	<i>II. B. sp. m2-34</i>	8.35	286.47
D	m2-9	<i>V. B. coahuilensis</i>	24.82	79.09
E	m2-6	<i>V. B. coahuilensis</i>	18.18	52.91
F	112B_4D	<i>XIV. B. pumilus</i>	18.77	194.61
G	169A_5R	<i>XIX. Staphylococcus</i>	5.75	25.83
H	107_3D	<i>IX. B. marisflavi</i>	8.87	19.55
I	178_5C	<i>XVI. B. idriensis</i>	17.85	40.67
J	126_4D	<i>X. B. cereus</i>	24.73	67.41
K	152A_5R	<i>I. B. aquamaris</i>	0.62	72.58
L	44_1T	<i>XVII. B. horikoshii</i>	13.79	4.61
M	315_11T	<i>IX. B. marisflavi</i>	16.7	82.72
N	144b_14T	<i>XIV. B. pumilus</i>	6.59	50.75
O	108	<i>XII. B. atrophaeus</i>	10.77	23.6
P	127B_4D	<i>XVII. B. horikoshii</i>	10.85	51.32
		Mean ± SD	13.18 ± 7.18	126.72 ± 235.13

(*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; Fegatella et al., 1998).

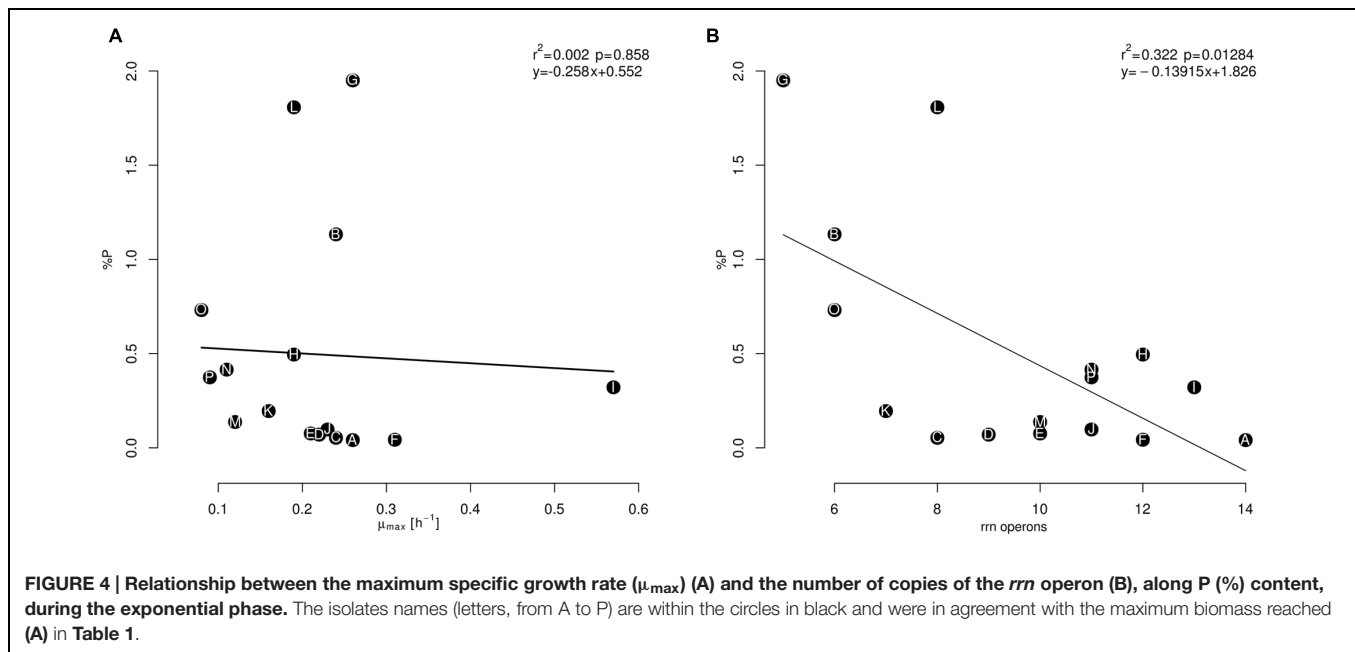
## DISCUSSION

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 (Alcaraz 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; Viera-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 (Palmisano 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 substitution, 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; Shrestha et al., 2007; Green et al., 2008). 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 (Codon et al., 1995; 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 *Bacillus* 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; Schaechter, 2006;

Antolinos et al., 2011, 2012; Bren 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., 1997; Chorin et al., 1997). In addition, long doubling times are characteristic of bacteria in oligotrophic environments (Vieria-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, 2007; 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., 2005; Peimbert 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; Jeyasingh 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; Fegatella 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., 2005; Dethlefsen and Schmidt, 2007; Jeyasingh 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 (Fegatella 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 Stingl, 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 (Elser et al., 2000; Elser, 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 (Gao et al., 2013; Tsugama et al., 2014). To date, these ecological strategies in bacteria have been largely related only to nutrient availability (Klappenbach et al., 2000; Fierer 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-von-Wobeser 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; Dethlefsen and Schmidt, 2007; Scott et al., 2010; Piir 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 Ciénegas and similar nutrient-deficient habitats.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

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

Experimental design, analysis of data. GO-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 Ariadna 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 PFGE 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; CIEco, 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 (Institut Cavanilles de Biodiversitat i Biologia 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-Asuar and Erika Aguirre-Planter helped in the general technical logistics during the entire project.

## REFERENCES

- Acinas, S. G., Marcelino, L. A., Klepac-Ceraj, V., and Polz, M. F. (2004). Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple rrn operons. *J. Bacteriol.* 186, 2629–2635. doi: 10.1128/JB.186.9.2629-2635.2004
- Aguirre-von-Wobeser, E., Soberón-Chávez, G., Eguiarte, L. E., Ponce-Soto, G. Y., Vázquez-Rosas-Landa, M., and Souza, V. (2014). Two-role model of an interaction network of free-living  $\gamma$ -proteobacteria from an oligotrophic environment. *Environ. Microbiol.* 16, 1366–1377. doi: 10.1111/1462-2920.12305
- 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* 11:332. doi: 10.1186/1471-2164-11-332
- Alcaraz, L. D., Olmedo, G., Bonilla, G., Cerritos, R., Hernández, G., Cruz, A., et al. (2008). The genome of *Bacillus coahuilensis* reveals adaptations essential for survival in the relic of an ancient marine environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 5803–5808. doi: 10.1073/pnas.0800981105
- Antolinos, V., Muñoz, M., Ros-Chumillas, M., Aznar, A., Periago, P. M., and Fernández, P. S. (2011). Combined effect of lysozyme and nisin 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
- Antolinos, V., Muñoz-Cuevas, M., Ros-Chumillas, M., Periago, P. M., Fernández, 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, 36–44. 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) Different nutritional conditions were analyzed to define the optimum conditions and thus describe the growth dynamics of the *Bacillus*: A = Marine broth (Difco™ 2216); B = CCB water; C = CCB water + P (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 g per liter); and D = CCB water + N (tryptone, 5 g per liter). Growth was quantified via culture turbidity (OD<sub>600</sub>; BioPhotometer Plus, Eppendorf) after 12 h of growth, and the data were normalized to define the 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 rrn operon for every isolate. Growth curves were plotted with the data of the plate count assays [ $\ln(CFU/CFU_{(t=0)})$ ].

**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 identified with hybridization analysis.

**FIGURE S3 | Relationship between the growth parameters estimated in the *Bacillus* isolates from the CCB.** (A)  $\lambda$  vs  $\mu_{max}$  and, (B)  $\mu_{max}$  vs A. Isolate names (letters, from A to P) are within the circles in black and were in agreement with the maximum biomass reached (A) in Table 1. A = maximum biomass reached [ $\ln(CFU/CFU_{(t=0)})$ ];  $\lambda$  = lag phase;  $\mu_{max}$  = 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;  $\lambda$  = lag phase;  $t_d$  = doubling time; and  $\mu_{max}$  = maximum specific growth rate.

- APHA (2005). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Washington, DC: American Publish Health Association.
- Bren, A., Hart, Y., Dekel, E., Koster, D., and Alon, U. (2013). The last generation of bacterial growth in limiting nutrient. *BMC Syst. Biol.* 7:27. doi: 10.1186/1752-0509-7-27
- Buchanan, R. L., Whiting, R. C., and Damert, W. C. (1997). When in simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. *Food Microbiol.* 14, 313–326. doi: 10.1006/fmic.1997.0125
- Burdett, I. D. J., Kirkwood, T. B. L., and Whalley, J. B. (1986). Growth kinetics of individual *Bacillus subtilis* cells and correlation with nucleoid extension. *J. Bacteriol.* 167, 219–230.
- 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 *Sphingopyxis alaskensis*). *Microb. Ecol.* 45, 203–217.
- Cerritos, R., Eguiarte, L. E., Avitia, M., Siefert, J., Travisano, M., Rodríguez-Verdugo, A., et al. (2010). Diversity of culturable thermo-resistant aquatic bacteria along an environmental gradient in Cuatro Ciénegas, Coahuila, México. *Antonie Van Leeuwenhoek* 98, 1–16. doi: 10.1007/s10482-010-9490-9
- Cerritos, R., Vinuesa, P., Eguiarte, L. E., Herrera-Estrella, L., Alcaraz-Peraza, L. D., Arvizu-Gómez, J. 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/ijss.0.64959-0
- Chorin, E., Thuault, D., Cléret, J. J., and Bourgeois, C. M. (1997). Modeling *Bacillus cereus* growth. *Int. J. Food Microbiol.* 38, 229–234. doi: 10.1016/S0168-1605(97)00110-4



- Chubukov, 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.00061-14
- Codon, C., Liveris, D., Squires, C., Schwartz, I., and Squires, C. L. (1995). rRNA operon multiplicity in *Escherichia coli* and the physiological implications of rrn inactivation. *J. Bacteriol.* 177, 4152–4156.
- Collins, J. F., and Richmond, M. H. (1962). Rate of increase in length of bacteria between divisions. *J. Gen. Microbiol.* 28, 15–33. doi: 10.1099/00221287-28-1-15
- Connor, N., Sikorski, J., Rooney, A. P., Kopac, S., Koeppl, A. F., Burger, A., et al. (2010). Ecology of speciation in the genus *Bacillus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1349–1358. doi: 10.1128/AEM.01988-09
- Crooks, J. A. (2005). Lag times and exotic species: the ecology and management of biological invasions in slow-motion. *Ecoscience* 12, 316–329. doi: 10.2980/i1195-6860-12-3-316.1
- Daehler, C. C. (2009). Short lag times for invasive tropical plants: evidence from experimental planting in Hawaii. *PLoS ONE* 4:e4462. doi: 10.1371/journal.pone.0004462
- Delgado, G., Souza, V., Morales, R., Cerritos, R., González-González, A., Méndez, J. L., et al. (2013). Genetic characterization of atypical *Citrobacter freundii*. *PLoS ONE* 8:e74120. doi: 10.1371/journal.pone.0074120
- 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.01686-06
- Elser, J. J. (2003). Biological stoichiometry: a theoretical framework connecting ecosystem ecology, evolution, and biochemistry for application in astrobiology. *Int. J. Astrobiol.* 2, 185–193. doi: 10.1017/S1473550403001563
- Elser, J. J. (2006). Biological stoichiometry: a chemical bridge between ecosystem ecology and evolutionary biology. *Am. Nat.* 168, S25–S35. doi: 10.1086/509048
- Elser, J. J., Sterner, R. W., Gorokhova, E., Fagan, W. F., Markow, T. A., Cotner, J. B., et al. (2000). Biological stoichiometry from genes to ecosystems. *Ecol. Lett.* 3, 540–550. doi: 10.1046/j.1461-0248.2000.00185.x
- Elser, J. J., Watts, J., Schampel, J. H., and Farmer, 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
- Fegatella, F., and Cavicchioli, R. (2000). Physiological responses to starvation in the marine oligotrophic ultramicrobacterium *Sphingomonas* sp. strain RB2256. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2037–2044. doi: 10.1128/AEM.66.5.2037-2044.2000
- Fegatella, F., Lim, J., Kjelleberg, S., and Cavicchioli, R. (1998). Implications of rRNA operon copy number and ribosome content in the marine oligotrophic ultramicrobacterium *Sphingomonas* sp. strain RB2256. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4433–4438.
- Feldgarden, M., Byrd, N., and Cohan, F. M. (2003). Gradual evolution in bacteria: evidence from *Bacillus* systematics. *Microbiology* 149(Pt 12), 3565–3573. doi: 10.1099/mic.0.26457-0
- Fierer, N., Brandford, M. A., and Jackson, R. B. (2007). Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology* 88, 1354–1364. doi: 10.1890/05-1839
- Gao, R., Wan, Z. Y., and Wong, S. M. (2013). Plant growth retardation and conserved miRNAs are correlated to hibiscus chlorotic ringspot virus infection. *PLoS ONE* 8:e85476. doi: 10.1371/journal.pone.0085476
- Giovannoni, S. J., and Stingl, U. (2005). Molecular diversity and ecology of microbial plankton. *Nature* 437, 343–348. doi: 10.1038/nature04158
- Goto, K., Omura, 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, 1–8. doi: 10.2323/jgam.46.1
- 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*. *Annu. Rev. Microbiol.* 50, 645–677. 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.1153475
- Hughes, A. R., Inouye, B. D., Johnson, M. T. J., Underwood, N., and Vellend, M. (2008). Ecological consequences of genetic diversity. *Ecol. Lett.* 11, 609–623. doi: 10.1111/j.1461-0248.2008.01179.x
- Jeyasingh, P. D., and Weider, L. J. (2007). Fundamental links between genes and elements: evolutionary implications of ecological stoichiometry. *Mol. Ecol.* 16, 4649–4661. doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03558.x
- Jørgensen, B. B., and Boetius, A. (2007). Feast and famine-microbial life in the deep-sea bed. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 770–781. doi: 10.1038/nrmicro1745
- Kacena, M. A., Merrell, G. A., Manfredi, B., Smith, E. E., Klaus, D. M., and Todd, P. (1999). Bacterial growth in space flight: logistic growth curve parameters for *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 229–234. doi: 10.1007/s002530051386
- Klappenbach, J. A., Dunbar, J. M., and Schmidt, T. M. (2000). rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1328–1333. doi: 10.1128/AEM.66.4.1328-1333.2000
- Klappenbach, J. A., Saxman, P. R., Cole, J. R., and Schmidt, T. M. (2001). rrndb: the ribosomal RNA operon copy number database. *Nucleic Acids Res.* 29, 181–184. doi: 10.1093/nar/29.1.181
- Labonté, J. M., Field, E. K., Lau, M., Chivian, D., Van Heerden, E., Wommack, K. E., et al. (2015). Single cell genomics indicates horizontal gene transfer and viral infections in a deep subsurface Firmicutes population. *Front. Microbiol.* 22:349. doi: 10.3389/fmicb.2015.00349
- Lauro, F. M., McDougald, D., Thomas, T., Williams, T. J., Egan, S., Rice, S., et al. (2009). The genomic basis of trophic strategy in marine bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 15527–15533. doi: 10.1073/pnas.0903507106
- Lipowsky, A., Roscher, C., Schumacher, J., and Schmid, B. (2012). Density-independent mortality and increasing plant diversity are associated with differentiation of *Taraxacum officinale* into r- and K-strategists. *PLoS ONE* 7:e28121. doi: 10.1371/journal.pone.0028121
- Liu, S., Hessel, A., and Sanderson, K. E. (1993). Genomic mapping with I-CeuI, an intron-encoded endonuclease specific for genes for ribosomal RNA, in *Salmonella* 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
- Maciá, E. (2005). The role of phosphorus in chemical evolution. *Chem. Soc. Rev.* 34, 691–701. doi: 10.1039/b416855k
- Martínez-Alonso, M., Mir, J., Caumette, P., Gaju, N., Guerrero, R., and Esteve, I. (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.0601301103
- 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.1462-2920.2009.01860.x
- McGill, B. J., Enquist, B. J., Weiher, E., and Westoby, M. (2006). Rebuilding community ecology from functional traits. *Trends Ecol. Evol.* 21, 178–185. doi: 10.1016/j.tree.2006.02.002
- Membré, J. M., Leporq, B., Vialette, 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 on/in food. *Int. J. Food Microbiol.* 100, 179–186. 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.mi.03.100149.002103
- Moreno-Letelier, A., Olemdo, G., Eguarte, L. E., Martínez-Castilla, L., and Souza, V. (2011). Parallel evolution and horizontal gene transfer of the

- pst operon in Firmicutes from oligotrophic environments. *Int. J. Evol. Biol.* 2011:781642. doi: 10.4061/2011/781642
- Nakasone, K., Noriaki, M., Yoshihiro, T., Rumie, S., Go, M., Tokuki, S., et al. (2000). Characterization and comparative study of the rrn operons of alkaliphilic *Bacillus halodurans* C-125. *Extremophiles* 4, 209–214. doi: 10.1007/PL00010713
- Nanamiya, 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, 2944–2952. doi: 10.1099/mic.0.035295-0
- Neidhardt, F. C. (1999). Bacterial growth: constant obsession with dN/dt. *J. Bacteriol.* 181, 7405–7408.
- Ng, T. M., and Schaffner, D. W. (1997). Mathematical models for the effects of pH, temperature, and sodium chloride on the growth of *Bacillus stearothermophilus* in salty carrots. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1237–1243.
- Page, C. N. (2002). Ecological strategies in fern evolution: a neopteridological overview. *Rev. Palaeobot. Palynol.* 119, 1–33. doi: 10.1016/S0034-6667(01)00127-0
- Palmisano, M. M., Nakamura, L. K., Duncan, K. E., Istock, C. A., and Cohan, F. M. (2001). *Bacillus sonorensis* sp. nov., a close relative of *Bacillus licheniformis*, isolated from soil in the Sonoran Desert, Arizona. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 1671–1679. doi: 10.1099/00207713-51-5-1671
- Peimbert, M., Alcaraz, L. D., Bonilla-Rosso, G., Olmedo-Alvarez, G., García-Oliva, F., Segovia, L., et al. (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, 648–658. doi: 10.1089/ast.2011.0694
- Pérez-Gutiérrez, R. A., López-Ramírez, V., Islas, A., Alcaraz, L. D., Hernández-González, I., Luna Oliviera, B. C., et al. (2013). Antagonism influences assembly of a *Bacillus* guild in a local community and is depicted as a food-chain network. *ISME J.* 7, 487–497. doi: 10.1038/ismej.2012.119
- Pianka, E. R. (1970). On r- and K-Selection. *Am. Nat.* 104, 592–597. doi: 10.1086/282697
- Piir, K., Paier, A., Liiv, A., Tenson, T., and Maiväli, Ü (2011). Ribosome degradation in growing bacteria. *EMBO Rep.* 12, 458–462. doi: 10.1038/embor.2011.47
- Powell, E. O. (1956). Growth rate and generation time of bacteria, with special reference to continuous culture. *J. Gen. Microbiol.* 15, 492–511. doi: 10.1099/00221287-15-3-492
- Prüß, B. M., Francis, K. P., von Stetten, F., and Scherer, S. (1999). Correlation of 16S ribosomal DNA signature with temperature-dependent growth rates of mesophilic and psychrotolerant strains of the *Bacillus cereus* group. *J. Bacteriol.* 181, 2624–2630.
- Rastogi, R., Wu, M., Dasgupta, I., and Fox, G. E. (2009). Visualization of ribosomal RNA operon copy number distribution. *BMC Microbiol.* 9:208. doi: 10.1186/1471-2180-9-208
- Ratkowsky, D. A., Lowry, R. K., McMeekin, T. A., Stokes, A. N., and Chandler, R. E. (1983). Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. *J. Bacteriol.* 154, 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.
- Schaechter, M. (2006). From growth physiology to system biology. *Int. Microbiol.* 9, 157–161.
- Scott, M., Gunderson, C. W., Mateescu, E. M., Zhang, Z., and Hwa, T. (2010). Interdependence of cell growth and gene expression: origins and consequences. *Science* 330, 1099–1102. doi: 10.1126/science.1192588
- Shrestha, P. M., Noll, M., and Liesack, 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.1462-2920.2007.01364.x
- Souza, V., Eguiarte, L. E., Siefert, J. S., and Elser, J. J. (2008). Microbial endemism: does phosphorous limitation enhance speciation? *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 559–564. doi: 10.1038/nrmicro1917
- Souza, V., Espinosa-Asuar, L., Escalante, A. E., Eguiarte, L. E., Farmer, L. E., Forney, L., et al. (2006). An endangered oasis of aquatic microbial biodiversity in the Chihuahuan desert. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 6565–6570. doi: 10.1073/pnas.0601434103
- 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, 641–647. doi: 10.1089/ast.2011.0675
- Spencer, C. C., Tyerman, J., Bertrand, M., and Doebeli, M. (2008). Adaptation increases the likelihood of diversification in an experimental bacterial lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 1585–1589. doi: 10.1073/pnas.0708504105
- Sterner, R. W., and Elser, J. J. (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, 6670–6677. doi: 10.1128/AEM.70.11.6670-6677.2004
- Stoddard, S. F., Smith, B. J., Hein, R., Roller, B. R. K., and Schmidt, T. M. (2015). rrrnDB: improved tools for interpreting rRNA gene abundance in bacteria and archaea and a new foundation for future development. *Nucleic Acids Res.* 43, D593–D598. doi: 10.1093/nar/gku1201
- Strehl, B., Holtzendorff, J., Partensky, F., and Hess, W. R. (1999). A small and compact genome in the marine cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* CCMP 1375: lack of an intron in the gene for tRNA<sup>Arg</sup> (Leu)UAA and a single copy of the rRNA<sup>op</sup>. *FEMS Microbiol. Lett.* 181, 261–266. doi: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb08853.x
- Sutherland, J. P., Aherne, 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: 10.1016/0168-1605(96)00962-2
- 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/msr121
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., and Higgins, D. G. (2002). Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Curr. Protoc. Bioinformatics Chapter 2, Unit 2.3*. doi: 10.1002/0471250953.bi0203s00
- Tsugama, D., Liu, S., and Takano, T. (2014). Analysis of functions of VIP1 and its close homologs in osmosensory responses of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 9:e103930. doi: 10.1371/journal.pone.0103930
- Valík, L., Görner, F., and Lauková, D. (2003). Growth dynamics of *Bacillus cereus* and self-life of pasteurised milk. *Czech J. Food Sci.* 21, 195–202.
- Van Mooy, B. A. S., Fredricks, H. F., Pedler, B. E., Dyhrman, S. T., Karl, D. M., Koblížek, M., et al. (2009). Phytoplankton in the ocean use non-phosphorus lipids in response to phosphorus scarcity. *Nature* 458, 69–72. doi: 10.1038/nature07659
- Vieria-Silva, S., and Rocha, E. P. C. (2015). The systemic imprint of growth and its uses in ecological (Meta) genomics. *PLoS Genet.* 6:e1000808. doi: 10.1371/journal.pgen.1000808
- Vishnivetskaya, T. A., Kathariou, S., and Tiedje, J. M. (2009). The *Exiguobacterium* genus: biodiversity and biogeography. *Extremophiles* 13, 541–555. doi: 10.1007/s00792-009-0243-5
- Wangen, S. R., and Webster, C. R. (2006). Potential for multiple lag phases during biotic invasions: reconstructing an invasion of the exotic tree *Acer platanoides*. *J. Appl. Ecol.* 43, 258–268. doi: 10.1111/j.1365-2664.2006.01138.x
- Warth, A. D. (1978). Relationship between the heat resistance of spores and the optimum and maximum growth temperatures of *Bacillus* species. *J. Bacteriol.* 134, 699–705.
- 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. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 36, 219–242. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.36.102003.152620
- Whitaker, R. J., Grogan, D. W., and Taylor, J. W. (2003). Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea. *Science* 301, 976–978. doi: 10.1126/science.1086909
- 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.2006.02882.x
- Yano, K., Wada, T., Suzuki, S., Tagami, K., Matsumoto, T., Shiwa, Y., et al. (2013). Multiple rRNAops are essential for efficient cell growth and sporulation

as well as outgrowth in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 159, 2225–2236. doi: 10.1099/mic.0.067025-0

Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., and van 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 Valdivia-Anistro, Eguiarte-Frutos, Delgado-Sapién, Márquez-Zacarias, Gasca-Pineda, Learned, Elser, Olmedo-Alvarez and Souza. 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 original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.