



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS

AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD IRAPUATO

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA GENÉTICA

**AISLADOS DE COMUNIDADES DE SEDIMENTO DE CUATROCIÉNEGAS,
COAHUILA COMO MODELO PARA ANALIZAR LA COHERENCIA FENOTÍPICA
DEL GÉNERO *BACILLUS***

Tesis que presenta

M.C. MARIA DOLORES RODRIGUEZ TORRES

Para Obtener el Grado de

Doctora en Ciencias

En la Especialidad de

Biología de Plantas

Directora de la Tesis: Dra. Gabriela Olmedo Álvarez

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo financiero otorgado por el CONACYT con la beca número 229493 para la realización de este trabajo de investigación.

Al CINVESTAV por la oportunidad que me dieron para realizar mis estudios dentro de la institución y permitirme forjar la pasión por la investigación.

A la Dra. Gabriela Olmedo Álvarez por su gran paciencia, su apoyo y permitirme trabajar en el laboratorio de Biología Molecular y Ecología Microbiana.

A la Dra. Valeria Souza Saldívar por compartir su pasión por nuestro lugar de estudio: Cuatrociénegas, Coahuila.

A los Doctores: Laila Pamela Partida Martínez, Jorge Eugenio Ibarra Rendón, Alexander de Luna Fors, Rafael Rivera Bustamante, por sus valiosas sugerencias y aportaciones a lo largo de estos años.

A los miembros del Laboratorio de Metabolómica y Fisiología Molecular y al Laboratorio Biología de Sistemas Genéticos, por permitirme utilizar sus equipos.

A la M.C. Africa Islas Robles por su dedicación en el trabajo, el apoyo brindado y la amistad.

Al grupo de seminarios de microorganismos.

A todos los colaboradores y amigos que participaron en la elaboración y diseño de experimentos, análisis y discusiones: Zulema Gómez Lunar, Ismael Hernández

González, Varinia López, Julio Cruz Medina, José Antonio González, Adrian Jinich,
Yunuen Tapia, Luis J. Delaye, Paul Decena, Susana de la Torre, Mayra E. Covaxin,
José Antonio Cisneros, J. Eugenio Reynoso.

A mis papás, por su gran apoyo y enseñanzas.

A mis hermanos, Ricardo, Pablo y Liliana.

A mis sobrinos, Montse, Pau, Erik y Vale, que son la alegría de la casa.

A mi esposo Abul, por la paciencia, tolerancia y amor.

ÍNDICE

Agradecimientos	i
Índice	ii
Índice de tablas	iii
Índice de figuras	iv
Resumen	1
Abstract	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	7
2.1 Comunidades microbianas y distribución	7
2.1.1 Procesos de ensamble de la comunidad: Filtrado del hábitat y competencia	8
2.2 Demarcación de especies bacterianas y coherencia ecológica	10
2.2.1 Definición de especies	10
2.2.2 Coherencia ecológica de especies	11
2.3 Comportamiento social de los microorganismos dentro de las comunidades y los rasgos fenotípicos	13
2.4 El género <i>Bacillus</i>	16
2.4.1 Generalidades del género <i>Bacillus</i>	16
2.3.2 Hábitat del género <i>Bacillus</i>	18

2.3.4 Comportamiento social y multicelularidad del género <i>Bacillus</i>	18
2.4 Cuatro Ciénegas Coahuila	20
3. HIPÓTESIS	22
4. OBJETIVOS	23
4.1 Objetivo general	23
4.2 Objetivos específicos	23
5 MATERIALES Y MÉTODOS	24
5.1 Sitio de estudio	24
5.2 Muestreo y aislamiento bacteriano	24
5.3 Extracción de DNA, marcadores moleculares y construcción filogenética	25
5.4 Análisis filogenético de las comunidades de aislados termoresistentes	26
5.5 Ensayos fenotípicos de una sub-muestra de 141 <i>Bacillus</i> spp.	27
5.6 Evaluación de la capacidad de las cepas de <i>Bacillus</i> spp. para crecer en diferentes fuentes de fósforo	29
5.7 Señal filogenética de los rasgos de <i>Bacillus</i> spp.	30
5.8 Preparación de muestras para microscopía electrónica de transmisión	30
5.9 Clasificación de cepas de <i>Bacillus</i> spp. para identificación de proteínas ribosomales usando espectrometría de masas	31
5.10 Análisis estadístico	32

6. RESULTADOS	33
6.1 Todos los grupos taxonómicos de los aislados termoresistentes no están aleatoriamente dispersos entre los sitios de muestreo.	33
6.2 Coherencia por las preferencias por la utilización de fuentes de carbono entre los linajes de <i>Bacillus</i> spp	35
6.3 Variación extensiva de rasgos profundamente enraizados relacionados en rasgos de acción colectiva	39
6.4 Una paradoja de extensas auxotrofías entre algunos clados de <i>Bacillus</i> spp.	42
6.5 Distribución de rasgos profundamente enraizados de los <i>Bacillus</i> spp. en comunidades de sedimento exhiben poca señal filogenética y en su lugar es consistente con un modelo Browniano	43
6.6 Morfología de la colonia y pigmentación son rasgos altamente conservados, rasgos de clado específico	46
6.7 Sobredispersión en las preferencias por la utilización de fuentes de fósforo entre los linajes de <i>Bacillus</i>	48
6.8 Imágenes obtenidas con el microscopio electrónico de transmisión de cepas de <i>Bacillus</i> spp	49
6.9 Clasificación de <i>Bacillus</i> por Maldi-Tof y análisis filogenético con los genes 16S rRNA y <i>gltX</i>	52
7. DISCUSIÓN	59
7.1 ¿Qué tanta variabilidad filogenética hay entre los aislados individuales a nivel superficial y profundo?	61
7.2 ¿La evolución trabaja a nivel individual o a nivel de la comunidad?	65
7.3 ¿Podrían algunos clados, como el de <i>B. cereus</i> , basar su éxito en compartir funciones a nivel comunidad?	66

8. CONCLUSIONES	67
9. PERSPECTIVAS	68
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tamaño promedio de las células de <i>Bacillus</i> spp. tomadas con TEM	52
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución espacial de bacterias aisladas del Sistema Hidrológico Churince	25
Figura 2. Variabilidad en la utilización de las diferentes fuentes de carbono por los grupos taxonómicos de <i>Bacillus</i> spp	36
Figura 3. Tasas de crecimiento máxima y densidad de saturación para los diferentes grupos de <i>Bacillus</i> spp	38
Figura 4. Rasgos de las cepas de los diferentes grupos taxonómicos de <i>Bacillus</i> spp.	39
Figura 5. Patrones de crecimiento y su relación con la producción de “biofilm”	41
Figura 6. Análisis de varianza de la frecuencia de esporulación de los grupos taxonómicos de <i>Bacillus</i> spp	43
Figura 7. Comparación del análisis filogenético entre los genes 16S rRNA y <i>gltX</i> , y su asociación con la morfología.	46
Figura 8. Crecimiento de cepas de <i>Bacillus</i> spp. en las diferentes fuentes de fósforo.	48
Figura 9. Imágenes de TEM de las cepas de <i>Bacillus</i> spp.	50
Figura 10. Imágenes TEM de <i>B. horikoshii</i> (A) y <i>B. vietnamensis</i> (B).	51
Figura 11. Análisis de MALDI-TOF de cepas de <i>Bacillus</i> spp. relacionadas a ambientes acuáticos	53
Figura 12. Análisis de MALDI-TOF de cepas de relacionadas a <i>B. cereus</i>	54
Figura 13. Espectros del grupo relacionado a <i>B. thuringiensis</i>	55

Figura 14. Análisis de MALDI-TOF de cepas de relacionadas a <i>B. subtilis</i>	56
Figura 15. Análisis de MALDI-TOF de cepas de relacionadas a <i>B. pumilus</i>	57

RESUMEN

Numerosos trabajos han abordado la composición taxonómica de comunidades bacterianas de diferentes ambientes, pero se sabe poco con respecto a la variabilidad de los rasgos de los miembros de una comunidad. Aquí nos centramos en un solo género, en su mayor parte aislado de una comunidad de sedimento de una laguna extremadamente oligotrófica, y evaluamos rasgos fenotípicos conocidos por evolucionar en los extremos o puntas terminales y los que están profundamente enraizados en la filogenia, es decir, los rasgos recientemente adquiridos y los rasgos ancestrales. La muestra de estudio estuvo compuesta de 467 aislados del sistema acuático Churince ubicado en la Cuenca de Cuatrociénegas, Coahuila (Cuatro Cienegas Basin CCB), un sistema de agua que incluye una gran diversidad de grupos taxonómicos bien definidos de *Bacillus* spp. y que presentan una coherencia ecológica definida entre las comunidades de la muestra. La evaluación fenotípica de 141 aislados de *Bacillus* spp. de esta muestra reveló una gran variabilidad en todos los clados en los rasgos relacionados con la adquisición de compuestos de carbono, consistente con el intercambio de rasgos no complejos de las puntas terminales de la filogenia. Sin embargo, fue inesperada la alta variabilidad en los rasgos de linajes ancestrales y las notables diferencias específicas de clado, las auxotrofías fueron la norma en algunos clados. Dado que muchos de los rasgos evaluados pueden ser considerados rasgos de acción colectiva, como la motilidad, el “swarming”, la formación de “biofilm” y la utilización de fuentes de fósforo, futuros trabajos pueden revelar si la variabilidad observada es una manifestación de la evolución actuando a nivel individual o a nivel de la comunidad.

ABSTRACT

Numerous works have addressed the taxonomic composition of bacterial communities from different environments, but little is known regarding the variability of traits in members of a community. Herein we focused on a single genus, isolated mostly from a sediment community in an extremely oligotrophic lagoon, and evaluated both phenotypic traits known to evolve at the tips and deeply enrooted in the phylogeny, that is, the newly acquired traits and ancestral traits. The sample under study was composed of 467 isolates from Churince at Cuatro Ciénegas Basin (CCB), a water system that included a large diversity of well-defined taxonomic groups of *Bacillus* spp. and having a defined ecological coherence among the sampled communities. The phenotypic evaluation of 141 *Bacillus* spp. isolates from this sample revealed great variability in all clades in traits related to carbon compound acquisition, consistent with the exchange of non-complex traits at the tips of the phylogeny. It was unexpected, the high variability in ancestral lineages' traits and the remarkable clade specific differences, auxotrophies were the norm in some clades. Since many of the evaluated traits can be considered collective action traits, such as swarming motility, biofilm formation and the use of phosphorus sources, it is intriguing whether the observed variability is a manifestation of evolution acting both at individual and community level.

1 INTRODUCCIÓN

Las comunidades son ensamblajes de diferentes especies, en las cuales los organismos co-ocurren en un entorno determinado e interactúan unas con otras (Konopka, 2009). Las estrategias moleculares han sido fundamentales en el descubrimiento de la gran diversidad taxonómica de las comunidades microbianas. Sin embargo, una de las cuestiones fundamentales en ecología microbiana es entender lo que la clasificación taxonómica de un organismo realmente significa en el nivel funcional y está claro que el saber "quién está allí" ya no es la pregunta más relevante. La relación entre la filogenia y rasgos funcionales han revelado una gran variabilidad, lo que limita el poder predictivo de los enfoques de la composición microbiana. La mayoría de los estudios que se han realizado muestran la consistencia de los rasgos a nivel de phylum (Koeppel y Wu, 2012; Goldfarb *et al.*, 2011; Philippot *et al.*, 2010). Los rasgos ecológicos pueden ser específicos para especies o cepas ya que los genomas microbianos son altamente dinámicos y pueden cambiar rápidamente a través de la pérdida y la adquisición de genes de linajes distantes a través de la transferencia horizontal de genes (HGT) (Boon *et al.*, 2014). Además, se ha demostrado que las cepas dentro de una determinada especie pueden tener entre 20 a 30% de diferencias en el contenido de genes. Por lo tanto, las especies de bacterias se consideran mosaicos de genes transferidos, ya que su gran diversidad genética se obtiene de organismos distantemente relacionados (Ochman *et al.*, 2000). Las diferencias en el estilo de vida se correlacionan con las variaciones en los genes necesarios para interactuar con

ambientes específicos. Se ha demostrado que las capacidades para la absorción de nutrientes, tales como diferentes fuentes de carbono, son transferidos fácilmente o evolucionan rápidamente de una función a otra, probablemente debido a que dependen de pocos genes. Se ha reportado que estos rasgos se encuentran filogenéticamente dispersos (variación de rasgos entre especies claramente relacionadas), y por lo tanto se observa su capacidad de moverse superficialmente en las filogenias (Martiny *et al.*, 2013). Por el contrario, los rasgos asociados con funciones complejas, tales como la fotosíntesis y la producción de metano, se encuentran sólo en clados profundos (Martiny *et al.*, 2013).

La ecología de comunidades investiga las interacciones complejas entre los organismos y las consecuencias ecológicas y evolutivas de estas interacciones en una comunidad. Se ha sugerido que los genes y las funciones se pueden perder cuando éstos ya no son necesarios en el hábitat o cuando las funciones pueden ser realizados por miembros de la comunidad por lo que la producción de bienes públicos es suficiente para apoyar la estabilidad de la comunidad (Visser *et al.*, 2010; McInerney *et al.*, 2011; Morris *et al.*, 2012; Boon *et al.*, 2014). Otro aspecto fundamental de las comunidades microbianas son las interacciones sociales entre las células. Muchos fenotipos a nivel individual influyen en el entorno de sus vecinos, como por ejemplo, en su crecimiento y reproducción. Algunos procesos ecológicos importantes, de hecho, se basan en una serie de rasgos sociales, tales como la formación de “biofilm”, el “swarming”, y el “quorum sensing”. Los rasgos sociales como el “swarming” y la formación de “biofilm” son funciones conservadas en clados profundos (Daniels *et al.*, 2004). Estos rasgos son considerados de acción colectiva,

ya que actúan a nivel de grupo (Stoodley *et al.*, 2002, Daniels *et al.*, 2004). Estas funciones dependen de la expresión de exopolímeros metabólicamente costosos, en el caso de “biofilms”, y en el caso de “swarming” de biosurfactantes y DNA extracelular (Daniels *et al.*, 2004; Velicer y Yu, 2003; Spoering y Gilmore, 2006). Estas sustancias secretadas pueden ser consideradas bienes públicos. La evolución de los rasgos sociales ha sido el centro de numerosos trabajos (Nadel *et al.*, 2008; Boyle *et al.*, 2013; Gardner *et al.*, 2007; Velicer y Yu, 2003; Kearns, 2010). Witham y col., (2006) proporcionaron un marco de referencia para entender cómo los rasgos genéticos pueden tener una influencia a nivel de especies y a nivel de los ecosistemas, una hipótesis soportada por estudios de selección de múltiples niveles y de las consecuencias en la adecuación de los efectos genéticos indirectos. La mayoría de los esfuerzos para abordar este tema se llevan a cabo en los sistemas de laboratorio y existe muy poca información sobre la variabilidad de los rasgos en las bacterias de las comunidades naturales y aun menos de los rasgos involucrados en la interacción social.

La cuenca de Cuatro Ciénegas (CCB) se encuentra en el desierto de Coahuila, aislada por montañas altas de hasta 3,000 m de altura. Alberga un gran número de manantiales y sistemas de agua y posee una alta riqueza biológica, numerosos endemismos de flora y fauna (peces, tortugas, plantas vasculares) (Pinkava DJ, 1984), además de una gran diversidad microbiana descrita a nivel de phylum dentro de los diferentes sitios (Souza *et al.*, 2012). Hemos estudiado sistemáticamente la diversidad de bacterias, en particular del sistema acuático Churince el cual está ubicado en la ladera Oeste de la Sierra de San Marcos (26°50'53" Norte, 102°08'31"

Oeste y altitud de 746 msnm) y posee una longitud de aproximadamente 2 kilómetros. Forma parte del Área de Protección de Flora y Fauna de Cuatrociénegas. Inicia con un manantial, seguido de una laguna intermedia y finaliza en una laguna desecación. Uno de los géneros representativos de este sistema es el grupo *Bacillus* spp., el cual posee rasgos correlacionados con el sistema oligotrófico, y el ambiente limitado en fósforo. Por ejemplo, *Bacillus coahuilensis* se sugiere que ha adquirido de cianobacterias por HGT, los genes implicados en la utilización de fósforo y de la adaptación a ambientes de alta radiación solar (Alcaraz *et al.*, 2008). También se ha demostrado que los *Bacillus* spp. de las comunidades de sedimento no están ensambladas de forma aleatoria y que las interacciones bióticas entre los miembros de éste género (específicamente, el antagonismo) han desempeñado un papel fundamental en la conformación de la estructura de la comunidad en este sistema (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2013).

En este trabajo hemos explorado la diversidad fenotípica de los miembros del género *Bacillus* spp. que co-ocurren principalmente en la comunidad de sedimentos, para conocer si existe coherencia a nivel de género y especie en varios rasgos fenotípicos. Se analizaron rasgos relacionados con la utilización de recursos como la obtención de carbono y fósforo y los que influyen en el comportamiento social, tales como la formación de “biofilms” y la motilidad, considerados rasgos de acción colectiva. Nuestros resultados revelaron una gran variabilidad en los rasgos, lo que sugiere que la evolución podría estar actuando en dos niveles, uno a nivel de especies individuales y la otra a nivel de la comunidad.

2 ANTECEDENTES

2.1 Comunidades microbianas y distribución

Las comunidades son ensamblajes de diferentes especies, en las que co-ocurren e interactúan los organismos entre sí (Konopka, 2009). Los microorganismos de vida libre han sido considerados cosmopolitas debido a su alto potencial de dispersión, grandes tamaños de población, altas tasas reproductivas, su habilidad para sobrevivir en condiciones inhóspitas y su amplia diversidad genética (McArthur, 2006). Recientes investigaciones han sido dirigidas hacia la búsqueda de patrones de distribución microbiana como lo realizado para las plantas y los animales (Martiny *et al.*, 2006; Fitter *et al.*, 2005). En diferentes trabajos se ha encontrado comunidades ensambladas con diferentes especies y relacionadas con las características ambientales (Bordez *et al.*, 2016). Por ejemplo, Whitaker y col., (2002) estudiaron la distribución de *Sulfolobus islandicus* de ocho sitios diferentes de Islandia, del occidente de Estados Unidos y de Kamchatka, en Rusia, secuenciaron fragmentos de ocho genes que codifican para algunas proteínas y revelaron que cada cepa forma clados monofiléticos de acuerdo a la localización de muestreo.

Varios factores bióticos y abióticos además de los procesos biológicos, tienen un impacto importante en la distribución microbiana (Ramette y Tiedje, 2007). Se ha encontrado que dicha distribución está asociada a las variables ambientales como el pH, salinidad, temperatura, las fuentes nutrimentales, luz, humedad del suelo, etc.

(Tsiknia *et al.*, 2014; Lozupone y Knight, 2007; Fierer y Jackson, 2006; Lauber *et al.*, 2009). Lozupone y Kinght (2007) evaluaron la relación de la diversidad microbiana con base en 21,752 secuencias del gen rRNA 16S de 202 muestras ambientales diferenciadas por algunos factores físicos y químicos. A grandes rasgos, observaron que la salinidad influyó principalmente en la composición de la comunidad microbiana. Por otra parte, Nemergut y col. (2013), evaluaron la importancia de 14 tipos de hábitats con varios gradientes ambientales como sedimentos salinos, sedimentos marinos, agua de mar, lagos, etc. y mostraron que hay una distribución diferencial dentro de los diferentes tipos de hábitats.

Otros estudios reportan que la distribución microbiana está fuertemente asociada con los factores bióticos tales como antagonismo, cooperación, depredadores, virus, etc. (Aguirre von-Wobeser *et al.*, 2014; Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2013; Freilich *et al.*, 2011). Por ejemplo las interacciones competitivas y/o la especialización del nicho puede ser importante en estructurar las comunidades bacterianas (Horner-Devine *et al.*, 2007).

2.1.1 Procesos de ensamble de la comunidad: Filtrado del hábitat y competencia

El ensamble de la comunidad ha sido definido como la agrupación de organismos filogenéticamente relacionados, formada y mantenida por colonizadores potenciales de las comunidades locales que llegan de forma secuencial (Fukami, 2004). El ensamble de las comunidades microbianas está limitado por la habilidad de

colonizar nuevos hábitats a través de procesos como la competencia local y el filtrado ambiental (Martiny *et al.*, 2006). El primer proceso es considerado el principal promotor de la evolución, en este caso, si las especies claramente relacionadas poseen rasgos morfológicos y respuestas fisiológicas similares, estas tenderán a competir más fuertemente por la misma fuente que las especies distantemente relacionadas, por lo que una coexistencia estable requiere que los miembros difieran en sus nichos (divergencia ecológica). Este proceso está basado en el principio de exclusión competitiva, que propone que una de las especies en competencia siempre dominará a la otra, llevándola a la extinción, a cambiar de hábitat o a una modificación evolutiva (Hardin, 1960).

En el segundo proceso conocido como el filtrado del hábitat, el ambiente es el factor determinante para que una especie permanezca en una comunidad, es decir, el ambiente es un filtro que actúa removiendo especies que carezcan de rasgos particulares y que les permitan mantenerse dentro de las condiciones particulares de ese hábitat. Este proceso, al contrario de la competencia, guía al agrupamiento filogenético y a la coherencia ecológica (Weiher y Keddy, 1995; Pausas y Verdu, 2010). Sin embargo, en Cuatro cienegas hemos observado que la gran diversidad microbiana no corresponde a ninguno de los 2 modelos, ya que al ser el lugar con menos nutrientes que se conoce, esperaríamos que tanto el filtrado ambiental como la competencia redujeran la diversidad a algunos grupos dominantes muy eficientes en el uso de los recursos limitantes.

Para conocer qué procesos ensamblan una comunidad en particular es necesario conocer tres elementos: la filogenia, la composición de la comunidad y los rasgos

que son ecológicamente relevantes para un organismo (Webb *et al.* 2002; McArthur, 2006).

2.2 Demarcación de especies bacterianas y coherencia ecológica

2.2.1 Definición de especies

Tener un concepto de especie es importante para cualquier aspecto de la biología, la ecología y la evolución. Las especies son consideradas la unidad fundamental de la naturaleza (MacArthur, 2006; Philippot *et al.*, 2010) y de acuerdo a Roselló-Mora y Amann (2001) son descritas como un grupo monofilético y genómicamente coherente de organismos individuales que muestran un alto grado de similitud en muchas características independientes. Aunque los conceptos propuestos de especie para procariontes hasta la fecha no han sido totalmente aceptados, son cuatro las definiciones que actualmente están en debate como: el concepto biológico de especie, el fenético, el evolutivo y el filogenético (MacArthur, 2006).

En el primer concepto, el biológico, la especie es definida como un grupo de organismos capaces de entrecruzarse y de producir descendencia fértil, pero que además están reproductivamente aislados de otros grupos (Mayr, 1942), sin embargo, aunque esta definición encaja bien en organismos sexuales no es así para bacterias. Por otra parte, el concepto fenético de especies se basa en la similitud fenotípica, la ausencia o presencia de un rasgo permite la clasificación o identificación de una especie (MacArthur, 2006). En cambio, el concepto filogenético define una especie como un grupo que tiene una historia evolutiva compartida y

única, donde los miembros descienden de un ancestro común. Finalmente el concepto evolutivo define a la especie como un linaje que mantiene su identidad con otros linajes, sus tendencias evolutivas y destino histórico (Wiley, 1978). Aunque la definición más comúnmente aceptada es la definición de especies polifásica, que la propone como un grupo con coherencia genómica de cepas o aislados individuales que comparten un alto grado de similitud en muchas características independientes, probados de manera comparativa bajo condiciones altamente estandarizadas (Stackebrandt *et al.*, 2002). Los métodos para definir una especie deben tomar varios criterios como datos fenotípicos a partir de pruebas bioquímicas y composición de ácidos grasos, patrones de restricción de DNA y realizar la identidad de secuencias de genes como los ribosomales. Por ejemplo, el grado de similitud genómica es evaluada por hibridación DNA-DNA, un valor mayor a 70% de re-asociación se considera para demarcar especie, cuando se utiliza la secuencia del gen 16S rRNA, un valor de 97% identidad mínima se usa como referencia y finalmente un rango promedio de identidad de nucleótidos (ANI) de 95-96% para demarcar especies (Gevers *et al.*, 2005, Kim *et al.*, 2014).

2.2.2 Coherencia ecológica de especies

La coherencia ecológica implica que los miembros de un taxón compartan estrategias de vida o rasgos que los distingan de miembros de otros taxones (Philippot *et al.*, 2010). Sin embargo, la limitación de la información acerca de la coherencia ecológica en bacterias radica principalmente en la dificultad en la

demarcación de especies.

Las especies relacionadas frecuentemente tienen requerimientos ecológicos similares, derivados de su ancestro común. Este modelo, llamado conservacionismo del nicho filogenético ha sido descrito con respecto a factores bióticos y abióticos (Futuyma, 2009). La cuestión de si forman unidades filogenéticamente coherente y la medida en que dichas unidades se correlacionan con las características fenotípicas y adaptaciones del medio ambiente han sido objeto de debate (Philippot *et al.*, 2010). Esto hace oportuno formular preguntas acerca de los niveles dentro de las jerarquías taxonómicas que muestran la coherencia en el estilo de vida y si existen clados que compartan rasgos ecológicos únicos (Philippot *et al.*, 2010).

Algunos estudios realizados muestran consistencia de rasgos a nivel de phylum (Koeppel y Wu, 2012; Goldfarb *et al.*, 2011; Philippot *et al.*, 2010). Por ejemplo, el phylum Chlamidiae y los miembros del phylum Cianobacteria son conocidos por ser grupos ecológicamente coherentes, ya que para el primero todos sus integrantes son simbioses intracelulares obligados, mientras que en el segundo phylum, todos son capaces de crecer fotoautotróficamente. Por otra parte, Hunt y col., (2008) sugieren que los rasgos ecológicos pueden ser específicos de cepas y las bacterias claramente relacionadas pueden ocupar nichos distintos, por lo tanto son ecológicamente divergentes, ya que un nicho microbiano puede cambiar debido a que los genomas microbianos son altamente dinámicos después de eventos como la pérdida de genes, duplicación de genes y adquisición de genes de linajes distantes a través de la transferencia horizontal de genes (HGT) (Boon *et al.*, 2014; Gogarten *et al.*, 2002). Por otra parte, se menciona que la HGT toma lugar

únicamente entre especies bacterianas claramente relacionadas debido a las barreras genéticas reducidas que pueden mantener la coherencia ecológica (Kurland *et al.*, 2003).

Konstantinidis y col. (2006), sugieren que la coherencia solamente aplica a los eucariontes pero no al mundo bacteriano, pero si esto llega a pasar, ocurre a diferentes niveles taxonómicos. Se ha mostrado que una especie puede tener entre un 20 a un 30% de diferencias en el contenido de genes (Konstantinidis *et al.* 2006). Si hay por lo menos 1,000 genes diferentes, incluso a nivel de especie, puede esperarse numerosas diferencias fenotípicas y no debería ser sorprendente encontrar una especie con la habilidad de colonizar diferentes hábitats. Se conoce que las especies bacterianas son un mosaico de genes transferidos ya que su gran diversidad genética es obtenida a partir de organismos distantemente relacionados (Ochman *et al.*, 2000).

2.3 Comportamiento social de los microorganismos dentro de las comunidades y los rasgos fenotípicos

Las comunidades microbianas son organizaciones sociales complejas de múltiples células (Oleskin, 1994). Dentro de estas comunidades, los microorganismos tienen la habilidad de interactuar con los miembros de su comunidad a través del comportamiento multicelular (dispersión, adquisición de nutrientes, formación de “biofilm”, “quorum sensing”, biosurfactantes, sideróforos, etc.) (West *et al.*, 2006). La producción de bienes públicos es la forma más común de comportamiento social,

en la que un individuo provee productos que son liberados en el ambiente para él y sus vecinos, aunque se propone que serán mayormente favorecidos los organismos filogenéticamente relacionados (discriminación por parentesco) (West *et al.*, 2006). West *et al.*, (2006), consideran que existe un enorme número de comportamientos y rasgos sociales que no han sido examinados desde el punto de vista evolutivo.

Los microorganismos cooperan y coordinan sus actividades para expresar rasgos a nivel de población (Ross-Gillespie y Kümmerli, 2014). Esta coordinación requiere un proceso de toma de decisiones colectiva (acción colectiva) para lograr un efecto combinado de los comportamientos individuales dentro del grupo, con el fin de llegar a tener una respuesta frente a su ambiente físico o social (Ross-Gillespie y Kümmerli, 2014; Travisano y Veliser, 2004).

Los rasgos son todas aquellas características morfológicas, fisiológicas o fenológicas, que impactan indirectamente sobre la adecuación a través de sus efectos sobre el crecimiento, la reproducción y la supervivencia (Violle *et al.*, 2007). Los rasgos median las interacciones entre los organismos y el ambiente (Violle *et al.*, 2007), ya que les confieren la capacidad a los organismos de ocupar un nicho particular (Moullot *et al.*, 2013). De acuerdo a McGill y col., 2006 y Violle y col., 2007, las investigaciones que se basan en los rasgos son más relevantes que el análisis de la comunidad y que los atributos filogenéticos o taxonómicos. Por esta razón es que ha surgido un creciente interés en los rasgos funcionales en las que se incluyen características de un organismo que están relacionadas con su adecuación y el rendimiento (McGill *et al.*, 2006).

Los estudios comparativos en rasgos bacterianos y genomas están basados en cepas que han sido muestreadas de ambientes ampliamente diversos. Muchos rasgos funcionales han sido encontrados filogenéticamente dispersos en bacterias (Martiny *et al.*, 2013). De acuerdo a Smith y col (2001) los genes involucrados en el comportamiento social, específicamente genes de factores de virulencia, pueden ser transferidos horizontalmente entre diferentes linajes bacterianos a través de elementos genéticos móviles (Smith *et al.*, 2001), por lo que la coherencia filogenética de estos factores de virulencia es escasa. Por lo que estos estudios, muestran que las diferencias en los estilos de vida se correlacionan con variaciones en los genes requeridos para interactuar con ambientes específicos.

Por otra parte, se ha propuesto que los genes y funciones pueden ser perdidos cuando éstos ya no son necesarios en el hábitat o pueden realizarse por miembros de la comunidad, por lo que los productos son suficientes para soportar la estabilidad de la comunidad (McInerney *et al.*, 2011, Morris *et al.*, 2012, y Boon *et al.*, 2013). La producción de enzimas extracelulares, exopolisacáridos, surfactantes, compuestos antimicrobianos entre otros, son considerados bienes públicos o rasgos de acción colectiva, generados por algunos miembros de la comunidad pero donde logran beneficiarse otros (cheaters) (Pirhonen *et al.*, 1993; Vu *et al.*, 2009; Kearns, 2010; Xavier, 2011). En los últimos años, ha surgido un creciente interés en conocer cómo y cuándo los microorganismos cooperan entre los miembros de la comunidad (Velicer and Yu, 2003), por ejemplo, los mecanismos fisiológicos y moleculares involucrados en las interacciones, el impacto en la fisiología y la adecuación de estas comunidades así como la influencia de las condiciones ambientales y las

señales extracelulares en la función y fisiología de las comunidades (Crespi, 2001).

2.4 El género *Bacillus*

2.4.1 Generalidades del género *Bacillus*

El género *Bacillus* está caracterizado por la morfología de su célula en forma de bastón. Sus miembros son Gram positivos, aunque en algunos casos pueden ser Gram negativos dependiendo de la edad del cultivo. Suelen encontrarse formando filamentos, su tamaño es de 0.5-2.5 μm x 1.2-10 μm , poseen la habilidad de moverse por medio de flagelos peritricos, son catalasa positivos, quimioorganotrofos, son anaeróbicos facultativos o aeróbicos, pero además forman estructuras especiales que resisten condiciones inhóspitas (resistentes al calor, radiación, desecación, desinfectantes), conocidas como endosporas (Buchanan, 1970; Turnbull, 1986, Claus y Berkeley, 1986).

Un primer estudio comparativo sobre diferentes especies de *Bacillus* fue realizado por Smith y col. (1952), con 1134 cepas las cuales fueron divididas en 3 grupos y asignadas a sólo 19 especies diferentes, dada su similitud por sus propiedades morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. Posteriormente, en el segundo volumen del manual Bergey de Bacteriología se dividió a este género en 26 especies (Claus y Berkeley, 1986).

De acuerdo con Claus y Fritze (1989) los problemas para la clasificación de especies dentro del género *Bacillus* radican principalmente en la formación de

esporas, la tinción gram, diferencias en el contenido de la pared celular y la variación en el metabolismo de carbohidratos. Por ejemplo, la formación de esporas depende de las condiciones con las cuales el cultivo fue probado. Charney y col., 1957, encontraron que el manganeso estimulaba fuertemente la esporulación de *B. subtilis*, *B. brevis*, *B. megaterium* pero no así de *B. pumillus*. En cuanto a la tinción gram, la edad del medio de cultivo influye en la tinción, así por ejemplo en las primeras etapas de crecimiento, suele teñirse de violeta, por lo que son clasificadas como gram positivas.

El género *Bacillus* comparte junto con el género *Clostridium* el mismo phylum (Firmicutes), y al igual que los *Bacillus*, se han caracterizado por la formación de esporas, la capacidad de formación de “biofilm”, y de moverse a través del “swarming” y el “swimming” (Baban *et al.*, 2013; Dapa *et al.*, 2012), por lo que son considerados rasgos profundamente enraizados a la filogenia.

En *B. subtilis*, una de las especies más estudiadas, se ha encontrado que para la expresión de algunos rasgos están involucrados un gran número de genes, por ejemplo, para la formación de “biofilm” aproximadamente 58 genes están involucrados, para el “swarming” y “swimming” alrededor de 68 genes, y para la esporulación aproximadamente 168. Esto complica la noción de que estos rasgos puedan ser adquiridos por ganancia de genes.

2.3.2 Hábitat del género *Bacillus*

Debido a la formación de esporas, el género es considerado ubicuo en el ambiente, ya que estas estructuras pueden ser dispersadas fácilmente por el viento (Earl *et al.*, 2008). Sin embargo, algunos autores consideran que dependiendo del origen o de la fuente de aislamiento, es entonces considerado el hábitat de alguna de las especies de *Bacillus*. Por ejemplo, el hábitat de *B. subtilis* suele considerarse muy amplio pero es aislado con frecuencia de suelo; *B. pumillus* y *B. licheniformis* sólo de suelo; *B. cereus* y *B. thuringiensis* del suelo y los alimentos; para *B. anthracis* su hábitat son los vertebrados (Slepecky y Hemphill, 2006), por mencionar algunos.

Una de las clasificaciones del género *Bacillus* está basada principalmente en su ecofisiología y sus aplicaciones industriales, como la producción de antibióticos y por su patogenicidad a insectos y otros animales (Ravel y Fraser, 2005).

2.3.4 Comportamiento social y multicelularidad del género *Bacillus*

B. subtilis, la especie más estudiada del género, exhibe características multicelulares y sociales como el “swarming”, el “biofilm” y la esporulación (González-Pastor *et al.*, 2003), sin embargo, estos rasgos están profundamente enraizados en el linaje de los *Bacillus* (Macfarlane *et al.*, 2001, Barban *et al.*, 2013).

La esporulación, uno de los rasgos más característicos de los *Bacillus*, ha sido uno de los mejor estudiados en la especie modelo *B. subtilis*. Diferentes trabajos se enfocan en los cambios fisiológicos y morfológicos que ocurren durante la transición

de las células vegetativas a las esporas, así como los factores que disparan la esporulación (Errington, 1993; Losick, 1982; Partridge y Errington, 1993; de Vries *et al.*, 2005). La espora ha sido considerada un estado latente de la célula, es decir la actividad metabólica es baja o incluso nula, por lo que la interacción con los demás miembros de la comunidad no ocurre (Sussman y Halvorson, 1966). Trabajos recientes, sin embargo, realizados con técnicas moleculares y computacionales, sugieren que aún en estado latente las células pueden influenciar en la estructura y función de comunidades microbianas en ambientes complejos (Lennon y Jones, 2011).

El “swarming” es un comportamiento multicelular que permite a las bacterias moverse rápidamente a través de superficies sólidas (Kearns, 2010). Este movimiento depende de la síntesis de flagelos y la producción de surfactantes que es un factor muy importante para la dispersión de estas células ya que reduce la tensión superficial (Cosmina *et al.* 1993; Kearns y Losick, 2003). Por otro lado, el “swimming”, contrario al “swarming”, es un movimiento de células individuales que independientemente perciben señales químicas que disparan la respuesta quimiotáctica y sólo requieren de flagelos para la dispersión (Calvio *et al.* 2005).

En cuanto al “biofilm”, *B. subtilis* también es el organismo modelo para estudiar las bases moleculares de la formación de este rasgo (Vlamakis *et al.*, 2013). Por ejemplo, dentro de una colonia de esta especie, se ha encontrado que coexisten diferentes tipos de células expresando genes diferentes, a pesar de que son genéticamente idénticas (Phelan *et al.*, 2012). Los “biofilms” pueden estar constituidos por una o múltiples especies (Davey y O’toole, 2000). La presencia de

este rasgo se ha sugerido que le permite a las bacterias adherirse a las fuentes de nutrientes disponibles, adherirse a células epiteliales (Costerton *et al.*, 1987; Auger *et al.*, 2009) o les permite a los microorganismos interactuar para lograr una mejor adaptación ante cambios ambientales (Kaiser y Losick, 1993; Davey y O'toole, 2000).

2.4 Cuatro Ciénegas Coahuila

La cuenca de Cuatro Ciénegas (CCB) se encuentra en el desierto de Coahuila, aislada por montañas altas de hasta 3,000 m de altura, caracterizada por su belleza natural que incluye manantiales, arroyos y pozas (Souza *et al.*, 2006). Este lugar posee un alto número de especies endémicas de flora y fauna (>70), una enorme diversidad microbiana (Proteobacterias, Acidobacterias, Catinobacterias, Bacteroidetes, Chlamidiae, Chlorobi, Chloroflexi, Firmicutes, Cianobacteria, etc.) de la que aproximadamente 50% de los filotipos están cercanamente relacionados a taxones marinos (Souza *et al.*, 2006; Souza *et al.*, 2012). La biota está adaptada a condiciones extremas ya que el ambiente posee concentraciones altas en magnesio y de sulfatos (54866,67 mg/L de Mg, 74302,64 mg/L SO_4^{2-}) (López-Lozano *et al.*, 2012; Rebollar *et al.*, 2012) pero un contenido de fósforo extremadamente bajo (0.6 μ mol/L de fósforo total) (Elser *et al.*, 2005), por lo que es considerado un sistema extremadamente oligotrófico.

Debido a las características biológicas, diferentes organismos nacionales e internacionales como la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la

Biodiversidad (CONABIO), World Wildlife Fund (WWF), Ramsar Convention on Wetlands y Man and Biosphere (MAB)/UNESCO la consideran un área prioritaria para la conservación (Escalante, 2008).

Una de las paradojas de las pozas de CCB es la existencia de una alta diversidad bacteriana, por lo que surge el interés de conocer cuáles son las estrategias que poseen para coexistir en las condiciones oligotróficas. Ecosistemas semejantes a estas condiciones oligotróficas son los bentos marinos, en la que los gradientes tróficos, los depredadores y las diferentes estrategias de supervivencia juegan un papel fundamental en la diversidad (Hewson *et al.*, 2003). Dentro de las adaptaciones genómicas evidentes de *B. coahuilensis* se encuentran genes involucrados en la optimización del uso del fósforo y de adaptación a ambientes de alta radiación. Es capaz de sintetizar sulfolípidos de membrana para optimizar la cantidad reducida fósforo. El segundo *Bacillus* secuenciado, *B. sp. m3-13*, posee un genoma más grande que el de *B. coahuilensis*, 4.2 Mb, y diferentes genes adaptativos para lidiar con la carencia de fósforo, como genes para la utilización de fosfonatos. Sin embargo, aunque este género no es uno de los más abundantes (2.4%) (López-Lozano *et al.*, 2012), se ha demostrado que juega un rol fundamental en el ensamble de las comunidades (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2013).

3 HIPÓTESIS

El género *Bacillus* obtenido del Sistema Churince de Cuatrociénegas Coahuila, posee coherencia ecológica y una gran variabilidad en rasgos relacionados a linajes ancestrales.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Conocer la diversidad y distribución espacial de bacterias termoresistentes, y explorar la coherencia fenotípica de los grupos taxonómicos del género *Bacillus* dominantes en el Sistema Acuático Churince del Valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila.

4.2 Objetivos específicos

1. Analizar la diversidad y distribución espacial de bacterias termoresistentes del Sistema Acuático Churince
2. Evaluar los rasgos fenotípicos caracterizados por evolucionar en los extremos o puntas terminales y los que están profundamente enraizados en la filogenia de los *Bacillus* spp.
3. Conocer si se ha mantenido la coherencia fenotípica entre los diferentes grupos taxonómicos de *Bacillus* spp.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Sitio de estudio

El Sistema Hidrológico Churince está localizado en la parte oeste del valle de CCB y está formado por un manantial, una laguna intermedia y una laguna de desecación. Las muestras de agua y sedimento descritas en este trabajo se tomaron de la laguna intermedia. Las medidas físicas y químicas revelaron condiciones homogéneas a lo largo de los puntos de muestreo tal como pH (7.8 a 8), salinidad (~1.7-2.1 ppt) y temperaturas que flucturaron durante el día de 20 a 35 °C (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2013).

5.2 Muestreo y aislamiento bacteriano

Los aislados de esta colección fueron obtenidos en octubre del 2007 de muestras de agua y de sedimento de la laguna intermedia. Las muestras de sedimento fueron cuidadosamente obtenidas con un área no mayor a 1 cm² de sedimento superficial (nos referiremos a éstas como muestras TOP) y sedimento a 2 cm de profundidad (muestras DEEP). Las muestras fueron sometidas a choque térmico (70°C por 30 minutos) para obtener aislados termoresistentes, que luego fueron plaqueados en cajas Petri con agar Medio Marino Modificado (MM; Cerritos *et al.*, 2008), e incubadas a 37°C por 2 días. Los diferentes morfotipos fueron seleccionados por tamaño, forma y color. Los aislados fueron purificados por sub-cultivo en el mismo medio para asegurar que el cultivo fuera axénico; todos los aislados fueron almacenados a -80°C en MM con glicerol al 15% (w/v). En total obtuvimos 467 aislados termo-resistentes de 11 puntos de muestreo (Figura 1).

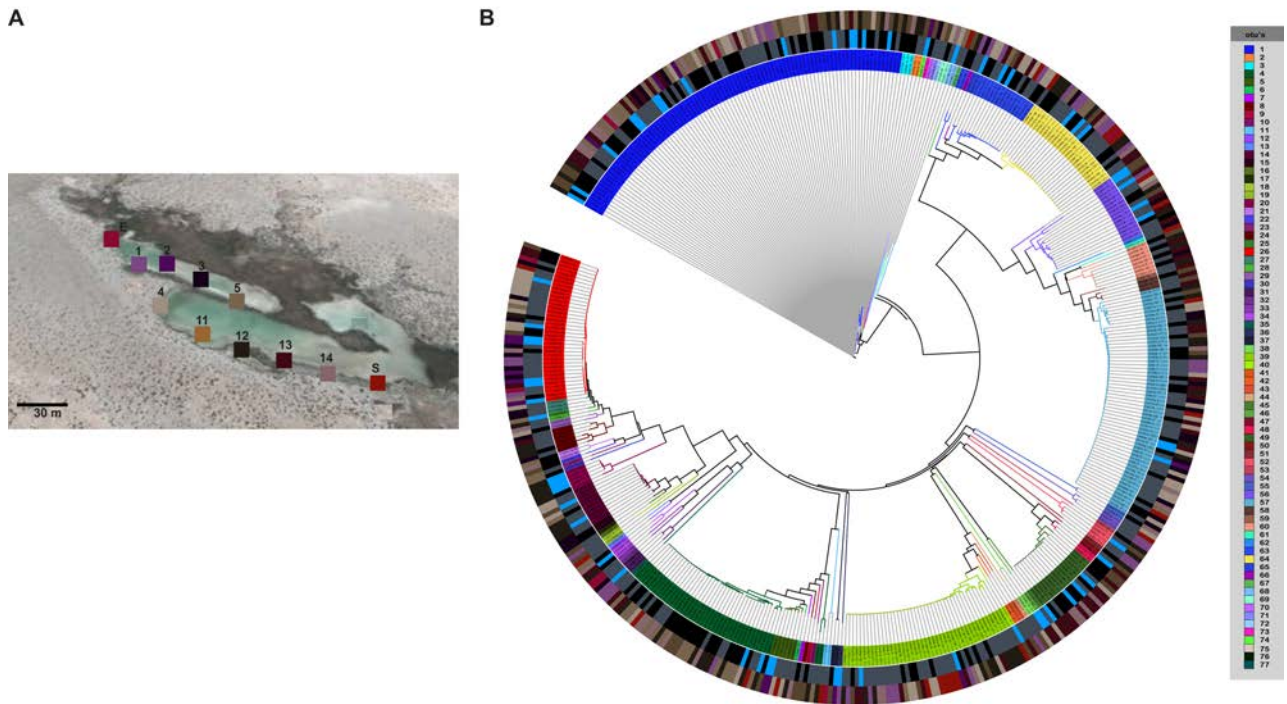


Figura 1. Reconstrucción filogenética y distribución espacial de bacterias aisladas del Sistema Hidrológico Churince. (a) mapa de localización del Sistema Hidrológico Churince y los puntos de muestreo, (b) Reconstrucción filogenética de las secuencias de los aislados termo-resistentes y su asociación con el sitio de muestreo. En el anillo interno, se señalan los OTU's (Unidades Taxonómicas Operacionales) obtenidos con el programa Mothur, seguido de la profundidad de la cual las muestras fueron tomadas (azul: muestras de agua, gris: muestras de sedimento TOP y negro: muestras DEEP del sedimento). El anillo externo muestra los diferentes sitios de muestreo de acuerdo a lo mostrado en la imagen (a).

5.3 Extracción de DNA, marcadores moleculares y reconstrucción filogenética

El DNA de los aislados fue purificado usando el Kit S QuickGene DNA (Fujifilm Corporation, Minato-Ku, Japan) siguiendo las instrucciones del fabricante. El gen 16S rRNA fue amplificado por PCR usando los oligos 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y 1492r (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' (Lane, 1991). Esta amplificación incluye las regiones V1 a V3 (approx. 275 pb de la región 5' terminal) considerada la más informativa para *Bacillus* spp., (Goto *et al.*,

2000). La reacción de PCRs fue llevada a cabo usando 30 ciclos a 94°C, 55°C y 70°C en un termociclador Gradient Palm–Cycler™ de Corbett Research. Por otra parte, para tener una filogenia con una mejor resolución optamos por amplificar y secuenciar el gen *gltX* (glutamil-tRNA sintetasa). La región de 700 pb del gen *gltX* fue amplificada usando los oligos *gltX*-for (5' CGYGGBGADGAYCAYATYT 3') y *gltX*-rev (5' CRATTTTCMGDCRRWARCT 3'). Los productos de PCR fueron secuenciados por la metodología Sanger (Sanger *et al.*, 1977) en el Cinvestav-Langebio (Irapuato, México). Las secuencias del gen 16S rRNA fue calificado con Phred (Ewing *et al.*, 1998), y las secuencias de por lo menos 500 pb fueron usadas para el análisis. Las secuencias del gen *gltX* fueron ensambladas con CAP 3 (Huang y Madan, 1999). Los números de acceso y la lista de todas las 467 cepas pueden ser encontrados en la Tabla Suplementaria 1.

El método de Máxima Verosimilitud (Guindon *et al.*, 2010) fue usado para reconstruir la historia filogenética de todas las bacterias aisladas a través del gen 16S rRNA. Por otra parte, una segunda reconstrucción filogenética fue hecha con el software MrBayes para las secuencias de una submuestra de 141 *Bacillus* spp. de los cuales los rasgos fenotípicos fueron obtenidos. Además, las secuencias del gen *gltX* de los mismos 141 *Bacillus* spp. fueron obtenidos, para aumentar la resolución de grupos particulares. Las secuencias fueron agrupadas usando CLANS (Huelsenbeck y Ronquist, 2001; Frickey y Lupas, 2004).

5.4 Análisis filogenético de las comunidades de aislados termoresistentes

Un total de 467 secuencias del gen 16S rRNA fueron analizadas (240 para TOP, 164 para DEEP y 63 para COLUMN) usando Mothur para asignar OTU's con un

umbral de similitud del 97% (Schloss *et al.*, 2009). La base de datos del clasificador Proyecto Ribosomal (RDP) fue usado para asignar la taxonomía, con un umbral de confianza de 0.8 (Cole *et al.*, 2007). El Índice de Relación Neta (NRI) examina la distancia taxonómica promedio entre especies dentro de una comunidad y fue calculado con el paquete Picante (Webb, 2000; Kembel *et al.*, 2010). Para entender las diferencias composicionales de las comunidades microbianas se utilizó el método UniFrac ponderado y no ponderado. Los datos obtenidos con este método pueden detectar cambios en el número de secuencias presentes de cada linaje (ponderado) y la abundancia relativa de los linajes bacterianos (no ponderado), a través de comparaciones por pares de la comunidad filogenética (Lozupone y Knight, 2005). Finalmente, para identificar las poblaciones ecológicamente distintas, examinamos los datos filogenéticos de los grupos usando el software AdapML software (Hunt *et al.*, 2008). El árbol fue editado en la plataforma iTOL (Letunic y Bork, 2011).

5.5 Ensayos fenotípicos de una submuestra de 141 *Bacillus* spp.

Para evaluar los rasgos fenotípicos de los aislados, como la utilización de diferentes fuentes de carbono, las cinéticas de crecimiento, las auxotrofías, los ensayos de motilidad, y la frecuencia de esporulación se utilizó el medio LPDM modificado (Muller *et al.*, 1997). Este medio contiene: Tris (pH 8.0) [50 mM], NH_4NO_3 [3.3 mM], K_2HPO_4 [0.065 mM], MgSO_4 [3.5 mM], Citrato de Sodio dihidratado [6.8 mM], MnCl_2 [1mM], ZnCl_2 [0.01mM], NaCl [0.17M], FeCl_3 [49.9 μM], CaCl_2 [3.60 mM], KCl [0.67 mM], glucose [100mM], complejo B [100 $\mu\text{L/L}$], biotina [0.1mg/mL], ácido nicotínico [0.1mg/mL], peptona [0.05%] y aminoácidos (Cutting y Vander-Horn, 1990).

Para determinar la preferencia por la utilización de las fuentes de carbono usamos xilosa, rafinosa, sorbitol, trehalosa y glucosa (100 mM) con el medio LPDM. Para los ensayos se usaron placas de microtítulo de 96 pozos y las lecturas se realizaron con un espectrofotómetro μ Quant BioTek. Para estimar la tasa de crecimiento máxima (μ_{max}) y la densidad de saturación, las cinéticas de crecimiento fueron monitoreadas dentro de dos concentraciones de glucosa (5 y 50 mM). Las placas fueron incubadas a 30°C, con vibración constante (100 Hz) y una humedad del 90%. El crecimiento fue monitoreado a OD_{600} usando un lector de microplacas (Tecan Infinite [®] M1000) cada 30 min con ayuda de un robot TECAN EVO (Tecan Infinite [®] M1000) por 24 h.

Para evaluar si las diferentes cepas pueden crecer en ausencia de un aminoácido dado, o la ausencia de peptona o extracto de levadura (que proveen mezclas complejas de péptidos, entre otras sustancias), los cultivos fueron primero cultivados en MM líquido, y luego sub-cultivados dos veces a medio LPDM el cual carecía de aminoácidos, de extracto de levadura y de peptona. Las cepas que fueron capaces de crecer en estas condiciones fueron consideradas protótrofas, pero las cepas que requirieron la adición de aminoácidos, peptona o extracto de levadura fueron evaluadas al transferirlas al medio LPDM que contenía cualquiera de los 20 aminoácidos, y/o el extracto de levadura o la peptona. Esas cepas que pueden crecer sin peptona y extracto de levadura fueron evaluadas en medio LPDM con uno de los 20 aminoácido ausente. El crecimiento fue monitoreado a las 24 h. Los ensayos de motilidad fueron realizados de acuerdo al protocolo descrito en Hamze y col., (2009) para “swarming”, y en Kearns y Losick (2003) para “swimming”. Las placas Petri fueron preparadas con MM con concentraciones de agar al 0.6%

para “swarming” o 0.3% de agar para “swimming”, luego las placas se dejaron secar a temperatura ambiente. El mismo día de la preparación de las placas Petri fueron inoculadas al centro y el cultivo se dejó crecer por 24 h a 37°C. Por otra parte, en la habilidad para la formación de “biofilm” fue evaluada en placas de microtítulo de 24 pozos en MM líquido y los cultivos se dejaron sin agitación por 48 h a 37°C.

Para evaluar la frecuencia de esporulación, los aislados fueron crecidos en MM y Medio para esporulación Difco (DSM) (Nicholson y Setlow, 1990). Las diluciones de las muestras calentadas y sin calentar (20 min a 80°C) fueron plaqueadas en MM para determinar el porcentaje de esporulación (Nakata y Halvorson, 1960).

5.6 Evaluación de la capacidad de las cepas de *Bacillus* spp. para crecer en diferentes fuentes de fósforo

Para conocer las estrategias que tiene este género para lidiar con la carencia de fósforo, se realizó la evaluación en diferentes fuentes de fósforo como el fosfato de potasio, fosfato de calcio, fosfito, ácido 2-aminoetil-fosfónico (2-AEP), 2-fosfonoacetaldehído (2-PA) y DNA. Las 141 cepas de *Bacillus* spp. se cultivaron dos veces secuencialmente en el medio LPDM sin la adición de alguna de las fuentes de fósforo y se incubaron a 37°C por 72 horas, luego fueron pasadas al medio con cada uno de las seis diferentes fuentes de fósforo a una concentración de 1 mM y a un medio control sin la adición de fósforo e incubadas a 37°C por 72 h para evaluar su crecimiento.

5.7 Señal filogenética de los rasgos de *Bacillus* spp.

Para evaluar la señal filogenética de los diferentes rasgos fenotípicos y conocer su tendencia calculamos el valor de K de Blomberg (Blomberg *et al.*, 2003), este valor nos ayuda a revelar si un taxón distantemente relacionado es similar ecológicamente con respecto a otro taxón (es usado para rasgos continuos, como el crecimiento). El valor de $K = 1$ revela una tendencia Browniana, en la cual los cambios de los rasgos son aleatorios, y un valor de $K > 1$ indica que los rasgos son más conservados. Además también llevamos a cabo un análisis para conocer el valor de D de Fritz y Purvis, y se aplica para rasgos con valores discretos y ayuda también a identificar el conservacionismo filogenético. Un valor de $D < 0$ indica que el rasgo está altamente agrupado, $D = 0$ indica que el rasgo está agrupado y sugiere un modo de movimiento browniano, $D = 1$ sugiere un modo aleatorio de evolución del rasgo y $D > 1$ propone una sobredispersión filogenética (Fritz y Purvis, 2010). Tanto el valor de K y el valor de D fueron calculados usando los paquetes Picante y Caper, respectivamente (Kembel *et al.*, 2010; Fritz y Purvis, 2010), ambos con el software R (R development Core Team, 2009).

5.8 Preparación de muestras para microscopía electrónica de transmisión

Doce cepas de *Bacillus* fueron seleccionados para realizar la medición de su longitud y grosor con un Microscopio electrónico de transmisión Marca Morgani Modelo 268. Las cepas fueron cultivadas en Medio Marino Modificado en fase exponencial, se lavó con buffer de cacodilato (0.5M) y se fijó con 1% glutaraldehído por 24 horas. Luego se lavó tres veces por 10 minutos con cacodilato y se fijó con una solución al 1% de tetróxido de osmio. Se lavó nuevamente dos veces por 10

minutos con cacodilato, se eliminó el cacodilato, se agregaron 20 μL de agua destilada y se resuspendió la pastilla, dejándola en baño maría por 10 minutos aproximadamente, se agregó agarosa al 2% y se vortexeó rápidamente para después centrifugar. Después de dejar enfriar la pastilla se le agregaron 250 μL de PBS 1X. Posteriormente cada tercer día se le agregó una solución de etanol (30%, 50%, 70%, 90%, 96%, 100% v/v) cada tercer día. Luego la pastilla se lavó con acetona. La resina se preparó con una mezcla de ERL (50 μl), DER (3ml), NSA (13ml) y 100 μL de DMAE. Se realizaron lavados con resina en serie creciente cada 24 horas (15%, 30%, 75%, 90%). Finalmente se realizaron cortes ultrafinos, se contrastaron rejillas con citrato de plomo y acetato de uranilo y se observó en el microscopio electrónico de transmisión.

5.9 Clasificación de cepas de *Bacillus* por identificación de proteínas ribosomales usando espectrometría de masas

Para corroborar la identidad y clasificación por 16S rRNA utilizamos además espectrometría de masas. Para esto utilizamos sólo 32 cepas representativas de los grupos filogenéticos de *B. pumillus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. marisflavi*, y *B. horikoshii*. Para la preparación de las muestras, las cepas se cultivaron en MM y se cosecharon durante la fase exponencial (hasta una densidad de 0.5) y se obtuvo un volumen de 1 mL para formar una pastilla. Las células fueron centrifugadas y lavadas dos veces con buffer TMA-1 (10 mM de Tris-HCl a pH de 7.8, 30 mM de NH_4Cl , 10 Mm MgCl_2 y 6 mM 2-mercaptoetanol), seguido de la adición de ácido fósmico y ácido trifluoroacético para el rompimiento de las células. Esta solución se ajustó a una densidad óptica de 1.0 (660nm) y luego mezclada con

7.0 μL de solución de ácido sinápico a una concentración de 10 mg/mL en 50% (v/v) de acetonitrilo con 1% de ácido trifluoroacético. Finalmente 1.5 μL de la muestra fue utilizado en el objetivo de MALDI y secado al aire (Hotta *et al.*, 2011). Los espectros fueron observados en el equipo MALDI-TOF Biflex III system (CINVESTAV Unidad Irapuato). Los espectros fueron transferidos al software Biotyper y comparados en la base de datos Maldi Biotyper DB version 2.0.4.0.

5.10 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos de la utilización de las fuentes de carbono, la tasa de crecimiento máximo y la densidad de saturación fueron determinados por ANOVA. Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo con el software R (R development Core Team, 2009).

6. RESULTADOS

6.1 Todos los grupos taxonómicos de los aislados termoresistentes no están aleatoriamente dispersos entre los sitios de muestreo.

Primero decidimos caracterizar la diversidad de bacterias aisladas cultivables de 11 sitios dentro de la laguna Intermedia del Sistema Hidrológico Churince de CCB. Recuperamos 467 aislados termo-resistentes y analizamos las secuencias parciales del gen 16S rRNA, de los cuales resultaron 86 OTU's (usando el programa Mothur con un umbral del 97% de similitud) (Schloss *et al.*, 2009) (Figura 1). De los 467 aislados, 428 fueron clasificados como *Bacillus spp.* y 39 fueron clasificados como *Koccuria sp.* y otras taxas (estos se muestran como grupos con grandes ramas basales en la Figura 1). Las secuencias fueron asignadas a la siguientes categorías: Sitios COLUMN (columna de agua, integrado por 63 miembros), TOP (sedimento superficial, 240 miembros), y DEEP (sedimento sub-superficial con 164 miembros). Para conocer si había diferencias composicionales de las comunidades microbianas de los diferentes sitios de muestreo, determinamos el agrupamiento filogenético entre los 467 aislados. Obtuvimos valores de NRI positivos para las muestras de sedimento (para las muestras TOP el valor fue de 0.58 y para las DEEP de 1.83), indicando agrupamiento filogenético entre los 467 aislados. Sin embargo, para las secuencias de las COLUMN los valores de NRI fueron negativos (-2.28), sugiriendo un patrón filogenético de dispersión de aislados termo-resistentes de la columna de agua en comparación con las muestras de sedimento.

Por otra parte, para entender las diferencias composicionales de las comunidades microbianas, usamos los métodos UniFrac Ponderado y No Ponderado. Los

resultados del UniFrac no Ponderado mostraron diferencias significativas entre los sitios COLUMN y DEEP, y entre DEEP y TOP ($p < 0.05$), indicando que existen diferencias entre las comunidades microbianas que fueron asociadas a la abundancia relativa de las especies, más que diferencias de los linajes presentes en las muestras.

También examinamos si había división espacial de la fuente entre los aislados termo-resistentes. Para esto, analizamos las secuencias con el programa AdaptML, el cual las clasifica por poblaciones formando un hábitat común conocido como “hábitat proyectado”. Los resultados de este análisis identificaron un hábitat proyectado sugiriendo que no hay diferenciación del nicho (datos no mostrados), lo cual soporta la información obtenida con UniFrac no ponderado y con NRI. Todos estos resultados sugieren que los mismos OTUs están presentes en los diferentes sitios de muestreo, lo cual es consistente con los datos fisicoquímicos homogéneos previamente reportados y por lo que se sugirió que no hay un filtro abiótico y que tanto el mutualismo como el antagonismo era el principal proceso que estructura las comunidades de *Bacillus* de sedimento de Churince (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2013).

6.2 Coherencia las preferencias por la utilización de fuentes de carbono entre los linajes de *Bacillus* spp.

El agrupamiento basado en el gen 16S rRNA mostró que varios linajes de *Bacillus* spp. cultivables co-ocurren en el Sistema Churince, sin embargo, esto no revela la variabilidad fenotípica que les permitiría diversificarse en la búsqueda de recursos o para cumplir una función ecológica.

Para determinar la coherencia fenotípica de los diferentes linajes taxonómicos llevamos a cabo el análisis de rasgos fenotípicos en una sub-muestra de 141 aislados, todos pertenecen al género *Bacillus*, de 5 puntos de muestreo y que representan, numéricamente, a los taxones principales. Los aislados elegidos fueron distribuidos en 13 clados (de acuerdo al análisis CLANS, Frickey y Lupas, 2004), pero en 6 de ellos observamos 80% de todos los miembros. Los aislados seleccionados fueron filogenéticamente cercanos a *B. subtilis*/*B. licheniformis*, *B. pumillus*, *B. marisflavi*, *B. aquimaris*, *B. horikoshii* y *B. cereus*. De acuerdo a la clasificación previa de las especies de *Bacillus* basada en la relación evolutiva y funcional, clasificamos los aislados en tres grupos diferentes: 1) Miembros de *Bacillus* del suelo (*B. subtilis*/*B. licheniformis*, y *B. pumillus*), 2) miembros acuáticos (*B. marisflavi*, *B. aquimaris*, y *B. horikoshii*), y 3) especies relacionadas a *B. cereus sensu lato*, que agrupa a *B. thuringiensis*, *B. anthracis* y *B. cereus* (Alcaraz et al., 2010).

Dirigimos entonces el trabajo hacia conocer si había variabilidad en la utilización de diferentes fuentes de carbono. Nosotros observamos que la glucosa fue usada por todos los aislados, pero encontramos variación en la habilidad para utilizar xilosa, rafinosa, sorbitol y trehalosa (Figura 2). El grupo de miembros de suelo exhibió la mayor habilidad para utilizar las fuentes de carbono, seguido por el grupo acuático, y finalmente el grupo de *B. cereus*. El valor de D de Purvis y Fritz para glucosa fue de -2.02 reflejando una alta conservación de este rasgo, mientras que el valor para xilosa, trehalosa, rafinosa y sorbitol fueron todos positivos (0.85, 0.77, 0.7619, y 0.81, respectivamente) indicando que la habilidad para crecer en estos compuestos de carbono están conservados, pero indicando un modelo de movimiento

Browniano. Estos resultados indican que en general, si hay una coherencia fenotípica dentro de los *Bacillus* spp. para la utilización de xilosa, trehalosa, rafinosa y sorbitol y como era de esperarse, si hay una alta coherencia para la utilización de glucosa. Dentro de todos los clados, hay miembros que pueden tener diferentes preferencias por las fuentes de carbono y calificación negativa para la utilización de todas las fuentes de carbono ensayadas.

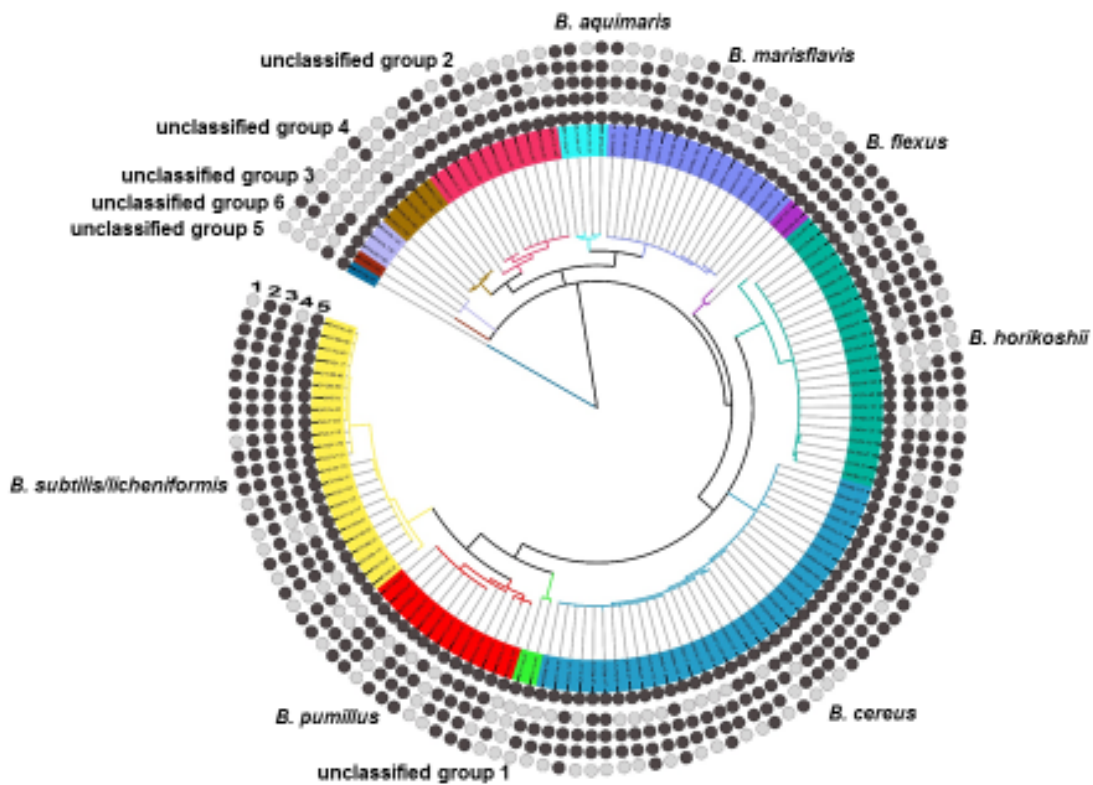


Figura 2. Variabilidad en la utilización de las diferentes fuentes de carbono por los grupos taxonómicos de *Bacillus* spp. Del anillo externo al interno se indican las fuentes de carbono evaluadas 1) sorbitol, 2) rafinosa, 3) trehalosa, 4) xilosa y 5) glucosa. Los círculos oscuros indican la utilización de la fuente de carbono mientras que los círculos claros indican que la cepa no utilizó la fuente. La reconstrucción filogenética fue realizada con el gen 16S rRNA por el método de máxima verosimilitud.

Dado que el sistema de agua Churince es un ambiente oligotrófico, nos interesó evaluar la habilidad de los *Bacillus* spp. para responder a cambios en la disponibilidad de nutrientes. También quisimos determinar si había diferencias clado-específicas en las tasas máximas de crecimiento, o en la densidad de saturación (densidad máxima de crecimiento) que sus miembros podrían alcanzar (Figura 3). Determinamos si al aumentar la concentración de glucosa, diferentes aislados responderían con un aumento del crecimiento. Muchos aislados del grupo *B. subtilis*/*B. licheniformis* respondieron al aumento en la concentración de glucosa, pero también se observó un aumento significativo en el crecimiento en las cepas dispersas por toda la filogenia (Figura 3). Todos los grupos exhibieron una alta densidad de saturación a altas concentraciones de glucosa, pero no hubo diferencias estadísticas significativas con la densidad de saturación o la tasa de crecimiento máxima en cualquiera de las dos concentraciones de glucosa a través de los grupos taxonómicos (Figura 3).

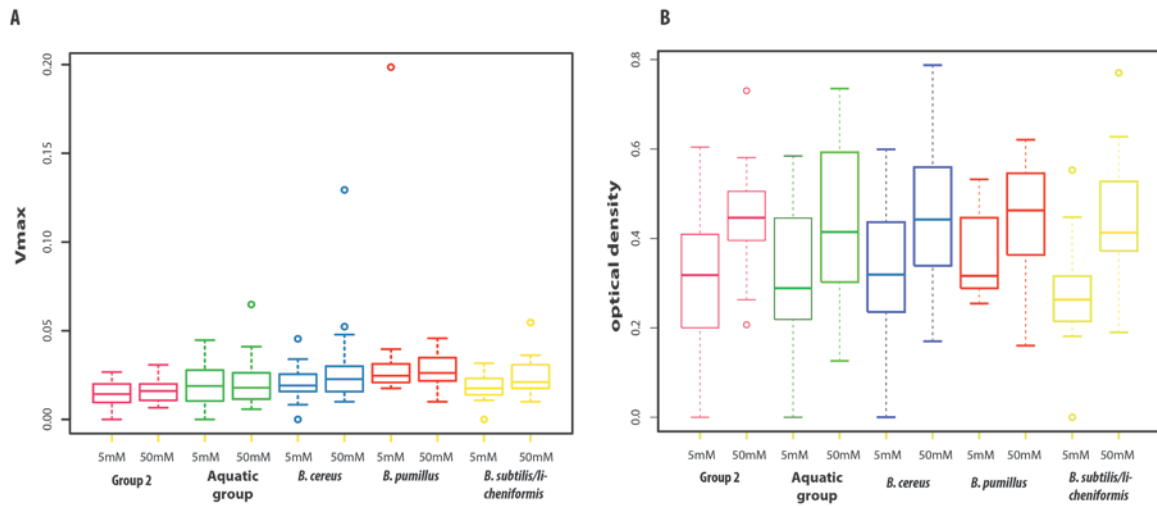


Figura 3. Tasas de crecimiento máxima y densidad de saturación para los diferentes grupos de *Bacillus* spp. A) Análisis de varianza de las tasas de crecimiento máximas para las concentraciones de 5 y 50 mM de glucosa. B) Análisis de varianza de la densidad de saturación con 5 y 50 mM de glucosa.

6.3 Variación extensiva de rasgos profundamente enraizados relacionados en rasgos de acción colectiva

La especie de *B. subtilis* exhibe características multicelulares y sociales, tal como “swarming” y la formación de “biofilm”, además de la esporulación (González-Pastor *et al.*, 2003). Estos pueden ser considerados rasgos de acción colectiva ya que su expresión tiene consecuencias a nivel de grupo. Estos rasgos están profundamente enraizados en el linaje de los *Bacillus* spp. (Stoodley *et al.*, 2002; Daniels *et al.*, 2004), por lo que se asume que son un rasgo fijo de los *Bacillus* spp. y rara vez son evaluados. Nosotros evaluamos la co-ocurrencia de la motilidad “swarming” y “swimming”, y la habilidad para la formación de “biofilm” en la colección de *Bacillus* spp. Nuestros resultados mostraron una sorprendente variabilidad en la conservación de todos los rasgos, pero aún más en ciertos grupos taxonómicos.

Mientras que el “swimming” parece ser un rasgo conservado en todos los clados, algunos miembros parecen haber perdido esta habilidad, particularmente en el grupo de los acuáticos. Por ejemplo, para *B. horikoshii*, sólo 9 de 23 cepas carecen de la habilidad para hacer “swimming” (Figura 4). Respecto al “swarming”, tenemos que destacar que se muestra por la mayoría de los miembros del clado *B. subtilis/licheniformis* y *B. pumilus* y, en contraste, en el clado *B. cereus* 75% de sus miembros calificaron negativamente para esta característica (22 de un total de 34). El “swarming” fue un rasgo ausente en todos los miembros del clado de *B. horikoshii*, y se observó solo un miembro del clado de *B. marisflavi* y *B. aquimaris* (Figura 4).

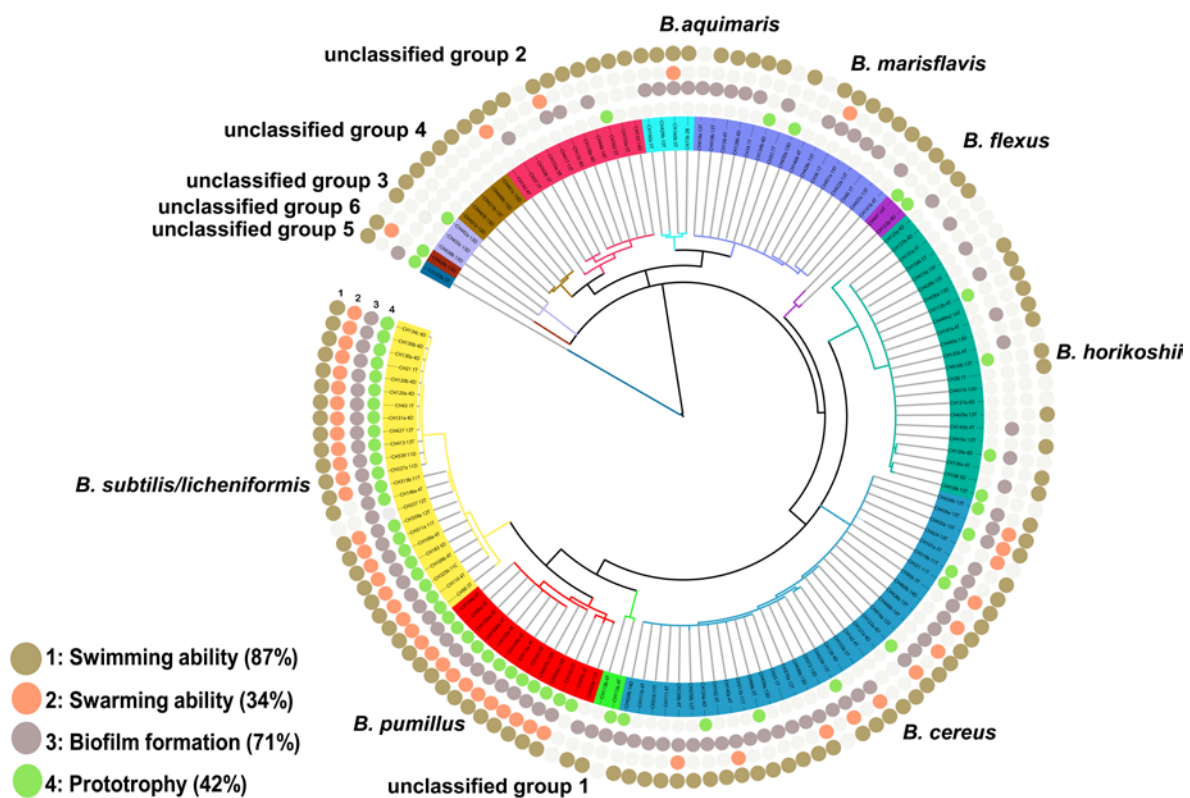


Figura 4. Rasgos de las cepas de los diferentes grupos taxonómicos de *Bacillus* spp. De afuera hacia adentro, los anillos muestran los rasgos evaluados 1) “swimming”, 2) “swarming”, 3) “biofilm” y 4) prototrofia. Los círculos coloreados indican resultados positivos para el rasgo descrito, los círculos vacíos indican resultado negativo.

Respecto a la formación de “biofilm”, observamos intermitencia de los patrones que fue más notable entre los grupos de *Bacillus* spp. acuáticos. Mientras que este rasgo estuvo raramente ausente en miembros de los grupos *B. subtilis/licheniformis-pumilus* o *B. cereus* (Figuras 4 y 5), ya que casi todos los miembros del grupo de suelos tuvieron la capacidad de formar “biofilm” (sólo 1 de 36 miembros de los grupos de *B. subtilis/licheniformis* y *B. pumilus*, y 3 de 34 de los miembros del clado de *B. cereus* no exhibieron esta característica). Sin embargo, menos de la mitad de los miembros del clado de *B. horikoshii* exhibieron esta habilidad.

Mientras llevamos a cabo las cinéticas de crecimiento para los diferentes aislados de *Bacillus* spp., observamos tres patrones diferentes de crecimiento. El patrón 1, los cultivos presentaron una curva de crecimiento bien definida (47% de los aislados); el patrón 2, estuvo caracterizado por una fase logarítmica bien definida, seguido por la agregación al final del crecimiento (resultando en lecturas fluctuantes durante la fase estacionaria, en 50% de los aislados); y el patrón 3 estuvo caracterizado por lecturas fluctuantes a través de las fases de crecimiento, y ocurrió en 3% de las cepas evaluadas (Figura 5). Estos patrones indican que hay diferencias en las estrategias de las diferentes cepas para crecer. Algunas se comportan como planctónicas (patrón 1), que no se agregan al final del crecimiento (aunque nuestra evaluación de la formación de bio-películas muestra que muchos tienen esta capacidad) y algunos para los cuales la agregación fue disparada inmediatamente al final del crecimiento exponencial (patrón 2).

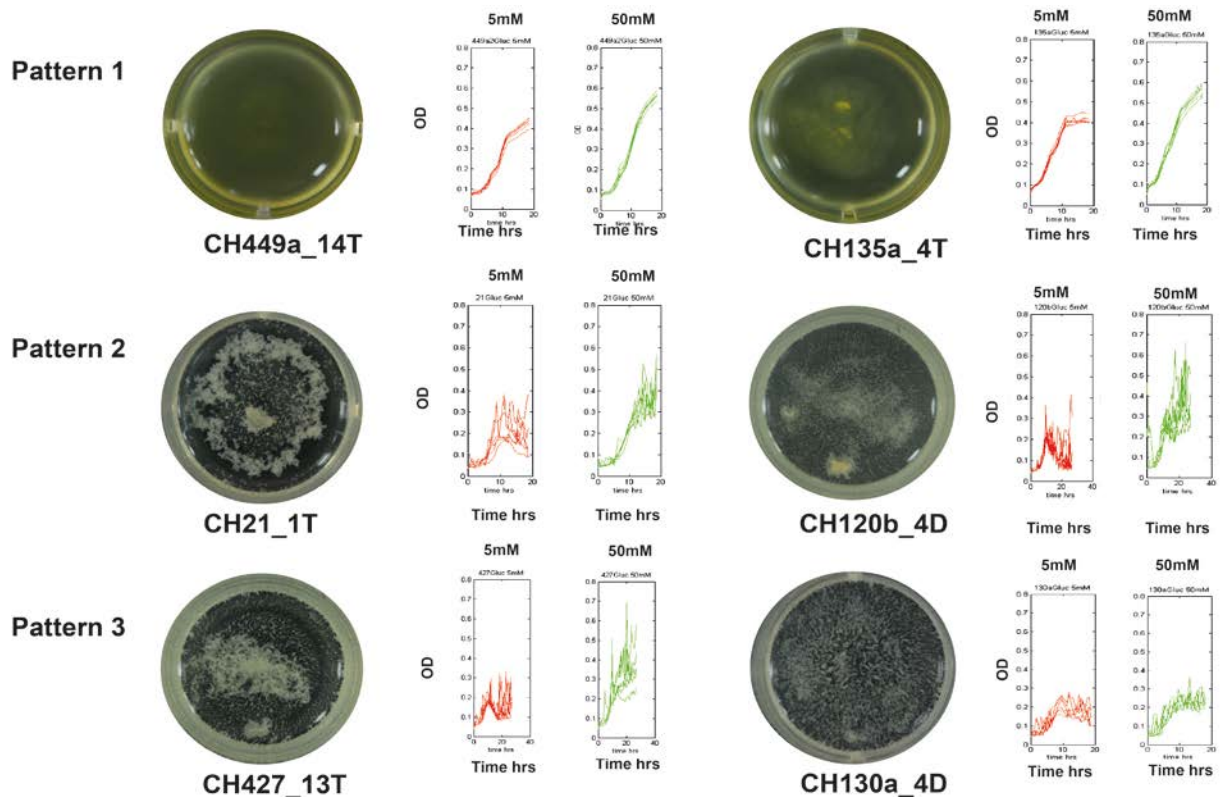


Figura 5. Patrones de crecimiento y su relación con la producción de “biofilm”. En la figura se muestra una representación gráfica de los tres patrones de las curvas de crecimiento típicas con dos concentraciones de glucosa. La curva roja describe el crecimiento con 5 mM de glucosa y la curva verde describe el crecimiento con 50 mM. También se muestran fotografías de algunas cepas al final de la cinética de crecimiento para cada patrón.

6.4 Una paradoja de extensas auxotrofías entre algunos clados de *Bacillus* spp.

La co-ocurrencia en una comunidad permite compartir los compuestos del metabolismo, pero esto no sería necesario si todos los miembros fueran autosuficientes. Evaluamos la auto-suficiencia metabólica, a través del análisis de las auxotrofías para los diferentes aminoácidos entre los miembros de *Bacillus* spp. de estas comunidades de sedimento.

Algunos miembros exhibieron una fuerte dependencia a la peptona o extracto de levadura para crecer, pero incluso exhibieron dependencia a la presencia de todos los 20 aminoácidos, y esto también fue calificado como rasgo auxotrófico (44 cepas requieren este suplemento) (Figura 4).

Estas cepas posiblemente obtengan sus aminoácidos en la forma de péptidos. Los *Bacillus* spp. acuáticos (*B. horikoshii*, *B. aquimaris*, and *B. marisflavi*) exhibieron una extensa dependencia a la adición de aminoácidos o peptona para crecer (Figura 4). Lo mismo fue para los miembros de los *B. cereus*, y en la cual la prototrofia fue raramente observada. Estos resultados son consistentes con la noción de que la pérdida de rasgos compensados ocurre en comunidades donde la disponibilidad de la fuente les permite la pérdida individual de rasgos, siempre que la comunidad pueda mantener la función. Por otra parte, los miembros de *Bacillus* spp. de suelo (*B. subtilis/licheniformis* y *B. pumilus*), raramente exhibieron auxotrofías. Es una paradoja que a pesar de formar parte de una comunidad, algunos grupos taxonómicos son dependientes de alguna fuente externa de aminoácidos y otros son auto-suficientes. En este sentido, el primer grupo podría ser considerado como especialista y el segundo como generalista.

6.5 Distribución de rasgos profundamente enraizados de los *Bacillus* spp. en comunidades de sedimento exhiben poca señal filogenética y en su lugar es consistente con un modelo Browniano.

El rasgo más profundamente enraizado es sin duda la esporulación, y el cual distingue a los *Bacillus* spp. Los aislados en este trabajo fueron obtenidos de muestras resistentes al tratamiento por calor, por lo que era de esperarse que todos

podieran ser capaces de esporular. Nosotros observamos una alta variabilidad en la frecuencia de esporulación (Figura 6). Adicionalmente, en medio MM todos los miembros del grupo del suelo fácilmente esporulan, mientras que ninguno de los *Bacillus* spp. acuáticos mostró este rasgo. Miembros de todos los grupos taxonómicos esporulan en medio DSM salvo pocas excepciones. Este resultado sugiere que la señal fisiológica que dispara la esporulación puede ser diferente entre los *Bacillus* spp. de suelo y los acuáticos. Esto es consistente con las diferencias en los genes de la señal de esporulación entre los grupos taxonómicos de *Bacillus* spp. previamente reportados (Alcaraz *et al.*, 2010).

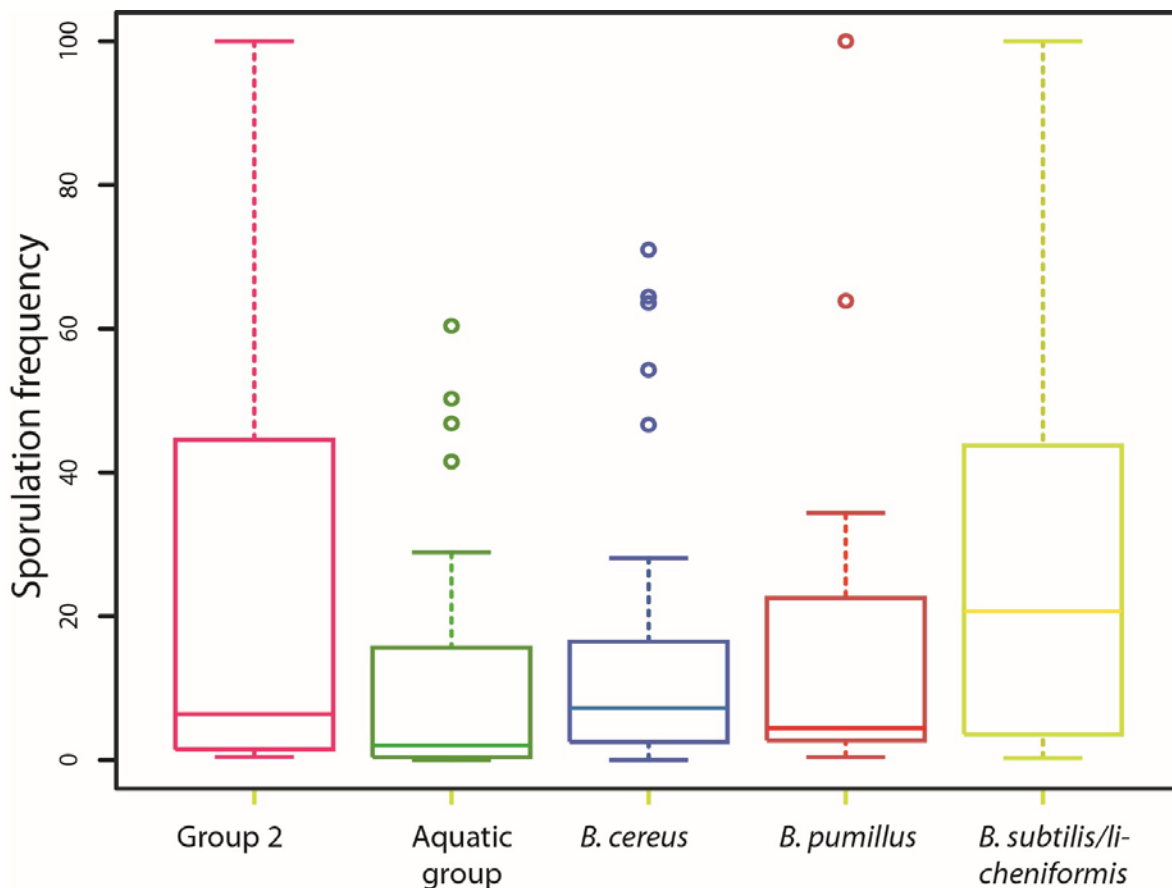


Figura 6. Análisis de varianza de la frecuencia de esporulación de los grupos taxonómicos de *Bacillus* spp.

El “swimming”, “swarming”, y la formación de “biofilm” son rasgos profundamente enraizados entre los firmicutes (Stoodley *et al.*, 2002; Daniels *et al.*, 2004). Estos rasgos son típicamente observados, y han sido caracterizados, en los grupos de los *B. subtilis* de suelo y los *B. cereus* patogénicos. Sin embargo, la distribución de la habilidad para la formación de “biofilm” a través de los grupos taxonómicos de *Bacillus* spp. de estas comunidades de sedimento exhibieron sólo un nivel moderado de señal filogenética ($D=0.511$), probablemente debido a la alta variabilidad de este rasgo en *B. marisflavi*, *B. aquimaris*, y *B. horikoshii*. El valor D obtenido para el “swimming” reveló que el este rasgo filogenético está agrupado ($D=0.90$), es decir, encontrado más a menudo de lo esperado por el azar, lo que era de esperarse para un rasgo profundamente enraizado. Sin embargo, para swarming y prototrofia, obtuvimos valores de D de 0.21 y 0.28, respectivamente. El valor estadístico de D indica que estos rasgos son significativamente no aleatorios ($p_{\text{rand}}=0$) para “swarming”, “biofilm”, y prototrofia, pero el estadístico de D indica que este patrón sugiere un modelo Browniano (prototrofia: $p_{\text{brown}}=0.106$, “swarming”: $p_{\text{brown}}=0.181$, y “biofilm” $p_{\text{brown}}=0.017$). Esta variabilidad de los rasgos profundamente enraizados de los *Bacillus* spp. puede ser explicado por la pérdida o la diferencia en la regulación de la expresión de genes involucrados en estas vías en miembros de los *Bacillus* spp. que co-ocurren en comunidades microbianas. Cualquiera que sea el caso, parece que los rasgos de acción colectiva se mantienen a nivel de la comunidad, lo que sugiere que la evolución se produce en un nivel de selección mayor.

6.6 Morfología de la colonia y pigmentación son rasgos altamente conservados, rasgos de clado específico.

Observamos que la morfología de la colonia, el tamaño, y la pigmentación son rasgos altamente conservados que actualmente distinguen a algunos clados (Figura 7). La apariencia de la colonia es un buen indicador de los miembros filogenéticos de una especie. El color de la colonia puede exhibir diferencias en la intensidad y puede cambiar con la etapa de crecimiento, y medio, pero es generalmente consistente para los miembros del mismo clado. La morfología de la colonia probablemente implica el mayor número de genes en un proceso celular diferencialmente y espacialmente expresados para formar una comunidad altamente organizada y estructurada. El hecho de que su herencia sugiere que no es neutro pero existe presión para mantener este patrón de desarrollo. Probablemente las micro-colonias son la forma que prevalece en el sedimento, pero las macro-colonias que observamos en las placas pueden re-crear algunas de sus características.

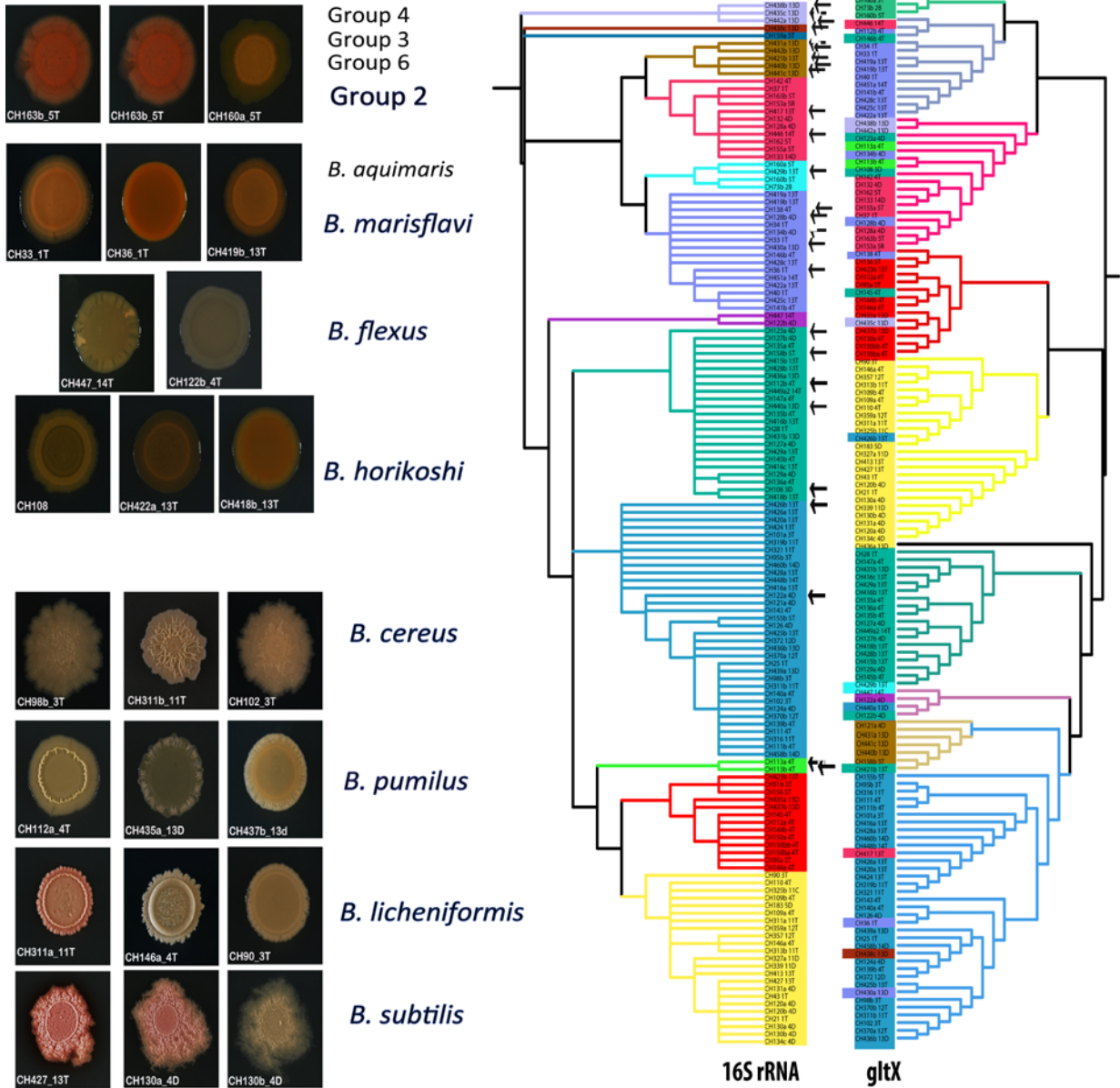


Figura 7. Comparación del análisis filogenético entre los genes 16S rRNA y *gltX*, y su asociación con la morfología. Los rectángulos coloreados indican las cepas que se han movido del grupo filogenético del árbol realizado con el gen 16S rRNA gen con respecto al gen *gltX*. En la figura del lado izquierdo se muestran las fotografías indicando la pigmentación de las cepas asociadas a la relación filogenética entre los grupos de *Bacillus* spp.

6.7 Sobredispersión en las preferencias por la utilización de fuentes de fósforo entre los linajes de *Bacillus* spp.

El fósforo es uno de los elementos más importantes para todas las formas de vida, ya que es una de las piedras angulares para la síntesis de biomoléculas, como el ATP, ADP y RNA (Huang *et al.*, 2005). Como se mencionó anteriormente, CCB es descrito como un ambiente oligotrófico por sus bajas concentraciones de fósforo. Es por ello que decidimos analizar las fuentes de fósforo que utilizan las cepas de *Bacillus*. De manera general, los resultados mostraron que en su mayoría los *Bacillus* de los diferentes grupos crecen sin problema cuando al medio se le adiciona el fosfato de potasio y el ADN, como fuentes de fósforo, seguido del fosfato de calcio y el fosfito, y en menor medida en el medio adicionado 2-phosphonoacetaldehido y el ácido 2-aminoetil fosfónico. En la figura 8 se distingue además la dispersión de la adquisición de fósforo a partir de las diferentes fuentes tanto entre los grupos taxonómicos como dentro de éstos, lo que sugiere que para lograr el mantenimiento de ésta diversidad filogenética, la estrategia de partición del nicho esté presente.

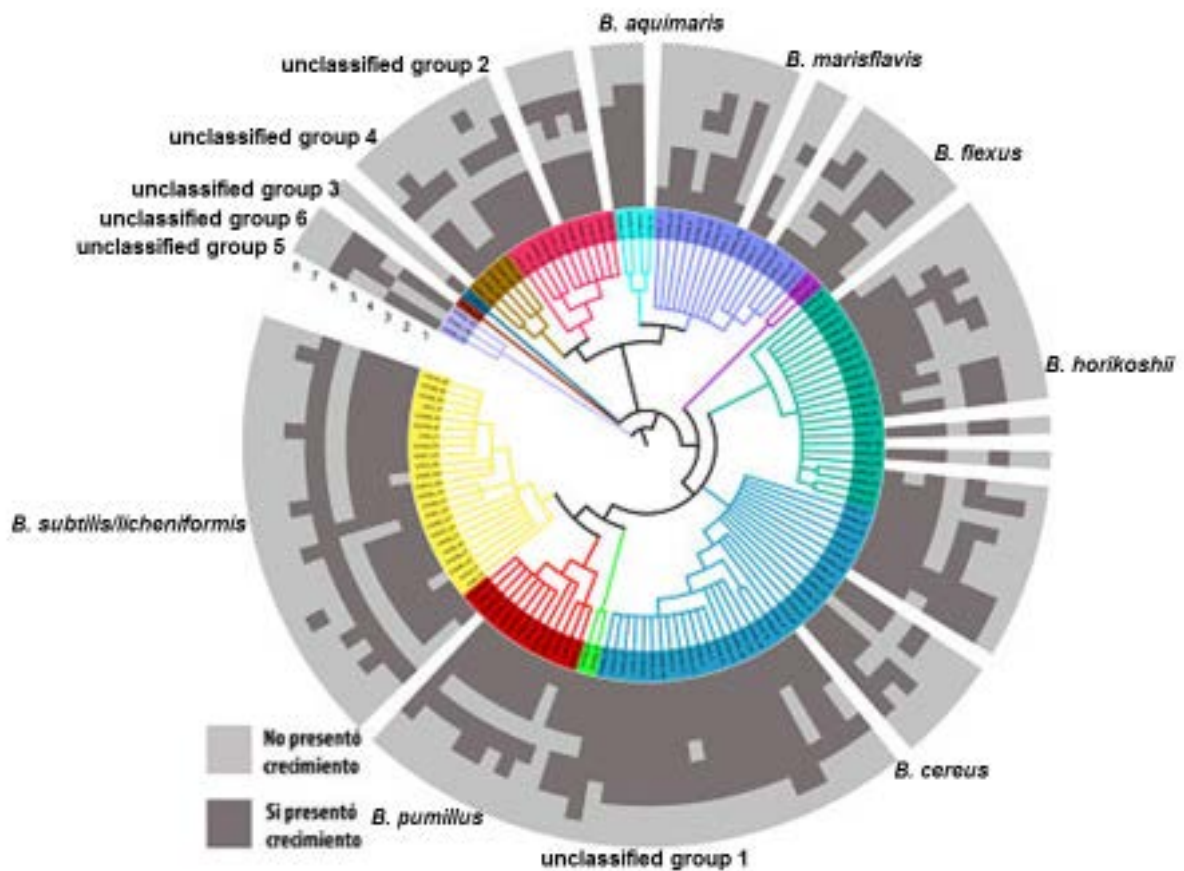


Figura 8. Crecimiento de cepas de *Bacillus* spp. en las diferentes fuentes de fósforo. 1. MM, 2. Fosfato de Potasio, 3. DNA, 4. Ácido 2-aminoetil fosfónico, 5. Fosfato de calcio, 6. Fosfito, 7. 2-fosfonoacetaldehido, 8. DM (sin la adición de fósforo). Los cuadros con color gris oscuro indican que las cepas si presentaron crecimiento y los de color gris claro las cepas no presentaron crecimiento. Los espacios en blanco muestran las cepas que no mantuvieron el crecimiento en el cultivo sin la adición de fósforo.

6.8 Imágenes de obtenidas con el microscopio electrónico de transmisión de cepas de *Bacillus* spp.

Ocho cepas de *Bacillus* spp. aisladas del sedimento del Sistema Acuático Churince y 4 cepas tipo (*B. marisflavi*, *B. aquimaris*, *B. horikoshii*, y *B. vietnamensis*) fueron analizadas con un microscopio electrónico de transmisión (TEM: (Transmission

electron microscopy) para conocer su tamaño. En la tabla 1 muestra los promedios de las longitudes y el grosor de las cepas seleccionadas para el análisis. El grosor de las células va de 512.41 nm a 641.35 nm, y de largo los tamaños van de 1411.46 nm a 2092.86 nm. Dentro de las células con mayor longitud fueron a *B. horikoshii*, *B. aquimaris*, CH429a_13T, CH112b_4T, CH155a_5T, mientras que CH139_4T, CH144a_4T y CH429b_13T fueron las de menor tamaño (Figura 6). CH144a_4T está dentro del grupo de *B. pumilus* y las demás cepas están relacionadas al grupo de las acuáticas.

Tabla 1. Tamaño promedio de las células de *Bacillus spp.* tomadas con TEM

	Grosor de la célula (nm)	Longitud de la célula (nm)
CH144a_4T	512.41	1411.46
m3-13	523.35	1506.48
<i>B. marisflavi</i>	537.04	1586.60
CH418b_13T	553.89	1594.62
CH429b_13T	584.82	1610.15
CH138_4T	593.50	1648.59
<i>B. aquimaris</i>	601.57	1784.32
<i>B. horikoshii</i>	611.78	1902.13
CH429a_13T	612.09	1963.65
CH112b_4T	620.82	1966.13
CH155a_5T	623.12	2070.83
<i>B. vietnamensis</i>	641.35	2092.86

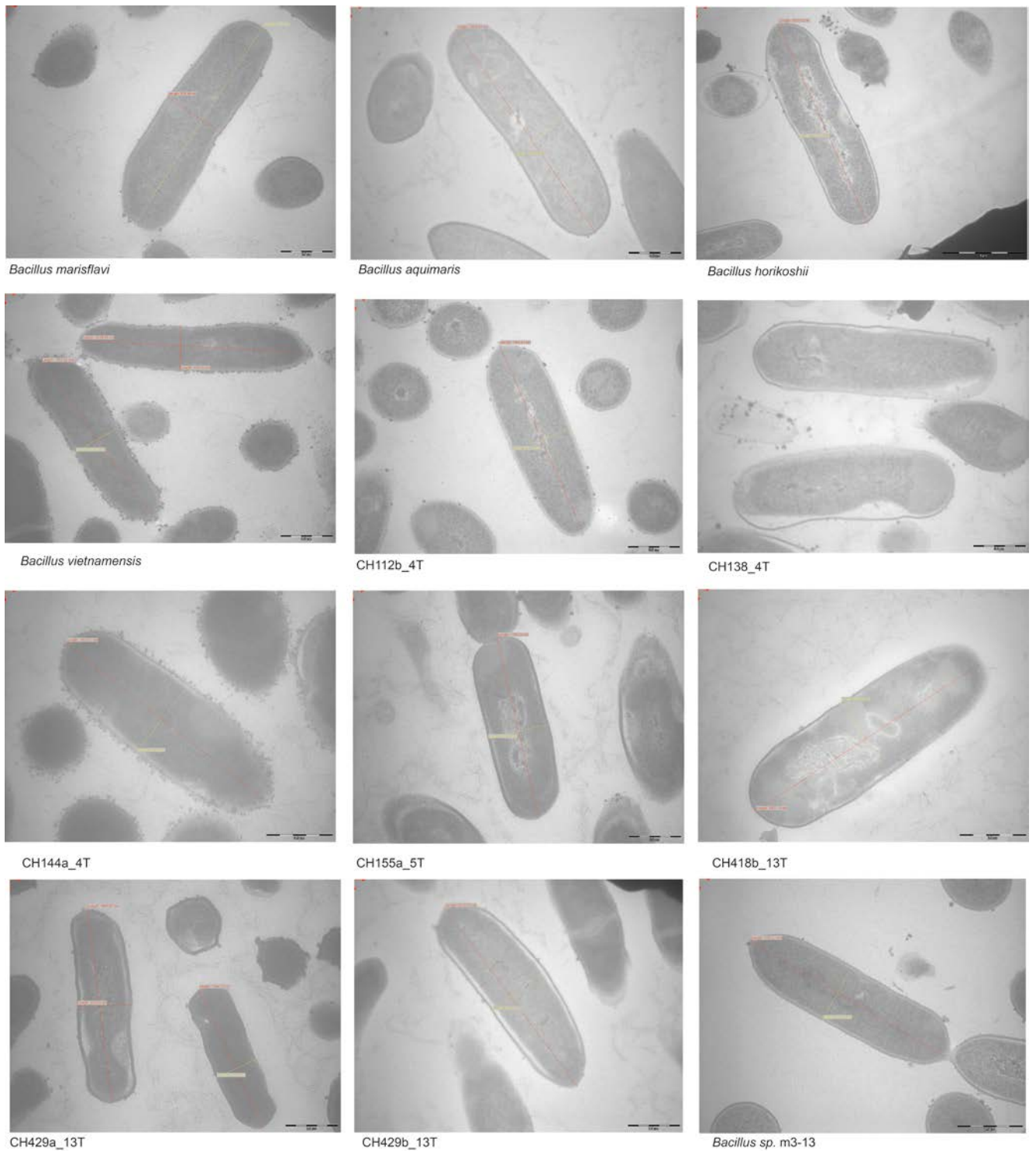


Figura 9. Imágenes de TEM de las cepas de *Bacillus* spp.

Una característica que nos llamó la atención, fue el grosor y la apariencia de la pared

celular, ya que algunas cepas mostraron una pared celular gruesa además de que pareciera tener doble pared (Figura 10A). En las fotografías es también muy notoria la formación de pequeños gránulos rodeando la pared celular, específicamente para las cepas de *B. vietnamensis* y *B. marisflavi*, la cual se podría tratar de exopolisacáridos que constituyen el glicocáliz que le confieren a la célula la capacidad de adherirse a superficies, la formación de microcolonias y la formación de “biofilm” (Mayberry-Carson *et al.*, 1984).

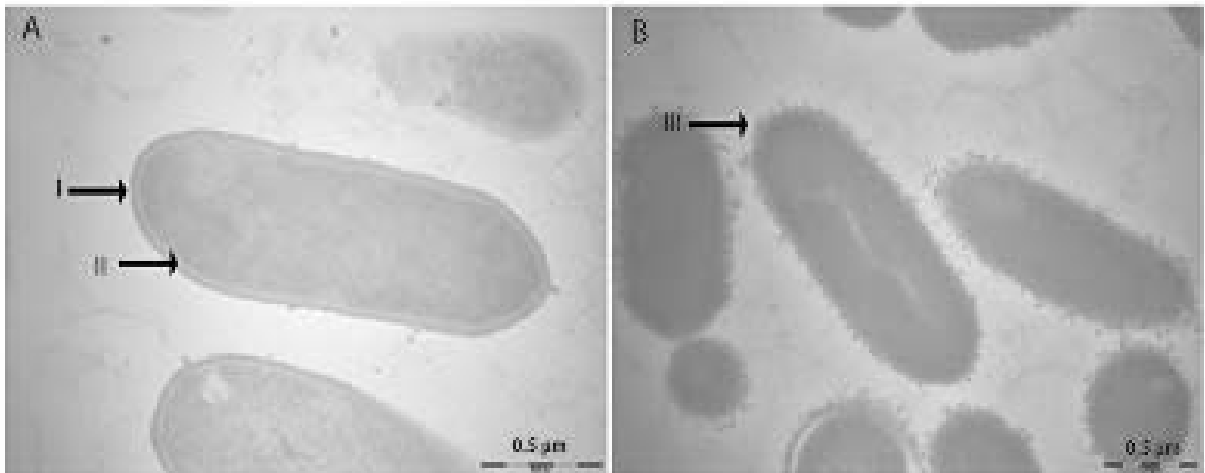


Figura 10. Imágenes TEM de *B. horikoshii* (A) y *B. vietnamensis* (B). I. Pared celular, II. Membrana plasmática, y III. Formación de gránulos en la pared celular.

6.9 Clasificación de *Bacillus* por Maldi-Tof y análisis filogenético con los genes 16S rRNA y *gltX*

Treinta y dos cepas se usaron para el análisis de proteínas ribosomales por MALDI-TOF. El agrupamiento obtenido con los espectros obtenidos del perfil de masas de las 32 cepas de *Bacillus* spp. fue similar al árbol filogenético obtenido con las secuencias del gen 16S de rRNA. Con este análisis se logró diferenciar claramente

los *Bacillus* relacionados a ambientes marinos, y los *Bacillus* spp. relacionados a *licheniformis/subtilis* y *pumilus* pero además se observó una diferenciación entre *B. cereus* y *B. thuringiensis* (Figura 11-15), aunque cabe señalar que de acuerdo al análisis filogenético realizado con el gen 16S de rRNA el grupo de *B. cereus* (como se agrupa con MALDI-TOF) se encuentra distribuido dentro del grupo de las acuáticas. El grupo de *B. cereus* y *B. thuringiensis* contiene a las cepas CH111_4T, CH425b_13T, CH458b_14D, CH372_12D, CH126_4D, CH138_4T, CH155a_5T, CH425c_13T y CH34_1T. Para el grupo de *B. licheniformis/subtilis* las cepas son: CH183_5D, CH426b_13T, CH130b_4D, CH21_1T, CH109a_4T, CH90_3T. En el caso de *B. pumilus* se agruparon las cepas: CH95a_3T, CH112a_4T, CH144a_4T, CH156_5T, y CH435a_13D. Finalmente *B. aquimaris*, *B. horikoshii*, CH418b_13T, CH112b_4T, m3-13 y CH429a_13T se agrupan con los *Bacillus* relacionados a ambientes acuáticos.

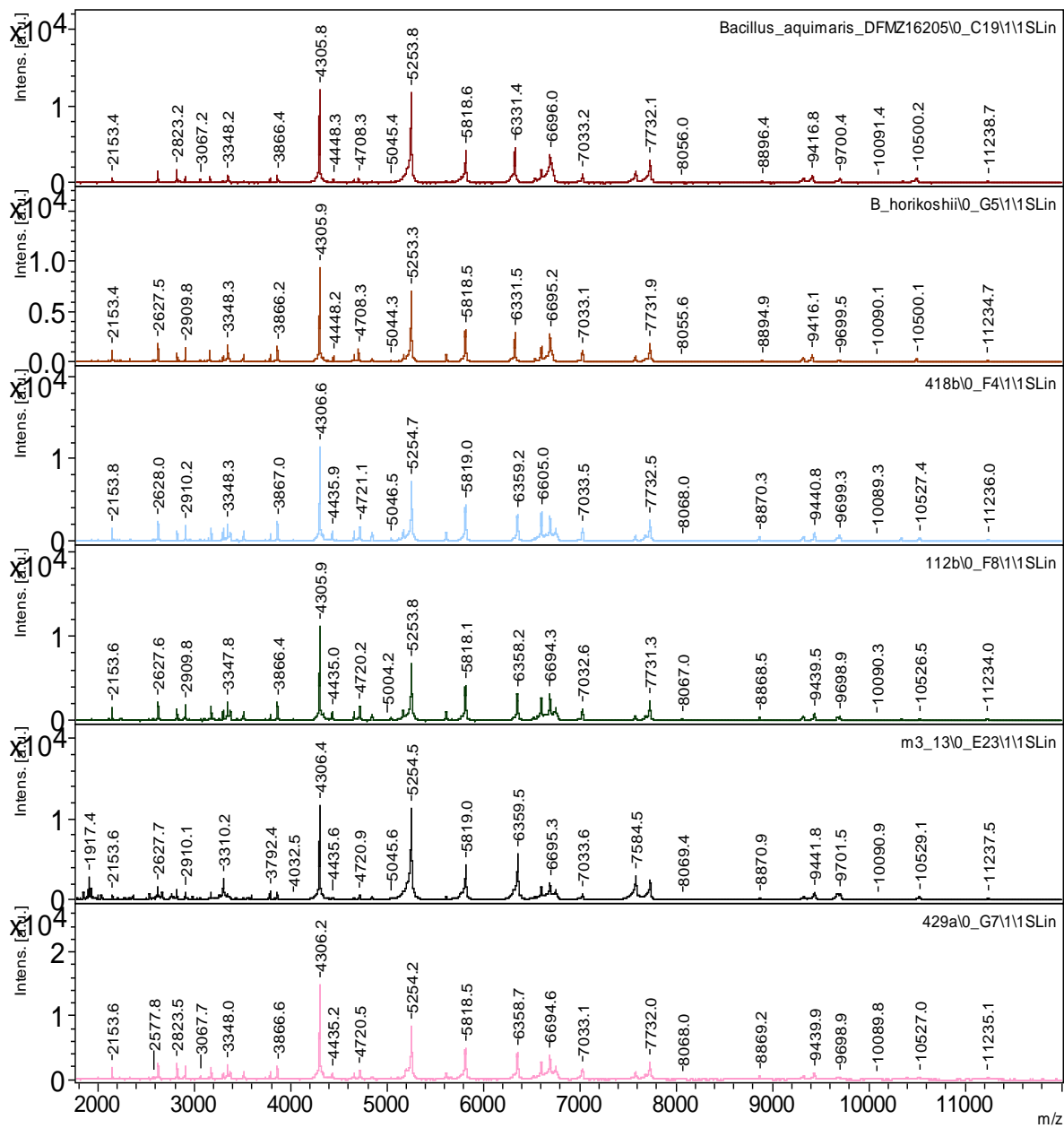


Figura 11. Análisis de MALDI-TOF de cepas de *Bacillus* spp. relacionadas a ambientes acuáticos. En la figura se muestran los espectros de las cepas: *B. aquimaris*, *B. horikoshii*, 418b_13T, 112b_4T, m3_13, y 429a_13T.

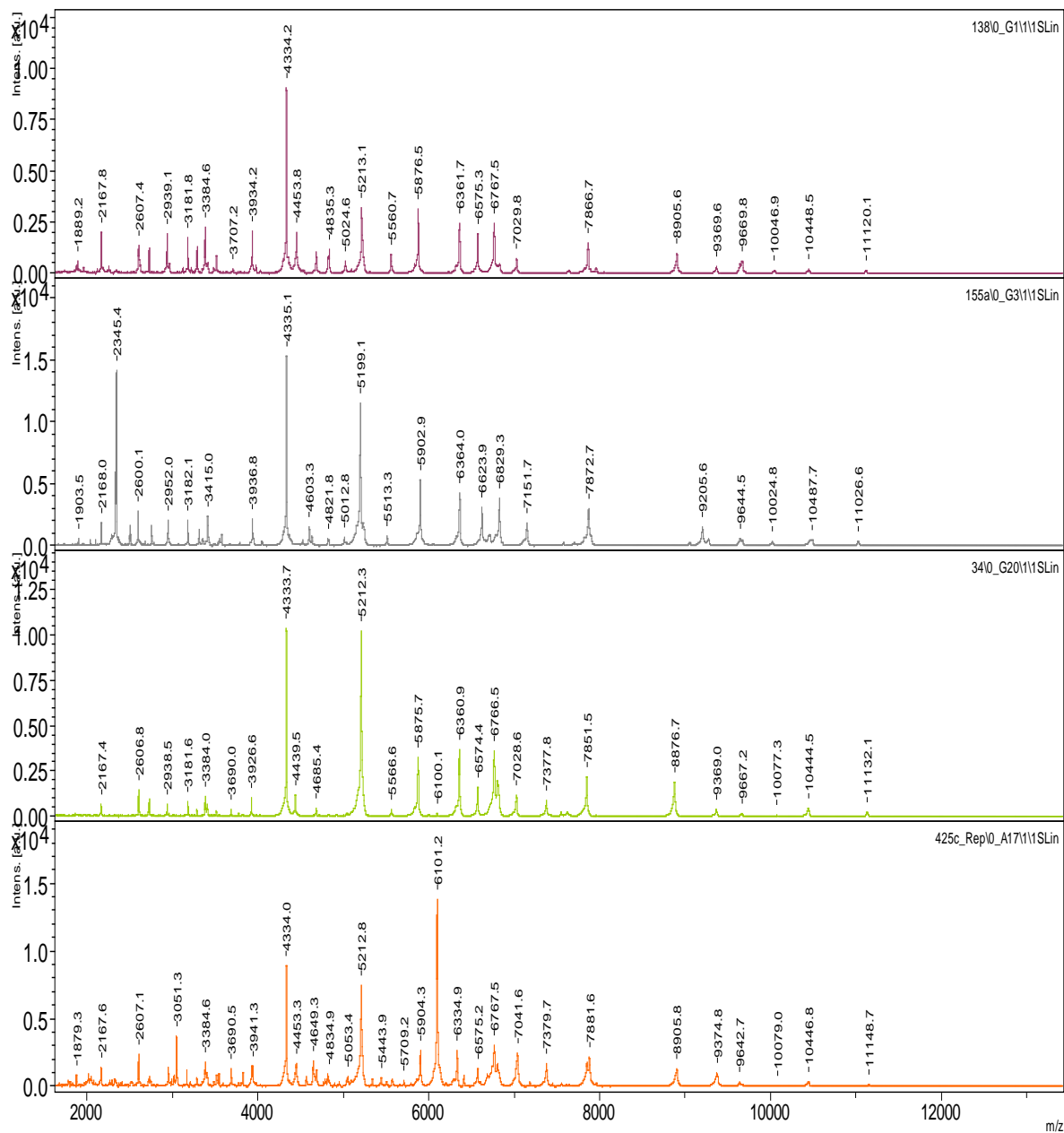


Figura 12. Análisis de MALDI-TOF de cepas de relacionadas a *B. cereus*. En la figura se muestran los espectros de las cepas: CH138_4T, CH155a_5T, CH34_1T, CH425c_13T.

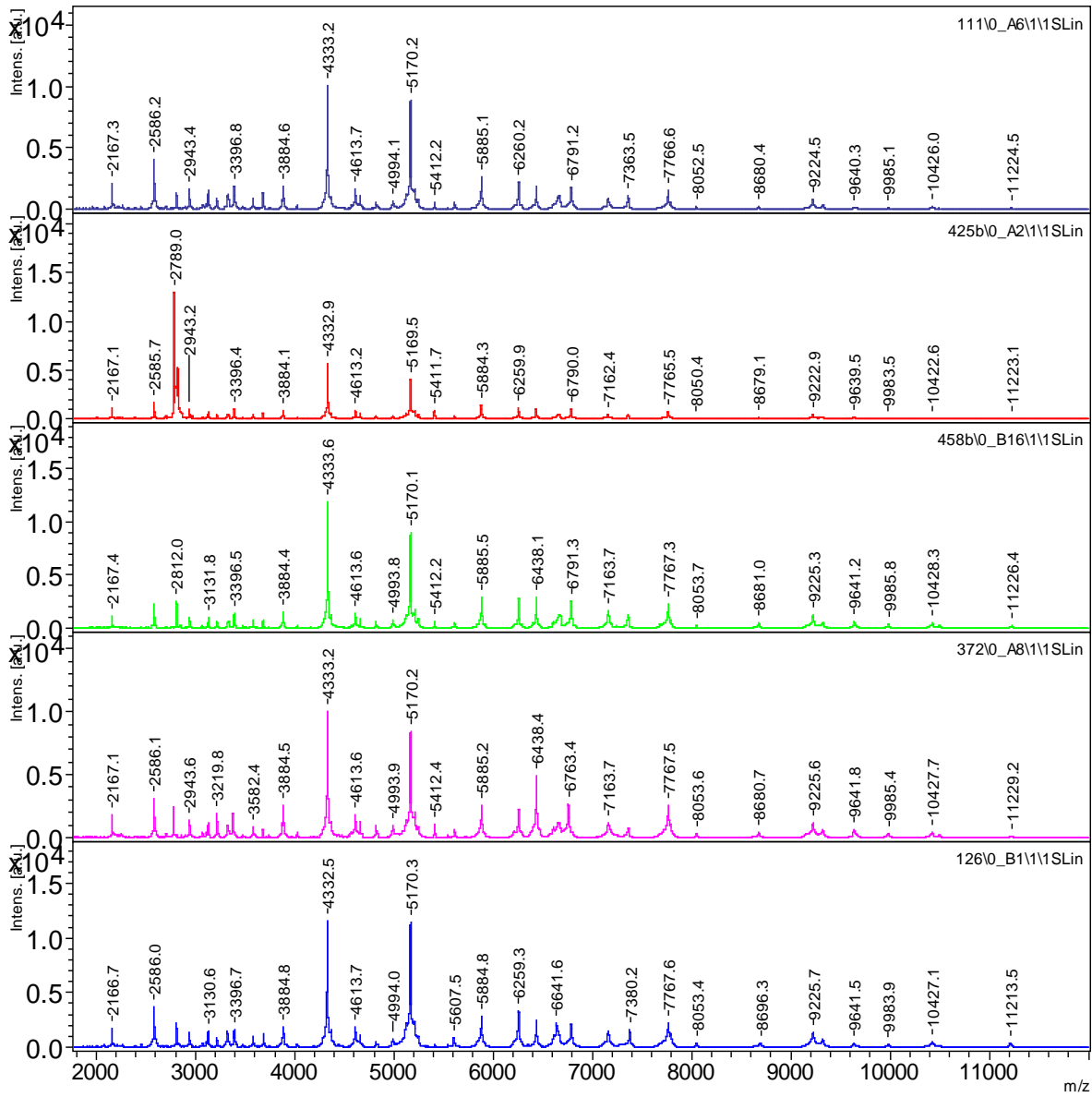


Figura 13. Espectros del grupo relacionado a *B. thuringiensis*, el cual está integrado por las cepas CH111_4T, CH425b_13T, CH458b_14D, CH372_12D y CH126_4D.

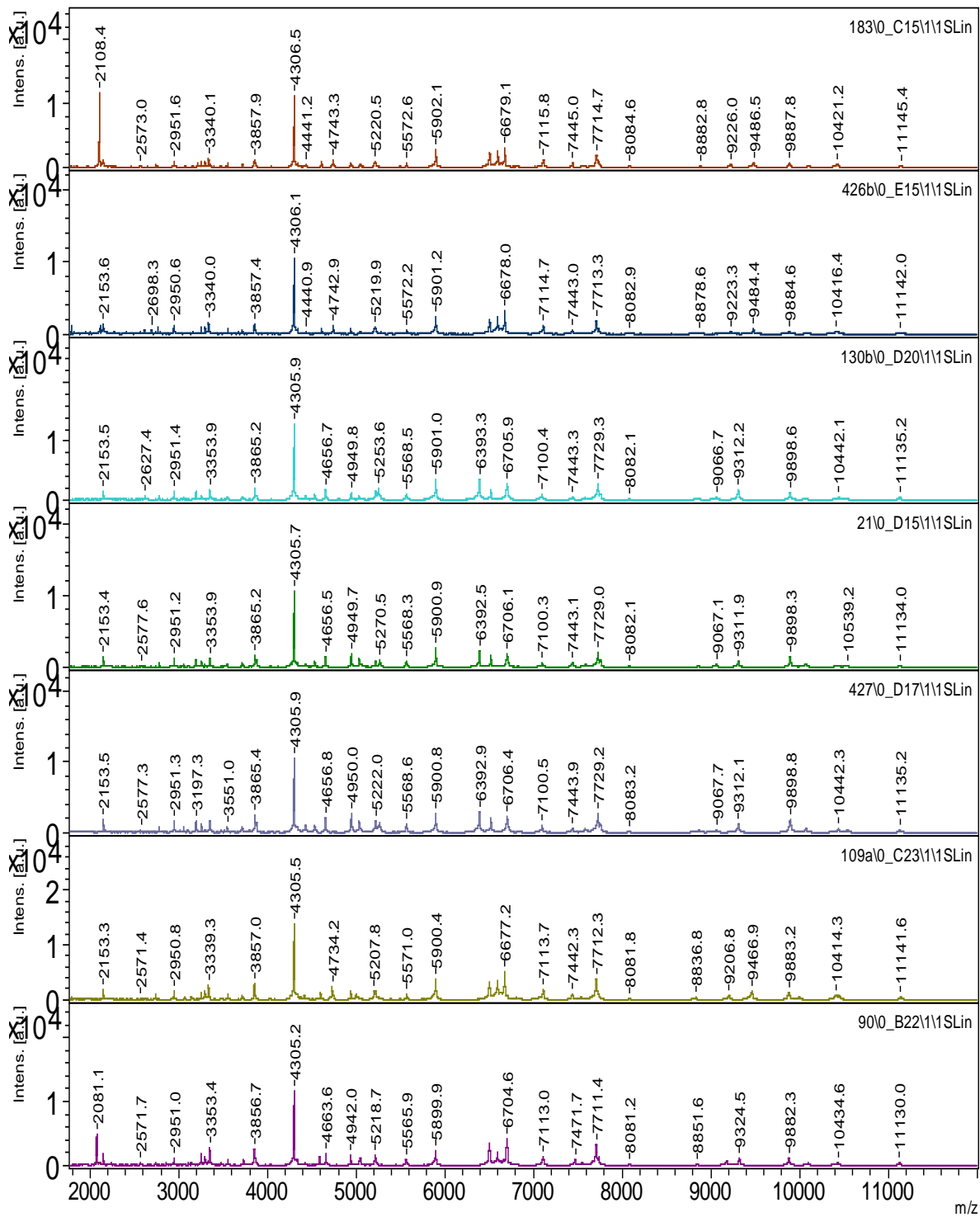


Figura 14. Análisis de MALDI-TOF de cepas de relacionadas a *B. subtilis*. En la figura se muestran los espectros de las cepas: CH183_5D, CH426b_13T, CH130b_4D, CH21_1T, CH427_, CH109a_4T, CH90_3T.

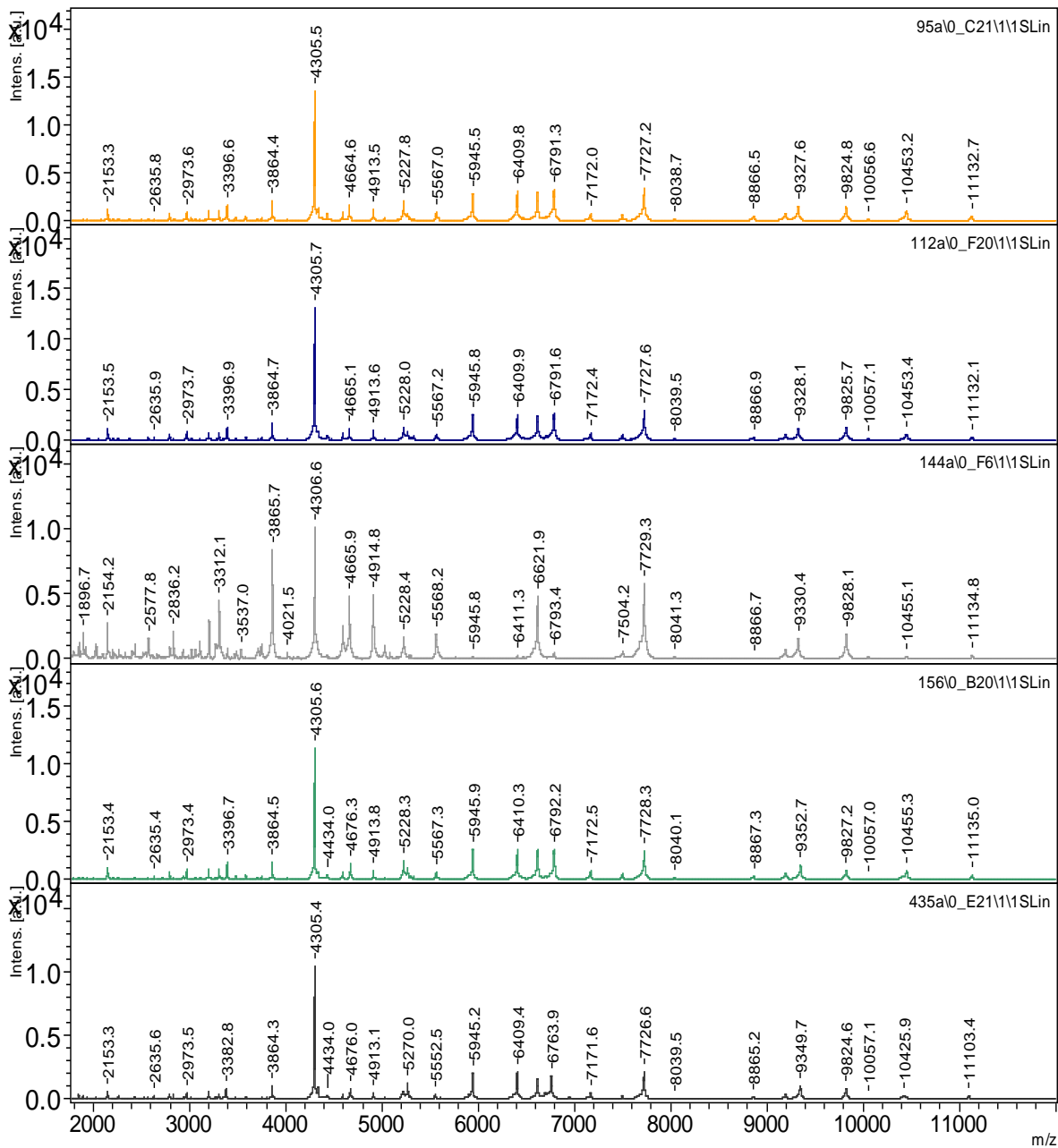


Figura 15. Análisis de MALDI-TOF de cepas de relacionadas a *B. pumilus*. En la figura se muestran los espectros de las cepas: CH95a_3T, CH112a_4T, CH144a_4T, CH156_5T, CH435a_13D.

El análisis de acuerdo a los espectros de masas fue comparado con una base de datos que contiene espectros de cepas bacterianas de referencia. Así se realizó la comparación principalmente las masas de las proteínas ribosomales: L32, L34, L36,

L30, L28, S14, L35, L29, S18, S20, S16, S19 y L24. El análisis reveló dos grupos distintos como son: *B. cereus* y *B. thuringiensis*, en cuyo caso con el análisis filogenético con el gen 16S rRNA no se logra una diferenciación con las cepas que los integran. En cuanto las cepas que están estrechamente relacionados con *B. subtilis* y *B. licheniformis*, al contrario de los grupos antes mencionados no se diferencian. El grupo de *B. pumilus* se mantiene su agrupamiento al conjuntar las señales de sus espectros en comparación con el la filogenia obtenida con el gen 16S rRNA. Otro de los grupos que es muy variable es el formado por las cepas que se relacionan con *Bacillus* de ambientes acuáticos, ya que aunque se mantienen en un mismo clado, su cercanía de una y de otra cambia con las dos herramientas utilizadas.

Finalmente, la filogenia con el gen 16S rRNA fue más coherentes con los fenotipos de los miembros de los clados. Nosotros tratamos de adicionar un gen más, el gen *gltX* para aumentar la resolución, pero muchos de los grupos formados con el gen 16S rRNA se perdieron. *B. subtilis/licheniformis* y *B. pumilus* fueron más robustos, y muchos de los miembros de *B. cereus* permanecieron como grupo, pero varios de los grupos acuáticos se dispersaron en otros grupos (Figura 7). Estos datos sugieren que la transferencia de genes está ocurriendo en la filogenia a todos los niveles, incluso en los que son considerados como genes núcleo.

7. DISCUSIÓN

Los microorganismos conforman comunidades integradas por una gran diversidad de especies y las cuales están organizadas a través de redes cooperativas de intercambio metabólico, con el objetivo de construir estrategias para lograr sobrevivir en su nicho (Oliveira *et al.*, 2014; Ponomarova y Patil, 2015). El mantenimiento de estas interacciones cooperativas se lleva a cabo a través de los comportamientos como la selección de parentesco y la selección a nivel de grupo, en el primero, los organismos más claramente relacionados son favorecidos por los rasgos altruistas de un individuo (Hamilton, 1964), mientras que la selección a nivel de grupo se propone que aunque no estén filogenéticamente relacionados, todos los microorganismos que integran un grupo se verán favorecidos de los rasgos altruistas producidos por un individuo (Wilson, 1975). Diversos trabajos reportan el comportamiento social del género *Bacillus*, a través de la formación de “biofilm”, de “quorum sensing”, de la solubilización de fósforo, el “swarming”, o la producción antibióticos y su interacción con miembros de su comunidad (Stein, 2005; Swain *et al.*, 2012; Velicer and Yu, 2003). En suelos áridos, se tienen reportes que aproximadamente más del 50% de las bacterias son formadoras de esporas, por lo que en su mayoría los *Bacillus* conforman las comunidades microbianas en estos sitios (Skujinš, 1984), sin embargo, este género es considerado uno de los grupos menos abundantes en el desierto de Coahuila, con sólo un 2.4% (López-Lozano *et al.*, 2012), por lo que conocer que rasgos de acción colectiva conservan o han perdido, puede ser relevante para conocer el rol de esta especie dentro de la comunidad y por lo tanto para coexistir.

En este trabajo estudiamos la variabilidad de rasgos individuales de miembros de un grupo de *Bacillus* spp., de una comunidad de sedimento y agua, que comprende diferentes grupos taxonómicos dentro de un género. Hemos descubierto que existe una amplia variabilidad de rasgos, aun de aquéllos que están profundamente enraizados en la filogenia, pero también en los superficiales, lo que sugiere la pérdida de rasgos condicionales. Nuestros datos nos llevan a cuestionar también si la evolución está actuando a nivel individual o a nivel de la comunidad.

La colección de *Bacillus* spp. de este estudio es un excelente modelo para explorar la variabilidad, porque su ensamblaje en la comunidad del sedimento depende más de las interacciones ecológicas que de los factores abióticos. Nuestros datos también muestran el agrupamiento filogenético de las muestras del sedimento, en contraste con la columna de agua. Una observación similar fue hecha por Rebolgar y col., (2012) con muestras de exiguobacterias de diferentes pozas de CCB y en las que se asociaron en grupos ecológicamente diferenciados asociados con ambientes de sedimento o ambientes de agua. Estos resultados son también consistentes con los de Burke y col. (2012) que mostraron que las comunidades asociadas a *Ulva australis*, un alga que se encuentra en pozas de marea, fueron diferentes a las encontradas en el agua de mar. Los *Bacillus* spp. de esta colección no exhibieron variabilidad taxonómica asociada a los sitios de muestreo.

La misma especie estuvo representada en todos los diferentes sitios de sedimento muestreado, sólo 10 de 77 OTUs fueron compartidos entre columna de agua y sedimento. Esto sugirió que el agua no es el hábitat para los *Bacillus* y que los taxones recuperados de la columna de agua están usualmente representados en el sedimento, sugiriendo que los *Bacillus* de agua son parte de un “pool” en

movimiento que están presentes en todos los sitios del sedimento. El hecho de que el sedimento parezca ser el hábitat para los *Bacillus*, podría implicar una preferencia por las comunidades espacialmente estructuradas con un vecindario predecible. Esto no sería peculiar, ya que se sugiere que los “biofilms” representan el estado dominante de las bacterias en la naturaleza. Los “biofilms” son estructuras extremadamente complejas y, en lo particular el caso de *Bacillus subtilis*, hasta cinco tipos de células se ha mostrado que contribuyen a su organización espacial y funcional: motilidad, esporulación, y producción de diferentes moléculas matriz, surfactantes y proteasas (Vlamakis *et al.*, 2013).

7.1 ¿Qué tanta variabilidad filogenética hay entre los aislados individuales a nivel superficial y profundo?

Se ha mostrado en bacterias que muchos rasgos funcionales están filogenéticamente dispersos (Martiny *et al.*, 2013), y éste es el caso para nuestra muestra de bacterias de sedimento y agua del Churince. Observamos variabilidad en la utilización de cinco diferentes sustratos de carbono dentro y entre los grupos taxonómicos. Esta diferenciación en la habilidad para usar diferentes sustratos era esperada y explica por qué numerosas bacterias pueden co-ocurrir en una comunidad. La utilización de sustratos depende sólo de pocos genes y son por lo tanto fácilmente transferidos (Martiny *et al.*, 2013). Consistentemente, hemos observado una gran variabilidad en rasgos para la utilización de diferentes fuentes de fósforo en una gran muestra de *Bacillus* spp. dentro de CCB (Tapia-Torres *et al.*, 2016).

Un hallazgo inesperado fue la gran variación en los considerados rasgos de acción

colectiva y que además están profundamente enraizados en la filogenia de los *Bacillus*. La motilidad “swimming” depende de flagelos de células individuales (movimiento no organizado) que se mueven independientemente al recibir señales químicas (Calvio *et al.*, 2005). Por otra parte, el “swarming” es un comportamiento multicelular que permite el rápido movimiento de células bacterianas diferenciadas (Kearns, 2010), y depende no sólo de la síntesis de flagelos, sino también en la secreción de surfactantes (Cosmina *et al.*, 1993; Kearns y Losick, 2003). La habilidad “swarming”, además de la formación de biofilm sólo tiene beneficio a nivel de grupo, y depende de la expresión coordinada de genes y señales (Stoodley *et al.*, 2002; Daniels *et al.*, 2004), el mantenimiento o pérdida de estos genes de bienes públicos sería de esperar que evolucionen a nivel de la comunidad. De los 141 aislados evaluados, el “swimming” fue el rasgo más conservado (exhibido por el 87% de las cepas), seguido por la producción de “biofilm” (71%). Pero sólo el 34% de las cepas exhibieron movimiento “swarming”. Sorprendentemente, solo el 41.8% de los aislados fueron protótrofos, sugiriendo que más de la mitad de las cepas estudiadas necesitan interactuar con el resto de la comunidad para sus necesidades de alimentación básicas. A pesar de que las frecuencias entre clados son diferentes (y esto también es notable), todos los clados incluyen miembros que poseen un resultado positivo para el rasgo evaluado, sugiriendo que las especies pueden manifestar la función dentro de las condiciones usadas. Una excepción notable para el “swarming”, cuya ausencia prevaleció en todos los miembros evaluados del clado de *B. horikoshii*.

Algunos ejemplos de variabilidad en el rasgo para la formación de “biofilm” han sido reportados. Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Burkholderia cepacia* que

fueron aisladas de pulmones de pacientes con fibrosis quística (Govan y Deretick, 1996), y de aislados de laboratorio y silvestres de *Vibrio cholerae* (Hammer y Bassler, 2003) varían en la habilidad de formación de “biofilm”. Nadell y Bassler, (2011) mostraron que las células que producen exopolisacáridos selectivamente benefician a sus compañeros clones, en comparación con la cepa isogénica deficiente de la producción de exopolisacáridos, aunque poseen deficiencia en su habilidad para dispersarse a nuevos lugares, un costo ecológico que rebasaría los requerimientos energéticos para la producción de exopolisacáridos. En este caso, parece haber una interacción entre las capacidades de motilidad y de adhesión.

El tamaño celular de estos *Bacillus* también fue un rasgo que llamó la atención, ya que la longitud y grosor independientemente del grupo al que pertenecen fue relativamente menor que los reportados anteriormente (*B. subtilis* 4-10 μm de largo por 0.25–1.0 μm de diámetro; *B. thuringiensis* 5 μm de largo por 1 μm de ancho y *B. cereus* 3-4 μm de largo) (Yu *et al.*, 2014; Sakai *et al.*, 2007; Vilain *et al.*, 2006). El tamaño celular tiene importantes efectos en los atributos fisiológicos de las bacterias como la eficiencia en la adquisición o competencia por nutrientes, escapar de los depredadores, la dispersión pasiva, la tasa de crecimiento, etc., y en sus interacciones con el ambiente, ya que depende de las circunstancias que las células necesitan en el ambiente en el que viven (Young, 2006; Young, 2007).

Existen por lo menos dos explicaciones por las que podrían haber sido perdidos los rasgos: la primera, la pérdida real debido a lo prescindible de los rasgos, y la segunda, la pérdida compensada de rasgos, debido a la disponibilidad como bienes públicos. En la primera explicación, algunos rasgos pueden ser perdidos por la deriva génica y mutación debido a que la selección natural no los mantiene. Por

ejemplo, dentro de condiciones de saturación de agua en el sedimento, el movimiento “swimming” puede ser suficiente para muchas células y el “swarming” puede ser dispensable. Sin embargo, esto puede ser también explicado por la pérdida compensada de rasgos, como la síntesis de surfactantes por otras bacterias de la comunidad. La complementación por bacterias productoras de surfactantes a bacterias defectuosas en “swarming” ha sido descrita (Kearns y Losick, 2003). La pérdida compensada de rasgos (Visser *et al.*, 2010) es promovida por la distribución en la comunidad. Ellers y col., 2012 proporcionaron una herramienta útil para distinguir entre diferentes términos para describir la dinámica evolutiva entre organismos que interactúan. Para la “hipótesis de la reina negra” (Morris *et al.*, 2012), se sugiere que la pérdida de genes es adaptativa en ambientes oligotróficos ya que las funciones esenciales son compartidas. Aunque nosotros observamos pérdida de diferentes fenotipos, el análisis de la adecuación utilizando cepas no isogénicas complica evaluar esta hipótesis. De igual forma, no observamos una mejor tasa de crecimiento asociada a la pérdida de rasgos fenotípicos que pudieran sugerir una ventaja (trade-off). La pérdida compensada de rasgos a través de la interacción de especies ha sido observada en la pérdida de la habilidad lipogénica del hongo parásito *Malassezia globosa* que se alimenta de los lípidos de la piel del hospedero (Xu *et al.*, 2007). Otro ejemplo es la pérdida de la biosíntesis de arginina en dos géneros de hormigas cortadoras de hojas (Suen *et al.*, 2011; Nygaard *et al.*, 2011). Finalmente, existe la posibilidad de que algunos rasgos no se pierdan sino que su expresión dependa de las interacciones específicas o de los metabolitos producidos en la comunidad, es decir, se mantienen los genes pero se regula la expresión.

7.2 ¿La evolución trabaja a nivel individual o a nivel de la comunidad?

Parece que existen dos niveles en los cuales la evolución trabaja, una es en las puntas del árbol en una filogenia y la cual es cepa específica. Esta puede implicar regulación, mutación o intercambio de pequeños grupos de genes que proveen un rápido medio para adquirir nuevas habilidades en la utilización de los sustratos disponibles en la comunidad (los azúcares son un ejemplo). Sin embargo, a nivel de la comunidad, estos rasgos serán conservados, y así los cambios idiosincráticos entre miembros de la comunidad serán tolerados. El segundo nivel al cual la evolución podría estar actuando es a nivel de la comunidad. Este tipo de selección natural considerada “fussy” no tiene un marco teórico que soporte su mecanismo ya que no hay heredabilidad de los rasgos adaptativos por encima de la selección de grupos. El objetivo de este trabajo no es el de proveer para tal teoría o incluso separar este tema altamente discutido, pero nuestros resultados son consistentes con la idea de que las bacterias de estas comunidades complejas poseen rasgos distribuidos, incluso fuera de su filo lo que puede ser relevante para funciones de acción colectiva en comunidades estructuradas. Varias revisiones han discutido los principios de la evolución social en microorganismos (Crespi, 2001; West *et al.*, 2006; Diggle *et al.*, 2007; Foster *et al.*, 2006; de Vargas *et al.*, 2011) y algunos se enfocan más específicamente en “biofilm” (Nadell *et al.*, 2008; Mitri *et al.*, 2011) donde una simple especie, o simples genotipos cooperan.

7.3 ¿Podrían algunos clados, como el de *B. cereus*, basar su éxito en compartir funciones a nivel de comunidad?

Los miembros de este grupo exhiben la capacidad de “swarming” de forma dispersa y es clara su dependencia de la comunidad para obtener aminoácidos. En este clado, la formación de “biofilm” es un rasgo conservado en casi todos los miembros, lo que enfatiza la importancia de esta estrategia. Por otra parte, los grupos de *B. subtilis/pumilus* y *licheniformis*, conocidos como migrantes, tienen sus propias estrategias ecológicas, que parecen conservadas, a fin de no correr el riesgo de pérdida de los rasgos individuales, lo cual parecería conveniente para moverse entre comunidades. En cuanto al clado considerado el más endémico y local, *B. horikoshii*, los rasgos para “swimming” no están presentes en muchos de los miembros, la formación de “biofilm” y la prototrofia son escasos, y el “swarming” es carente completamente. Este grupo tendría que depender de los miembros de la comunidad para la nutrición y tal vez para el movimiento.

Finalmente, pocos trabajos han evaluado la actividad de los rasgos colectivos en miembros de una comunidad natural. El reto sigue siendo el entender si la variabilidad observada en este estudio es un ejemplo de una distribución de la fuerza de trabajo entre las células que comparten moléculas como bienes públicos en las comunidades naturales y si la propia cooperación en la comunidad es un rasgo seleccionado.

8. CONCLUSIONES

Los diferentes linajes del género *Bacillus* que co-ocurren en la comunidad del sedimento del Sistema Churince son un excelente modelo para estudiar la profundidad filogenética de la variabilidad de los rasgos. En este trabajo hemos descubierto una amplia e inesperada variabilidad de rasgos en los niveles filogenéticos profundos y superficiales, que nos llevan a cuestionar si la evolución está actuando a nivel individual o a nivel de la comunidad.

9. PERSPECTIVAS

Las interacciones competitivas entre estos grupos de cepas ya han sido realizadas antes, sin embargo, sería interesante conocer si entre los mismos grupos taxonómicos de *Bacillus* o algunas otras especies encontradas dentro del sistema acuático de Churince existen interacciones de cooperación. Vale la pena explorar si los compuestos metabólicos generados por un individuo funcionan como bienes públicos o únicamente para el que los genera. Se podría estudiar las condiciones que disparan o inhiben algunos rasgos, por ejemplo, para la esporulación las condiciones que la dispararon fueron diferentes para los grupos taxonómicos (especialmente las acuáticas), en algunos otros rasgos como el “swarming” al probar modificaciones en el medio de cultivo (concentración de glucosa, magnesio, datos no mostrados) se modificó esta característica, aunque también, se observaron cambios en la morfología y el tamaño asociado al “swarming”.

Se podrían estudiar otros genes que se relacionen con las funciones de acción colectiva, y analizar la distribución de los grupos taxonómicos. Por ejemplo, algunos genes relacionados al “swarming”, específicamente los relacionados a la surfactina, buscar algunos involucrados en la formación de “biofilm”, por mencionar algunos.

Por otra parte, las aplicaciones biotecnológicas de las cepas de *Bacillus* spp. pueden ser exploradas. Si bien es cierto que se han comenzado trabajos para conocer el potencial de algunas cepas para degradar compuestos contaminantes a base de fosfonatos en el laboratorio del Dr. Felipe García Oliva del Centro de

Investigaciones de Ecosistemas (CIECO UNAM), sería interesante poder explorar cuales otras características poseen, como la habilidad de producir sideróforos, producir ácido indolacético, para promover el crecimiento de plantas, o incluso antagonizar algunos patógenos de humanos o plantas.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguirre-von-Wobeser E, Eguiarte LE, Souza V, y Soberón-Chávez G. (2014). Theoretical analysis of the cost of antagonistic activity for aquatic bacteria in oligotrophic environments. *Front Microbiol* 6:490.

Alcaraz LD, Moreno-Hagelsieb G, Eguiarte LE, Souza V, Herrera-Estrella L, y Olmedo G. (2010). Understanding the evolutionary relationships and major traits of *Bacillus* through comparative genomics. *BMC genomics* 11:332-348.

Alcaraz LD, Olmedo G, Bonilla G, Cerritos R, Hernandez 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* 105:5803-5808.

Auger S, Ramarao N, Faille C, Fouet A, Aymerich S y Gohar M. (2009). Biofilm formation and cell surface properties among pathogenic and nonpathogenic strains of the *Bacillus cereus* group. *Appl Environ Microbiol.* 75(20):6616-6618.

Baban ST, Kuehne SA, Barketi-Klai A, Cartman ST, Kelly ML, Hardie KR, Kansau I, Collignon A y Minton NP. (2013). The Role of Flagella in *Clostridium difficile* Pathogenesis: Comparison between a Non-Epidemic and an Epidemic Strain. *PLoS One* 8(9):e73026.

Blomberg SP, Garland T, y Ives AR. (2003). Testing for phylogenetic signal in comparative data: behavioral traits are more labile. *Evolution* 57:717-745.

Boyle KE, Heilmann S, van Ditmarsch D y Xavier JB. (2013). Exploring social evolution in biofilms. *Curr Opin Microbiol* 16(2):207-212.

Boon E, Meehan CJ, Whidden C, Wong DH, Langille MG, y Beiko RG. (2014). Interactions in the microbiome: communities of organisms and communities of genes. *FEMS Microbiol Rev* 38:90-118.

Bordez L, Jourand P, Ducouso M, Carriconde F, Cavaloc Y, Santini S, Claverie JM, Wantiez L, Leveau A, y Amir H. (2016). Distribution patterns of microbial communities in ultramafic landscape: a metagenetic approach highlights the strong relationships between diversity and environmental traits. *Mol Ecol*. 25(10):2258-2272.

Buchanan RE. (1970). *General Systematic Bacteriology: History, Nomenclature, Groups of Bacteria*. Hafner, Darien, Connecticut.

Burke C, Thomas T, Lewis M, Steinberg P, y Kjelleberg S. (2011). Composition, uniqueness and variability of the epiphytic bacterial community of the green alga *Ulva australis*. *ISME J* 5:590-600.

Calvio C, Celandroni F, Ghelardi E, Amati G, Salvetti S, Cecilian F, *et al.* (2005). Swarming differentiation and swimming motility in *Bacillus subtilis* are controlled by *swrA*, a newly identified dicistronic operon. *J Bacteriol* 187:5356-5366.

Cerritos R, Vinuesa P, Eguiarte LE, Herrera-Estrella L, Alcaraz-Peraza LD, Arvizu-Gomez JL, *et al.* (2008). *Bacillus coahuilensis* sp. nov., a moderately

halophilic species from a desiccation lagoon in the Cuatro Ciénegas Valley in Coahuila, Mexico. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:919-923.

Claus D. y Berkeley R.C.W. (1986). *Bacillus* Cohn 1872. In: Sneath PHA (Ed) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol 2 (pp 1105–1139). Baltimore, The Williams and Wilkins Co.

Cole JR, Chai B, Farris RJ, Wang Q, Kulam-Syed-Mohideen AS, McGarrell DM, *et al.* (2007). The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Res* 35:D169-D172.

Cosmina P, Rodriguez F, Ferra F, Grandi G, Perego M, Venema G, *et al.* (1993). Sequence and analysis of the genetic locus responsible for surfactin synthesis in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 8:821-831.

Crespi BJ. (2001). The evolution of social behavior in microorganisms. *Trends Ecol Evol* 16:178-183.

Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M y Marrie TJ. (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol.* 41:435-464.

Cutting SM, y Vander-Horn PB. (1990). Genetic analysis, In Harwood CR, Cutting SM (eds). *Molecular Biological Methods for Bacillus*. John Wiley: New York, USA, pp 27–74.

Charney JC, Fischer WP y Hegarty CP. (1951). Manganese as an essential element for sporulation in the genus *Bacillus*. *J Bacteriol* 62:145-148.

Daniels R, Vanderleyden J, y Michiels J. (2004). Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 28:261-289.

Dapa T, Leuzzi R, Ng YK, Baban ST, Adamo R, Kuehne SA, Scarselli M, Minton NP, Serruto D, Unnikrishnan M. (2013). Multiple factors modulate biofilm formation by the anaerobic pathogen *Clostridium difficile*. *J Bacteriol* 195(3):545-555.

Davey ME y O'toole. (2000). Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetic *Mol Biol Rev* 64(4):847-867.

de Vargas LR, Boyle KE, y Xaviera JB. (2011). Multilevel selection analysis of a microbial social trait. *Mol Syst Biol* 9:684.

de Vries YP, Atmadja R y Hornstra LM. (2005). Influence of Glutamate on Growth, Sporulation, and Spore Properties of *Bacillus cereus* ATCC 14579 in Defined Medium. *App Environ Microbiol* 71(6):3248-3254.

Diggie SP, Gardner A, West SA, y Griffin AS. (2007). Evolutionary theory of bacterial quorum sensing: when is a signal not a signal? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 362:1241-1249.

Earl AM, Losick R y Kolter R. (2008). Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends Microbiol* 16(6): 269.

Ellers J, Kiers ET, Currie CR, McDonald BR, y Visser B. (2012). Ecological interactions drive evolutionary loss of traits. *Ecol Lett* 15:1071-1082.

Elser JJ, Schampel JH, Kyle M, Watts J, Carson E, Dowling T, Tang y Roopnarine P. (2005). Effects of PO₄ enrichment of microbial communities on hydrobiid snails in an ecosystem with living stromatolites. *Freshw Biol* 50:1826-1835.

Errington J. (1993). *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiol Rev* 57(1):1-33.

Escalante AE, Eguiarte LE, Espinosa-Asuar, L, Forney, LJ, Noguez AM y Souza V. (2008) Diversity of aquatic prokaryotic communities in the Cuatro Ciénegas basin. *FEMS Microbiol Ecol* 65:50-60.

Ewing B, Hillier L, Wendl M, y Green P. (1998). Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res* 8:175-185.

Fierer N y Jackson RB. (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *PNAS* 3(103): 626–631.

Fitter AH, Gilligan CA, Hollingworth K, Kleczkowski, Twyman RM, y Pitchford JW. (2005). Biodiversity and ecosystem function in soil. *Functional Ecology*. 19:369-377.

Foster KR, Wenseleers T, y Ratnieks FLW. (2006). Kin selection is the key to altruism. *Trends Ecol Evol* 21:57–60.

Freilich S, Zarecki R, Eilam O, Segal ES, Henry CS, Kupiec M, Gophna U, Sharan R, Ruppin E. (2011). Competitive and cooperative metabolic interactions in bacterial communities. *Nat Commun* 2:589.

Frickey T y Lupas A. (2004). CLANS: a Java application for visualizing protein families based on pairwise similarity. *Bioinformatics* 20:3702-3704.

Fritz SA, y Purvis A. (2010). Selectivity in mammalian extinction risk and threat types: a new measure of phylogenetic signal strength in binary traits. *Conserv Biol* 24:1042-1051.

Fukami T. (2004). Community assembly along a species pool gradient: implications for multiple-scale patterns of species diversity. *Popul Ecol* 46:137-147.

Futuyma, D. (2009) Evolution. Sinauer Associates, Inc. Estados Unidos de América.

Gardner A, West SA y Griffin AS. (2007). Is Bacterial Persistence a Social Trait? *PLOS One* 15(2):e752.

Gevers D, Cohan FM, Lawrence JG, Spratt BG, Coenye T, Feil EJ, *et al.*, (2005). Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. *Nat Rev Microbiol* 3(9):733-739.

Gogarten JP, Doolittle WF, Lawrence JG. (2002). Prokaryotic evolution in light of gene transfer. *Mol Biol Evol* 19(12):2226-2238.

Goldfarb KC, Karaoz U, Hanson CA, Santee CA, Bradford MA, Treseder KK, *et al.* (2011). Differential growth responses of soil bacterial taxa to carbon substrates of varying chemical recalcitrance. *Front Microbiol* 2:1-10.

González-Pastor JE, Hobbs EC, y Losick R. (2003). Cannibalism by sporulating bacteria. *Science* 301:510-513.

Govan JR, y Deretic V. (1996). Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* 60:539-574.

Goto K, Omura T, Hara Y, y 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.

Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, y Gascuel O. (2010). New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* 59:307-321.

Hamilton W. (1964). The genetical evolution of social behaviour I and II. *Journal of Theoretical Biology* 7:1–52.

Hammer BK, y Bassler BL. (2003). Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* 50:101-104.

Hamze K, Julkowska D, Autret S, Hinc K, Nagorska K, Sekowska A, *et al.* (2009). Identification of genes required for different stages of dendritic swarming in *Bacillus subtilis*, with a novel role for *phrC*. *Microbiology* 155:398-412.

Hardin, G. (1960). The Competitive Exclusion Principle. *Science* 131, 1292-1297.

Hewson I, Vargo GA, Fuhrman JA. (2003). Bacterial diversity in shallow oligotrophic marine benthos and overlying waters: effects of virus infection, containment, and nutrient enrichment. *Microb Ecol* 46:322-336.

Horner-Devine MC, Silver JM, Leibold MA, Bohannan BJ, Colwell RK, Fuhrman JA, *et al.*, (2007). A comparison of taxon co-occurrence patterns for macro- and microorganisms. *Ecology*. 88(6):1345-1353.

Huang X y Madan A. (1999). CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res* 9:868-877.

Huang QH, Wang ZJ, Wang DH, WangCX, Ma M y Jin XC. (2005). Origins and Mobility of Phosphorus Forms in the Sediments of Lakes Taihu and Chaohu, China, *Journal of Environmental Science and Health* 40:91-102.

Huelsenbeck JP, y Ronquist F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17:754-755.

Hunt DE, David LA, Gevers D, Preheim SP, Alm EJ, y Polz MF. (2008). Resource partitioning and sympatric differentiation among closely related bacterioplankton. *Science* 320:1081-1085.

Kaiser D y Losick R. (1993). How and why bacteria talk to each other. *Cell* 73:873-885.

Kearns BD. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol* 8:634-644.

Kearns DB y Losick R. (2003). Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 49:581-590.

Kembel SW, Cowan PD, Helmus MR, Cornwell WK, Morlon H, Ackerly DD, *et al.* (2010). Picante: R tools for integrating phylogenies and ecology. *Bioinformatics* 26:1463-1464.

Kim M, Oh HS, Park SC y Chun J (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol* 64(2):346-351,

Koepfel AF, y Wu M. (2012). Lineage-dependent ecological coherence in bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* 81:574-582.

Konopka A. (2009). What is microbial community ecology? *The ISME Journal* (3):1223-1230.

Konstantinidis KT, Ramette A y Tiedje JM. (2006). The bacterial species definition in the genomic era. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 361(1475):1929-1940.

Kurland CG, Canback B y Berg OG. (2003). Horizontal gene transfer: a critical view. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(17):9658-9662.

Lane DJ. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M. (eds). *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, John Wiley, New York, USA, pp 115-175.

Lauber CL, Hamady M, Knight R, Fierer N. (2009). Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Appl Environ Microbiol.* 75 (15):5111-5120.

Lenon JT y Jones SE. (2011). Microbial seed banks: the ecological and evolutionary implications of dormancy. *Nature Reviews Microbiology* 9:119-130.

Letunic I, y Bork P. (2011). Interactive Tree Of Life v2: online annotation and display of phylogenetic trees made easy. *Nucleic Acids Res* 39:W475–W478.

López-Lozano NE, Eguiarte LE, Bonilla-Rosso G, García-Oliva F, Martínez-Piedragil C, Rooks C, Souza V. (2012). Bacterial communities and the nitrogen cycle in the gypsum soils of Cuatro Ciénegas Basin, coahuila: a Mars analogue. *Astrobiology* 12(7):699-709.

Losick R. (1982). Sporulation genes and their regulation. In *The Molecular Biology of the Bacilli*, Vol. 1, *Bacillus subtilis* (D. A. Dubnau, ed.), Academic Press, New York, pp. 179-201.

Lozupone C, y Knight R. (2005). UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 71:8228-8235.

Lozupone CA y Knight R. (2007). Global patterns in bacterial diversity. 104 (27):11436-11440.

Martiny JB, Bohannan BJ, Brown JH, Colwell RK, Fuhrman JA, Green JL, Horner-Devine MC, *et al.*, (2006). Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nat Rev Microbiol* 4(2):102-12.

Martiny AC, Treseder K, y Pusch G. (2013). Phylogenetic conservatism of functional traits in microorganisms. *ISME J* 7:830-838.

Mayberry-Carson KJ, Tober-Meyer B, Smith JK, Lambe DW, Costerton JW. (1984). Bacterial adherence and glycocalix formation in osteomyelitis experimentally induced with *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 43:825-33.

Mayr E. (1942). Systematics and the origin of species from the view point of a zoologist. Columbia University Press, New York.

McArthur JV. (2006). Microbial ecology: an evolutionary approach. Amsterdam; Boston: Elsevier, AP. 35-39 p.

Macfarlane S, Hopkins MJ y Macfarlane GT. (2001). Toxin synthesis and mucin breakdown are related to swarming phenomenon in *Clostridium septicum*. *Infect Immun* 69:1120–1126.

McGill BJ, Enquist BJ, Weiher E, y Westoby M. (2006). Rebuilding community ecology from functional traits. *Trends Ecol Evol* 21(4):178-85.

McInerney JO, Pisani D, Baptiste E, O'Connell MJ. (2011). The Public Goods Hypothesis for the evolution of life on Earth. *Biol Direct* 6:1745-6150.

Mitri S, Xavier JB, y Foster KR. (2011). Social evolution in multispecies biofilms. *Proc Natl Acad Sci* 108:10839-10846

Morris JJ, Lenski RE, y Zinser ER. (2012). The Black Queen Hypothesis: Evolution of Dependencies through Adaptive Gene Loss. *MBio* 3:1-7.

Muller JP, An Z, Merad T, Hancock IC, y Harwood CR. (1997). Influence of *Bacillus subtilis* phoR on cell wall anionic polymers. *Microbiology* 143:947-956.

Nakata HM, y Halvorson HO. (1960). Biochemical changes occurring during growth and sporulation of *Bacillus cereus*. *J Bacteriol* 80:801-810.

Nadell CD, Xavier JB, Levin SA, y Foster KR. (2008). The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms. *Plos Biol* 6(1):e14.

Nadell CD, y Bassler BL. (2011). A fitness trade-off between local competition and dispersal in *Vibrio cholerae* biofilms. *Proc Natl Acad Sci* 108:14181-14185.

Nemergut DR, Schmidt SK, Fukami T, O'Neill SP, Bilinski TM, Stanish LF, Knelman JE, Darcy JL, Lynch RC, Wickey P, y Ferrenberg S. (2013). Patterns and processes of microbial community assembly. *Microbiol Mol Biol* 77(3):342-356

Nicholson W, y Setlow P. (1990). Sporulation, germination and outgrowth. In: Harwood C, Cutting S (eds). *Molecular Biological Methods for Bacillus*. John Wiley: New York, USA, pp 391-450.

Nygaard S, Zhang G, Schiøtt M, Li C, Wurm Y, Hu H, Zhou J, Ji L, Qiu F, Rasmussen M, y Pan H. (2011). The genome of the leaf-cutting ant *Acromyrmex echinator* suggests key adaptations to advanced social life and fungus farming. *Genome Res* 21:1339-1348.

Ochman H, Lawrence JG, Eduardo A, y Groisman AE. (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 405:299-304.

Oleskin AV (1994). Social behaviour of microbial populations. *Journal of Basic Microbiology* 34(6):425-439.

Oliveira NM, Niehus R y Foster KR. (2014). Evolutionary limits to cooperation in microbial communities. *PNAS* 11(50):17941–17946.

Pausas JG y Verdú M. (2010). The jungle of methods for evaluating phenotypic and phylogenetic structure of communities. *BioScience* 60:614-625.

Partridge SR y Errington J. (1993). The importance of morphological events and intercellular interactions in the regulation of prespore-specific gene expression during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 8(5):945-955.

Phelan VV, Liu WT, Pogliano K y Dorrestein PC. (2012). Microbial metabolic exchange the chemotype to phenotype link. *Nature Chemical Biology*. 8:26-35.

Pérez-Gutiérrez RA, López-Ramírez V, Islas A, Alcaraz LD, Hernández-González I, Luna-Olivera BC, *et al.* (2012). Antagonism influences assembly of a *Bacillus* guild in a local community and is depicted as a food-chain network. *ISME J* 7:487-497.

Philippot L, Andersson SG, Battin TJ, Prosser JI, Schimel JP, Whitman WB, *et al.* (2010). The ecological coherence of high bacterial taxonomic ranks. *Nat Rev Microbiol* 8:523-529.

Pinkava DJ (1984). Vegetation and Flora of the Bolson of Cuatro Ciénegas Region, Coahuila, Mexico: IV. Summary, Endemism and Corrected Catalogue. *Journal of the Arizona-Nevada Academy of Science* 19: 23-47.

Pirhonen, M., Flego, D., Heikinheimo, R. & Palva, E. T. (1993). A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and

exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *EMBO J* 12:2467–2476.

Ponomarova O y Patil KR. (2015). Metabolic interactions in microbial communities: untangling the Gordian knot. *Curr Opin Microbiol* 27:37-44.

Ramette A y Tiedje JM. (2007). Biogeography: an emerging cornerstone for understanding prokaryotic diversity, ecology, and evolution. *Microb Ecol* 53(2):197-207.

R Development Core Team. (2009). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Ravel J y Fraser CM. (2005). Genomics at the genus scale. *Trends in Microbiology* 13(3):94-96.

Rebollar AE, Avitia M, Eguiarte LE, González-González A, Mora L, Bonilla-Rosso G, *et al.* (2012). Water–sediment niche differentiation in ancient marine lineages of *Exiguobacterium* endemic to the Cuatro Ciénegas Basin. *Environ Microbiol* 14:2323-2333.

Ross-Gillespie A y Kümmerli R. (2014). ‘Evolution-proofing’ antibacterials. *Evolution, Medicine and Public Health* 134-35.

Rosselló-Mora R y Amann R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 25:39-67.

Sakai H, Howlader MT, Ishida Y, Nakaguchi A, Oka K, Ohbayashi K, Yamagiwa M y Hayakawa T. (2007). Flexibility and strictness in functional

replacement of domain III of cry insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*.
Journal of bioscience and bioengineering. 103:381-383

Sanger F, Nicklen S, y Coulson AR. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 74:5463-5467.

Slepecky RA y Hemphill HE. (2006): The genus *Bacillus* – nonmedical. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K. (eds): *The Prokaryotes. A Handbook of the Biology of Bacteria*. Springer Science + Business Media, New York: 530–555.

Smith NR, Gordon RE y Clark FE. (1946). *Aerobic Mesophilic Spore-Forming Bacteria*. U.S. Department of Agriculture Miscellaneous Publications 559, Washington, D.C.

Smith AM, Guzmán CA y Walker MJ. (2001), The virulence factors of *Bordetella pertussis*: a matter of control. *FEMS Microbiol Rev*. 25(3):309-333.

Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PA, Kampf P, *et al.* (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 1043-1047.

Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, *et al.* (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 75:7537-7541.

Skujinš J. (1984). Microbial ecology of desert soil. *Adv Microbiol Ecol.* 7:49-92.

Souza V, Espinosa-Asuar, Escalante AE, Eguiarte LE, Farmer J, Forney L, Lloret L, Rodriguez-Martinez JM, Soberon X, Dirzo R y Elser JJ. (2006) An endangered oasis of aquatic microbial biodiversity in the Chihuahuan desert. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:6565-6570.

Souza V, Siefert JL, Escalante AE, Elser JJ, y Eguiarte LE. (2012). The Cuatro Ciénegas Basin in Coahuila, Mexico: An Astrobiological Precambrian Park. *Astrobiology* 12:641–647.

Spoering AL y Gilmore MS. (2006). Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms. *Curr Opin Microbiol* 9:133-137.

Stein T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol* 56(4):845-857.

Stoodley P, Sauer K, Davies DG, y Costerton JW. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 56:187-209.

Suen G, Teiling C, Li L, Holt C, Abouheif E, Bornberg-Bauer E, Bouffard P, Caldera EJ, Cash E, Cavanaugh A, y Denas O. (2011). The genome sequence of the leaf-cutter ant *Atta cephalotes* reveals insights into its obligate symbiotic lifestyle. *PLOS Genetics* 7:e1002007.

Sussman AS y Halvorson HO. (1966), Spores. Their Dormancy and Germination. New York, Harper & Row.

Swain MR, Laxminarayana K y Ray RC. (2012). Phosphorus Solubilization by Thermotolerant *Bacillus subtilis* Isolated from Cow Dung Microflora. *Agricultural Research* 1(3):273-279.

Tapia-Torres Y, Rodríguez-Torres MD, Elser JJ, Islas A, Souza V García-Oliva F y Olmedo-Álvarez G. (2016). How to live with phosphorus scarcity in soil and sediment: Lessons from bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 82(15): 4455.

Travisano M y Velicer GJ. (2004). Strategies of microbial cheater control. *Trends Microbiol* 12(2):72-78.

Tsiknia M, Paranychianakis NV, Varouchakis EA, Moraetis D y Nikolaidis NP. (2014). Environmental drivers of soil microbial community distribution at the Koiliaris Critical Zone Observatory. *FEMS Microbiology Ecology*. 90(1):139-152.

Turnbull PCB. (1986). *Bacillus cereus* toxins, p. 397–448. In F. Dorner and J. Drews (ed.), *Pharmacology of bacterial protein toxins*. Permagon Press, New York, N.Y.

Velicer GJ, y Yu YTN. (2003). Evolution of novel cooperative swarming in the bacterium *Myxococcus xanthus*. *Nature* 425:75-78.

Vilain S, Luo Y, Hildreth M y Brozel V. (2006). Analysis of the Life Cycle of the Soil Saprophyte *Bacillus cereus* in Liquid Soil Extract and in Soil. *Applied Environmental Microbiology*. 72(7):4970-4977.

Violle C, Navas ML, Vile D, Kazakou E, Fortunel C, Hummel I, Garnier E. (2007). *Oikos* 116:882–892.

Visser B, Le Lann C, den Blanken FJ, Harvey JA, van Alphen JJM, y Ellers J. (2010). Loss of lipid synthesis as an evolutionary consequence of a parasitic lifestyle. *Proc Natl Acad Sci* 107:8677-8682.

Vlamakis H, Chai Y, Beaugregard P, Losick R, y Kolter R. (2013). Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nat Rev Microbiol* 11:157-168.

Vu B, Chen M, Russell JC y Ivanova EP. (2009). Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation. *Molec* 14:2535-2554.

Webb CO, Ackerly DD, McPeck MA y Donoghue MJ. (2002). Phylogenies and Community Ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics* 33:475-505

Webb CO. (2000). Exploring the phylogenetic structure of ecological communities: an example for rain forest trees. *The American Naturalist* 156:145-155.

Weiher E y Keddy PA. (1995). Assembly Rules, Null Models, and Trait Dispersion: New Questions from Old Patterns. *Oikos* 74(1):159-164.

West SA, Griffin AS, Gardner A, y Diggle SP. (2006). Social evolution theory for microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 4:597-607.

Witham TG, Bailey JK, Schweitzer JA, Shuster SM, Bangert RK, LeRoy CJ, *et al.* (2006). A framework for community and ecosystem genetics: from genes to ecosystems. *Nat Rev Genet* 7:510-523.

Whitaker, R., Grogan, D. y Taylor, J. (2002). Biogeographic patterns of divergence between populations of *Sulfolobus "islandicus"*. En Abstracts of the 4th International Congress on Extremophiles. Naples, Italy.

Wiley, E. O. (1978). The evolutionary species concept reconsidered. *Syst. Zool* 27:17-2.

Wilson D. (1975). A theory of group selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 72:143.

Xavier JB. (2011). Social interaction in synthetic and natural microbial communities. *Molecular Systems Biology* 7(1):1-11.

Young KD. (2006). The Selective Value of Bacterial Shape. *Microbiol Mol Biol Rev* 70(3):660-703.

Young KD. (2007). Bacterial morphology: Why have different shapes? *Curr Opin Microbiol* 10(6):596-600.

Yu AC, Loo JF, Yu S, Kong SK, Chan TF. (2013). Monitoring bacterial growth using tunable resistive pulse sensing with a pore-based technique. *Applied microbiology and biotechnology* 98(2):855-862.

Xu J, Saunders CW, Hu P, Grant RA, Boekhout T, Kuramae EE, Kronstad JW, DeAngelis YM, Reeder NL, Johnstone KR, y Leland M. (2007). Dandruff-associated *Malassezia* genomes reveal convergent and divergent virulence traits shared with plant and human fungal pathogens. *Proc Natl Acad Sci* 104:18730-18735.

How To Live with Phosphorus Scarcity in Soil and Sediment: Lessons from Bacteria

Yunuen Tapia-Torres,^a Maria Dolores Rodríguez-Torres,^a  James J. Elser,^b Africa Islas,^a Valeria Souza,^c Felipe García-Oliva,^d  Gabriela Olmedo-Álvarez^a

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Irapuato, Mexico^a; School of Life Sciences, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA^b; Instituto de Ecología, Departamento de Ecología Evolutiva, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico^c; Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, Universidad Nacional Autónoma de México, Morelia, Mexico^d

ABSTRACT

Phosphorus (P) plays a fundamental role in the physiology and biochemistry of all living things. Recent evidence indicates that organisms in the oceans can break down and use P forms in different oxidation states (e.g., +5, +3, +1, and -3); however, information is lacking for organisms from soil and sediment. The Cuatro Ciénegas Basin (CCB), Mexico, is an oligotrophic ecosystem with acute P limitation, providing a great opportunity to assess the various strategies that bacteria from soil and sediment use to obtain P. We measured the activities in sediment and soil of different exoenzymes involved in P recycling and evaluated 1,163 bacterial isolates (mainly *Bacillus* spp.) for their ability to use six different P substrates. DNA turned out to be a preferred substrate, comparable to a more bioavailable P source, potassium phosphate. Phosphodiesterase activity, required for DNA degradation, was observed consistently in the sampled-soil and sediment communities. A capability to use phosphite (PO₃³⁻) and calcium phosphate was observed mainly in sediment isolates. Phosphonates were used at a lower frequency by both soil and sediment isolates, and phosphonate activity was detected only in soil communities. Our results revealed that soil and sediment bacteria are able to break down and use P forms in different oxidation states and contribute to ecosystem P cycling. Different strategies for P utilization were distributed between and within the different taxonomic lineages analyzed, suggesting a dynamic movement of P utilization traits among bacteria in microbial communities.

IMPORTANCE

Phosphorus (P) is an essential element for life found in molecules, such as DNA, cell walls, and in molecules for energy transfer, such as ATP. The Valley of Cuatro Ciénegas, Coahuila (Mexico), is a unique desert characterized by an extreme limitation of P and a great diversity of microbial life. How do bacteria in this valley manage to obtain P? We measured the availability of P and the enzymatic activity associated with P release in soil and sediment. Our results revealed that soil and sediment bacteria can break down and use P forms in different oxidation states and contribute to ecosystem P cycling. Even genetically related bacterial isolates exhibited different preferences for molecules, such as DNA, calcium phosphate, phosphite, and phosphonates, as substrates to obtain P, evidencing a distribution of roles for P utilization and suggesting a dynamic movement of P utilization traits among bacteria in microbial communities.

Phosphorus (P) is an essential element for the synthesis of many biomolecules, including DNA, RNA, and ATP (1), with no substitute as a building block of life. P is also frequently limiting for a variety of biota, including vascular plants, marine and freshwater phytoplankton, aquatic and terrestrial bacteria, and herbivorous animals (2); thus, understanding how P limitation shapes ecological and evolutionary dynamics is a key step in linking levels of biological organization from genes to ecosystems.

Organisms not only assimilate P in the form of phosphate for their cellular requirements (3) but can also break down and use P forms in different oxidation states (4). Indeed, Van Mooy et al. (5) showed that oceanic P is recycled through a previously unexplored pool of reduced forms of P. This suggests that the P cycle is more complicated than previously thought, in that several P redox states are involved at the global scale; if corroborated, this will change our understanding of global P cycling and ecosystem P limitation, as well as interspecific competition for P. While there is evidence of the importance of reduced P compounds in marine P biogeochemistry (3–5), the importance of reduced P compounds in terrestrial and inland water ecosystems is not well understood, reflecting a lack of information about the

presence, abundance, and utilization of reduced P compounds in these ecosystems.

It is well-known that in soils, lakes, and oceans, microorganisms are primarily responsible for P recycling, manipulating the

Received 16 January 2016 Accepted 16 May 2016

Accepted manuscript posted online 27 May 2016

Citation Tapia-Torres Y, Rodríguez-Torres MD, Elser JJ, Islas A, Souza V, García-Oliva F, Olmedo-Álvarez G. 2016. How to live with phosphorus scarcity in soil and sediment: lessons from bacteria. *Appl Environ Microbiol* 82:4652–4662. doi:10.1128/AEM.00160-16.

Editor: R. M. Kelly, North Carolina State University

Address correspondence to Gabriela Olmedo-Álvarez, golmedo@ira.cinvestav.mx.

* Present address: Yunuen Tapia-Torres, Escuela Nacional de Estudios Superiores Morelia, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Morelia, Morelia, Michoacán, Mexico.

Y.T.-T. and M.D.R.-T. contributed equally to this work.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00160-16>.

Copyright © 2016, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

pool of available P through a variety of P transformation processes (e.g., P solubilization, organic matter depolymerization, P mineralization, and P assimilation) (6, 7). P forms in ecosystems include mineral P (e.g., in rocks, soil, and sediment), dissolved and particulate organic P, and dissolved inorganic phosphate (PO_4^{3-} , here P_i) (8). P_i is the main P source for microorganisms and plants, but its availability in soil, sediment, and water is very low due to its high reactivity with calcium, iron, and aluminum (9). Since primary productivity and growth rates in ecosystems are highly P dependent (10), microbes have evolved numerous mechanisms for uptake and storage of P_i in response to nutrient scarcity (11, 12).

Phosphorus can exist in a range of oxidation states (e.g., +5, +3, +1, and -3) (4, 13). This spectrum of valence states supports a cascade of microbial oxidation-reduction reactions that may have important bioenergetic and ecological consequences analogous to those of the microbial C, N, and S cycles (4). In its most oxidized state (valence +5), P is found as phosphate esters (a mixture of HPO_4^{2-} and H_2PO_4^-) in many biomolecules, including nucleic acids (DNA and RNA), phospholipids, and phosphoproteins (14). Most phosphate esters are transformed or metabolized by microbes that produce extracellular enzymes (exoenzymes, often called phosphatases in a general form) that cleave organic molecules to liberate P_i for assimilation, as well as C and N in some cases (15). For example, in marine environments, dissolved DNA concentrations can range from 0.2 to 0.88 $\mu\text{g}/\text{liter}$, constituting a significant portion of the organic phosphorus pool (16). Additionally, in marine bacteria, dissolved DNA has been found to sustain 8 to 50% of the bacterial N demand (17).

Among the different classes of phosphatase enzymes, the most frequently studied are phosphomonoesterases (PM, often called acid or alkaline phosphatases, depending on their pH optima), enzymes that mineralize P from inositol phosphates, nucleotides, phosphoproteins, and sugar phosphates (18). However, phosphodiesterases (PD) that mineralize P from nucleic acids, phospholipids, and other diester phosphates (19) are also relevant for microbial P requirements. Among these, phosphate diesters are the main input of organic P (P_o) to soils but typically constitute only a small fraction of total soil P_o (20).

In a more-reduced state (valence +3), P is also found as phosphite (PO_3^{3-} [Phi]) and organophosphonates. The organophosphonates are a class of organophosphorus molecules of both biogenic and xenobiotic origin that contain at least one stable carbon-phosphorus (C-P) covalent bond (21). In organophosphonates, this carbon-phosphorus bond replaces one of the four carbon-oxygen-phosphorus bonds of the more common phosphate ester (22). Phosphonates are found largely in unicellular life forms, such as bacteria, archaea, and fungi, occurring either as free molecules or, more usually, in peptide, glycan, or lipid conjugates, such as the 2-aminoethylphosphonic acid (ciliatine) and 2-amino-3-phosphonopropionic acid (phosphonoalanine) components of membrane phosphonolipids (23).

Four different phosphonate-degradative pathways have been reported for various bacterial species: the phosphonopyruvate hydrolase, phosphonoacetate hydrolase, phosphonoacetaldehyde hydrolase (phosphonatase), and the carbon-phosphorus lyase (C-P lyase) pathways (13, 24, 25). Homologous genes for phosphonate degradation pathways are distributed in distantly related bacteria, thus providing strong evidence for lateral gene transfer during evolution (1). Additionally, recent genomics studies have

shown that soil and sediment bacteria have a large variety of mechanisms for the transformation, acquisition, and storage of phosphorus when it is both in oxidized and reduced forms (11). These suggest the existence of a terrestrial P redox cycle that might be analogous to the oceanic phosphorus redox cycle described by Van Mooy et al. (5). However, to better understand the global redox phosphorus cycle, it is necessary to identify the environmental controls on C-O-P and C-P compound cycling, the microorganisms involved, and the bioenergetics of the P oxidation and reduction pathways, as suggested by Karl (4), in aquatic and terrestrial energy-limited environments.

Physiological adaptations have been observed in bacteria that have to contend with environments limited in phosphorus. For instance, *Bacillus coahuilensis*, isolated from the Churince Pond in Cuatro Ciénegas, Coahuila, Mexico, was shown to have unique features compared to most well-studied *Bacillus* spp., such as having a small genome, lacking teichoic acid (a P-rich cell wall component), and having the capability to synthesize membrane sulfolipids in addition to phospholipids (26).

Here, we report a vast group of bacterial isolates from soil and sediment of a halophile ultraoligotrophic ecosystem which are able to obtain phosphorus from substrates with different oxidation states. We expected that evolution in a P-limited environment would have selected for traits that would allow bacteria to use diverse organic P substrates (C-O-P and C-P) through secretion of exoenzymes for P acquisition. Therefore, the objective of our study was to assess the capabilities of strains to use different P substrates and determine the phylogenetic distribution of these traits. We also wanted to measure the activities of the different exoenzymes in soil and sediment to evaluate the relevance of the different P substrates for microbial communities and their correlation with the presence of specific P utilization traits. We believe that understanding the strategies that microorganisms use to access P in different substrates will help both to understand how P is transformed by bacteria in microbial communities and to aid in elucidating the importance of reduced phosphorus compounds in the terrestrial components of the global phosphorus redox cycle.

MATERIALS AND METHODS

Study site and sampling. This study was carried out in halophile grassland soil and aquatic sediments in the Cuatro Ciénegas Basin (CCB) in the central region of the Chihuahuan Desert in Coahuila, Mexico. The climate is hot and arid, with temperatures as high as 45°C in July and down to below 0°C in January (27). The mean annual precipitation is 253 mm. On the western side of the basin, Jurassic-era gypsum is the dominant parent material, while on the eastern side, Jurassic-era limestone dominates (28, 29). In both parts of the basin, the grass *Sporobolus airoides* (Torr.) is the dominant plant species (30).

Three study sites (one for grassland soil sampling and two for sediment sampling) were located within the Churince (CH) drainage on the western side of the CCB. Additionally, one site (for grassland soil sampling) was located within the natural reserve Pozas Azules (PA) on the eastern side of the CCB. At each soil sampling site, a 100- by 50-m plot was demarcated. In total, 10 composite samples were taken at each plot. For sediment sampling, samples were taken from the edge of one of the larger lagoons and from one small fertilized pool (for a more detailed description of the fertilization processes, see reference 31). The distance between each sediment sampling site was approximately 30 m. Soil (10 samples per site) and sediment (five samples from Churince sediment and one sample from Churince fertilized sediment) samples were stored in black plastic bags and refrigerated at 4°C for biogeochemical laboratory analyses; an

TABLE 1 Substrates utilized as sole phosphorus source at a final concentration of 0.1 mM and their abbreviations and formulas

Substrate	Abbreviation	Formula
Potassium phosphate	PP	KH_2PO_4
Calcium phosphate	CP	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
(2-Aminoethyl)phosphonic acid	2-AEP	$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$
Diethyl phosphonoacetaldehyde	2-PA	$(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})_2\text{CHCH}_2\text{P}(\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$
Phosphite	Phi	KH_2PO_3
DNA	DNA	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6\text{N}_5\text{P}^a$
P-free control	PFree	

^a Example of a polymer with a guanosine base.

aliquot of each sample was stored in a Falcon tube and immediately processed for microbial plating (see below).

Biogeochemical analyses. To allow nutrient concentrations and enzymatic activities to be corrected for soil sample moisture content, a 100-g subsample was oven dried at 75°C to constant weight for soil moisture determination using the gravimetric method.

Dissolved nutrients. Dissolved and microbial nutrient forms were extracted from moist soil samples with deionized water after shaking for 45 min and then were filtered through a Millipore 0.42- μm -pore-size filter (32). A blank with deionized water was processed in a manner similar to that of the samples to correct the values in case any contamination was present during the procedure. Prior to acid digestion, one aliquot of the filtrate was used to determine the P_i in the deionized-water extract. Total dissolved P (TDP) was determined by acid digestion, followed by colorimetry using a Bran-Luebbe AutoAnalyzer III (Norderstedt, Germany [33]). Total dissolved carbon (TDC) was measured with an auto-analyzer carbon module for liquids (TOC module CM5012; UIC-Coulometrics, Joliet, IL, USA). Dissolved inorganic carbon (DIC) was determined in an acidification module (CM5130). DOC and dissolved organic phosphorus (DOP) were calculated as the difference between total dissolved forms and inorganic dissolved forms (34).

Nutrients within microbial biomass. C, N, and P within microbial biomass (C_{mic} , N_{mic} , and P_{mic} , respectively) concentrations were determined by the chloroform fumigation-extraction method (34–36). Fumigated and nonfumigated samples were incubated for 24 h at 25°C and under constant moisture. C_{mic} was extracted from fumigated and nonfumigated samples with 0.5 M K_2SO_4 and filtered through Whatman no. 42 paper (36). C concentration was measured from each extract as total carbon (TC) and inorganic carbon (IC) by the method described before. The organic C concentration was the difference between TC and IC, and the organic C was used for the C_{mic} calculations. C_{mic} was calculated by subtracting the extracted organic carbon in nonfumigated samples from that of fumigated samples and dividing it by a conversion factor, k_{EC} (extractable part of microbial biomass C), of 0.45 (37). N_{mic} was extracted using the same procedure used for C_{mic} , but the extract was filtered through Whatman no. 1 paper. The filtrate was acid digested and quantified as TN using the macro-Kjeldahl method (38). N_{mic} was calculated similarly as C_{mic} but divided by a k_{EN} factor (extractable part of microbial biomass N after fumigation) of 0.54 (39). P_{mic} was extracted using 0.5 M NaCO_3 at pH 8.5. After this, the fumigation-extraction technique involving chloroform and an acid digestion was performed (40, 41). P_{mic} was calculated as for C_{mic} and N_{mic} but divided by a k_{P} factor (extractable part of microbial biomass P after fumigation) of 0.4 (36, 42). P_{mic} was determined colorimetrically by the molybdate-ascorbic acid method (35) using a spectrophotometer (Evolution 201; Thermo Scientific, Inc.). Finally, the values of C_{mic} , N_{mic} , and P_{mic} were corrected to dry-soil basis.

Exoenzyme activity analyses. The activities of three exoenzymes were measured with assay techniques previously reported (43–46). The potential activities of phosphomonoesterase (PM) and phosphodiesterase (PD) were quantified colorimetrically using ρ -nitrophenol (ρNP) substrates, while phosphonate (PN) activity was determined using (2-aminoethyl)phosphonic acid (2-AEP) as the substrate, and the P_i liberated over time was quantified colorimetrically by the molybdate-ascorbic acid

method (35) (Table 1). For all enzymes, we used 2 g of fresh soil and fresh sediment and 30 ml of modified universal buffer (MUB) (pH 9) for exoenzyme extraction. Three replicates and one control (sample without substrate) per sample were prepared. Additionally, three substrate controls (substrate without sample) were included per assay; all were incubated at 30°C. We centrifuged the tubes after the incubation period, and then 750 μl of supernatant was diluted in 2 ml of deionized water. For enzymes with substrates linked to ρNP , we measured the absorbance of ρNP at 410 nm on an Evolution 201 spectrophotometer (Thermo Scientific, Inc.). Finally, exoenzyme activity was expressed in nanomoles of ρNP formed per gram of soil (dry weight) per hour ($\text{nmol } \rho\text{NP} [\text{g SDW}]^{-1} \text{ h}^{-1}$) (47). For PN, we measured the absorbance of P_i at 882 nm after ascorbic acid reduction. Finally, PN activity was expressed as parts per million of P_i released per hour ($\text{ppm } \text{P}_i \text{ h}^{-1}$). All enzymatic assays were done at 30°C.

Isolation of microorganisms. The isolates in the collection were obtained using an inoculum of sediment and soil for each sample from each of the two main sampling sites (the Churince hydrological system and Pozas Azules). Fresh samples were added to an Eppendorf tube with 800 μl of modified universal buffer (MUB) to achieve a ratio of 1/3 (wt/vol); the resulting suspension was mixed continuously for 60 min. The resultant suspension was used as an inoculum for plating onto petri dishes with modified marine agar medium, a complex medium that includes peptone, yeast extract, and dibasic sodium phosphate (48), and incubated at 37°C for 2 days. Colonies with different morphotypes (i.e., size, shape, and color) were selected. Purification was performed by subculturing on the same medium to ensure that the culture was axenic; all isolates were stored at -80°C in marine medium with 15% (wt/vol) glycerol.

Evaluation of isolates for growth in different phosphorus sources. A total of 1,163 isolates were obtained (250 from CH soil, 250 from PA soil, 141 from intermediate lagoon sediment of CH, and 512 from the fertilized small-pond sediment of CH). All were isolated and routinely grown on rich medium (marine agar medium). To evaluate preference for different P substrates, we used a defined medium (DM) (49) either with no phosphorus added (DM) or containing different P sources. The base medium (DM) contained (per liter): Tris base, 6.057 g adjusted to pH 8.0; NH_4NO_3 , 0.26 g; MgSO_4 , 0.48 g; disodium citrate, 1.99 g; ZnCl_2 , 0.000136 g; NaCl, 5 g; FeCl_3 , 0.27 g; KCl, 0.1 g; MnCl_2 , 0.2 g; CaCl, 0.4 g; glucose, 9 g; and amino acid mixture, 0.93 g. Heat-labile substrates (vitamin B complex, biotin, and nicotinic acid) were filter sterilized and added aseptically after autoclaving. Isolates were evaluated for growth in the following six phosphorus sources at a concentration of 1 mM added to the base DM medium: (i) potassium phosphate, (ii) calcium phosphate, (iii) phosphite, (iv) (2-aminoethyl)phosphonic acid, (v) 2-phosphonoacetaldehyde, and (vi) DNA; there was also (vii) a control without P (PFree) (Table 1).

Isolates were grown initially at 37°C for 72 h in DM lacking any P to ensure the depletion of P storage. After that, each isolate was transferred to DM with each one of the six different P sources, along with a control plate lacking P. These were then incubated at 37°C for 72 h. For each isolate that grew on a given P source, we further tested its ability to use that same P source. Only 528 isolates exhibited an ability to grow on DM medium after the 2nd transfer and were selected and used for DNA extraction and 16S rRNA identification.

TABLE 2 Nutrients quantified in grassland soil and sediment in the Cuatro Ciénegas Basin, Coahuila, Mexico

Parameter ^a	Soil		Sediment	
	Churince	Pozas Azules	Churince	Fertilized
Nutrient amt [mean (SE) $\mu\text{g g}^{-1}$]				
DOC	172 (9.6)	99 (5.4)	333 (160)	342
DON	10.39 (1.4)	5.59 (0.3)	50.52 (27.8)	70.24
DOP	1.54 (0.32)	0.89 (0.11)	6.68 (0.25)	8.35
C _{mic}	211 (52.23)	135 (16.7)	184 (23.7)	134
N _{mic}	15.48 (3.6)	11.05 (2.6)	23.77 (3.4)	22.54
P _{mic}	4.021 (0.03)	7.769 (0.03)	2.864 (0.5)	2.731
Ratios				
DOC/DON	16.55	17.74	6.59	4.86
DOC/DOP	111.5	110.5	49.82	40.93
DON/DOP	6.73	6.23	7.56	8.42
C _{mic} /N _{mic}	13.26	12.19	7.75	5.95
C _{mic} /P _{mic}	52.37	17.34	64.38	49.13
N _{mic} /P _{mic}	3.85	1.42	8.29	8.25

^a DOC, dissolved organic carbon; DON, dissolved organic nitrogen; DOP, dissolved organic phosphorus; C_{mic}, carbon within microbial biomass; N_{mic}, nitrogen within microbial biomass; P_{mic}, phosphorus within microbial biomass.

DNA extraction and 16S rRNA gene amplification by PCR. Total genomic DNA was extracted from isolates using the phenol-chloroform method (50). The 16S rRNA genes were amplified from the DNA templates by PCR with the universal primers 16S 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') and 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3') obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). PCRs were run in a thermocycler (Palm-Cycler; Corbett Research) using 30 cycles of 94°C, 55°C, and 70°C. PCR products were sequenced by the Sanger methodology (51) at Cinvestav-Langebjo (Irapuato, Mexico). The 16S rRNA sequences were verified with Phred (52), and sequences of at least 500 bp were used for the analysis. Phylogenetic reconstruction was carried out with 528 sequences using the maximum-likelihood method in PhyML (53). The DNA sequences were retrieved from the data set, classified using the Ribosomal Database Project (RDP) Classifier tool (54), and then clustered as operational taxonomic units (OTU) using mothur (55). The tree was edited on the ITOL platform (56).

We analyzed the sequences with AdaptML (57) to define ecologically differentiated populations; the sequences were assigned to the Churince soil, Pozas Azules soil, sediment, and fertilized sediment habitats to identify populations as groups of related strains sharing a common projected habitat.

Statistical analyses. To compare the abilities of various isolates to grow on the different P sources, a logistic regression model (LRM) with two factors (site and P source) was performed using a generalized linear model in STATISTICA (58). This model is suitable for analyzing data with a binomial distribution (59). Spearman correlations were used to explore relationships among isolates' growth on the different P substrates.

Nucleotide sequence accession numbers. Sequences from this study for strains from Churince and Pozas Azules soil samples have been depos-

ited in GenBank under the accession numbers KP296259 to KP296570; sequences for strains from Churince sediment have been deposited in GenBank under accession numbers KP340470 to KP340508, KF966199, KF966201, KF966211, KF966216, KF966223, KF966226, KF966228 to KF966230, KF966234, KF966236, KF966247, KF966248, KF966250, KF966253, KF966255, KF966256, KF966264, KF966270, KF966272, KF966276, KF966281, KF966284, KF966289, KF966291, KF966297, KF966304, KF966305, KF966310, KF966311, KF966315, KF966321, KF966324, KF966327, KF966329, KF966332, KF966334, KF966336 to KF966338, KF966343, KF966348, KF966351, KF966355, KF966357, KF966358, KF966367, KF966379, KF966380, KF966386, KF966387, KF966397, KF966410 to KF966419, KF966421 to KF966425, KF966427 to KF966432, KF966434, KF966441, KF966443, KF966447, KF966449, KF966450, KF966452, KF966454, KF966455, KF966467, KF966477, KF966485, KF966486, KF966507, KF966509, KF966515, KF966516, KF966526, and KF966534; and sequences for strains from Churince fertilized sediment have been deposited in GenBank under accession numbers KP296571 to KP296656 (see Table S1 in the supplemental material).

RESULTS

Nutrient and exoenzyme distributions across sites. To understand the different bacterial strategies for P utilization in the microbial communities from Cuatro Ciénegas ultraoligotrophic ecosystems, we first assessed free and microbe-associated nutrients in soil and sediment, as well as enzymatic activities in the different sampling sites. Our results showed that the sediment samples were characterized by noticeably higher concentrations of dissolved organic carbon (DOC), dissolved organic nitrogen (DON), and dissolved organic phosphorus (DOP) than the soil samples (Table 2). The microbial nitrogen (N_{mic}) content was also higher in the sediment samples than in the soil samples. Additionally, C_{mic}/P_{mic} and N_{mic}/P_{mic} ratios were higher in sediment samples than in the soil samples. However, soil samples had higher microbial P (P_{mic}) concentrations, DOC/DON and DOC/DOP ratios, and C_{mic}/N_{mic} ratios (Table 2) than the soil samples.

We next evaluated patterns of enzymatic expression of different exoenzymes known to be involved in phosphorus scavenging. Table 3 shows that there are strong differences in the amounts and types of exoenzyme activities in the different microbial communities in the study sites. Phosphodiesterase (PD) activity was higher in soil than in sediment samples, whereas the opposite was true for phosphomonoesterases (PM), which were highly active in sediment. Notably, while phosphonate (PN) activity was detected in soil samples, it was not detectable in sediment samples (Table 3). Notice that a single biochemical condition was used to measure the collective enzymatic activity from either soil or sediment. Since the different enzymes could have differences in the optimal conditions for their assay, possibly correlated with environmental differences at each site, what was measured was the potential enzyme activity.

Evaluation of isolates' ability to grow on different P sources. Figure 1 shows the distribution of P-scavenging capabilities among 1,163 isolates from all sampled sites. Unexpectedly, only

TABLE 3 Exoenzyme activities quantified in grassland soil and sediment in the Cuatro Ciénegas Basin, Coahuila, Mexico

Exoenzyme	Soil		Sediment	
	Churince	Pozas Azules	Churince	Fertilized
Phosphomonoesterase [mean (SE) nmol p-NP g ⁻¹ SDW h ⁻¹]	105 (19.8)	24.06 (2.9)	557 (190)	597
Phosphodiesterase [mean (SE) nmol p-NP g ⁻¹ SDW h ⁻¹]	181 (12.2)	371 (9.8)	286 (68)	176
Phosphonate [mean (SE) ppm P _i h ⁻¹]	63.22 (13.3)	76.23 (9.76)	0	0

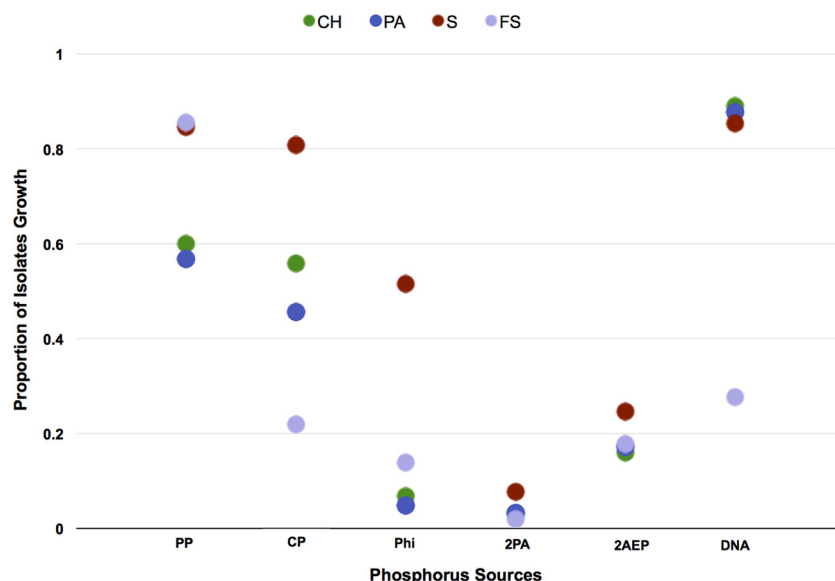


FIG 1 Differences in the frequency of utilization of P sources among soil and sediment isolates. The y axis reports the proportion of isolates able to grow under each of the six different phosphorus sources. PP, potassium phosphate; CP, calcium phosphate; Phi, phosphite; 2-PA, 2-phosphonoacetaldehyde; 2-AEP, (2-aminoethyl)phosphonic acid. Isolates tested were recovered from Churince soil (CH), Pozas Azules soil (PA), Churince sediment (S), or fertilized sediment (FS). Since some isolates can grow under more than one P source, the proportion does not add to 1. All three factors were highly significant ($P < 0.0001$).

80% of the isolates from sediments (both the shallow lagoon and the fertilized small pond) and 60% of the isolates from soil (Churince and Pozas Azules) were capable of growing with potassium phosphate as a sole source of P (Fig. 1). Differences were observed between the four sites when calcium phosphate was used as a sole source of phosphorus. The highest proportion of growth on calcium phosphate was observed for isolates from CH sediment, followed by isolates from soil (CH and PA), and finally by isolates from the P-fertilized sediment sample (Fig. 1).

Remarkably, 50% of the isolates from CH sediment were capable of growing with phosphite as a sole P source. However, <20% of the isolates from the P-fertilized sediment and <10% of the isolates from soil (CH and PA) were capable of growing with this P source (Fig. 1).

Less than 10% of the isolates from the four sites had the capacity to grow with 2-phosphonoacetaldehyde (2-PA) phosphonate as the sole P source, but ~20% of the isolates could grow using the P from 2-AEP, the most abundant biogenic phosphonate (13) (Fig. 1).

Ninety percent of the isolates from CH soil, PA soil, and CH sediment were able to grow with DNA as the P source. However, this capacity was less frequently observed (only 30%) among the isolates from the P-fertilized pond sediments (Fig. 1).

All three factors of the study (site [either soil or sediment], P substrate, and the correlation of site and P substrate) were analyzed to determine how these were associated with the occurrence of different P utilization traits. All three were highly significant ($P < 0.0001$), indicating a strong dependence of P utilization patterns on sample site (sediments versus soil). The strongest Spearman correlation observed was for potassium phosphate and calcium phosphate for soil (0.698 for Churince and 0.523 for Pozas Azules; see Tables S2 and S3 in the supplemental material). For Churince soil, a correlation was found between phosphite and 2-PA (0.402; Table S2) and, in Pozas Azules soil, for DNA and

potassium phosphate (0.398; Table S3). Meanwhile, the strongest correlation observed for Churince sediment was between phosphite and 2-AEP (0.447; see Table S4 in the supplemental material) and, for P-fertilized sediment, between DNA and calcium phosphate (0.326; see Table S5 in the supplemental material).

Phylogenetic analysis of bacteria, based on 16S rRNA gene, across all sites and samples. A total of 528 sequences were analyzed using mothur, yielding 210 operational taxonomic units (OTU) grouped at 99% similarity (121 at 98% and 97 at 97%). The OTU were distributed as follows: 32 OTU from the Churince sediment, 61 OTU from the P-fertilized sediment, 68 OTU from the Churince soil, and 74 OTU from the Pozas Azules soil. The dominant OTU were classified as *Firmicutes* (approximately 85% were *Bacillus* and *Staphylococcus*), followed by *Proteobacteria* (*Aeromonas* and *Paracoccus*) and *Actinobacteria*. Some bacterial groups were recovered only from some sites, but most groups were recovered at least at low levels from both soil and sediment.

Notably, the distribution of P utilization traits was not associated with particular taxonomic groups (Fig. 2). That is, all clades had members that could use potassium phosphate, calcium phosphate, and/or DNA. There were, however, some clades that lacked members that could grow on phosphite, 2-PA, or 2-AEP. Under close analysis of the genetically cohesive group *Bacillus cereus*, which was highly represented both in soil and sediment, the number and diversity of traits related to P utilization were higher for members isolated from sediment than from members isolated from soil (Table 4). In general, isolates from sediment had, on average, the capacity to use up to 4 different P substrates, while soil isolates could use only 3. Remarkably, despite the high genetic similarity of the *B. cereus* group members, the ability to use phosphite seemed to be a trait selected for in isolates from sediment (71.8% of isolates from sediment versus 12% of isolates from soil).

AdaptML analysis was used to discover ecotypes and determine their preferences for habitats (in this case, soil and sediment,

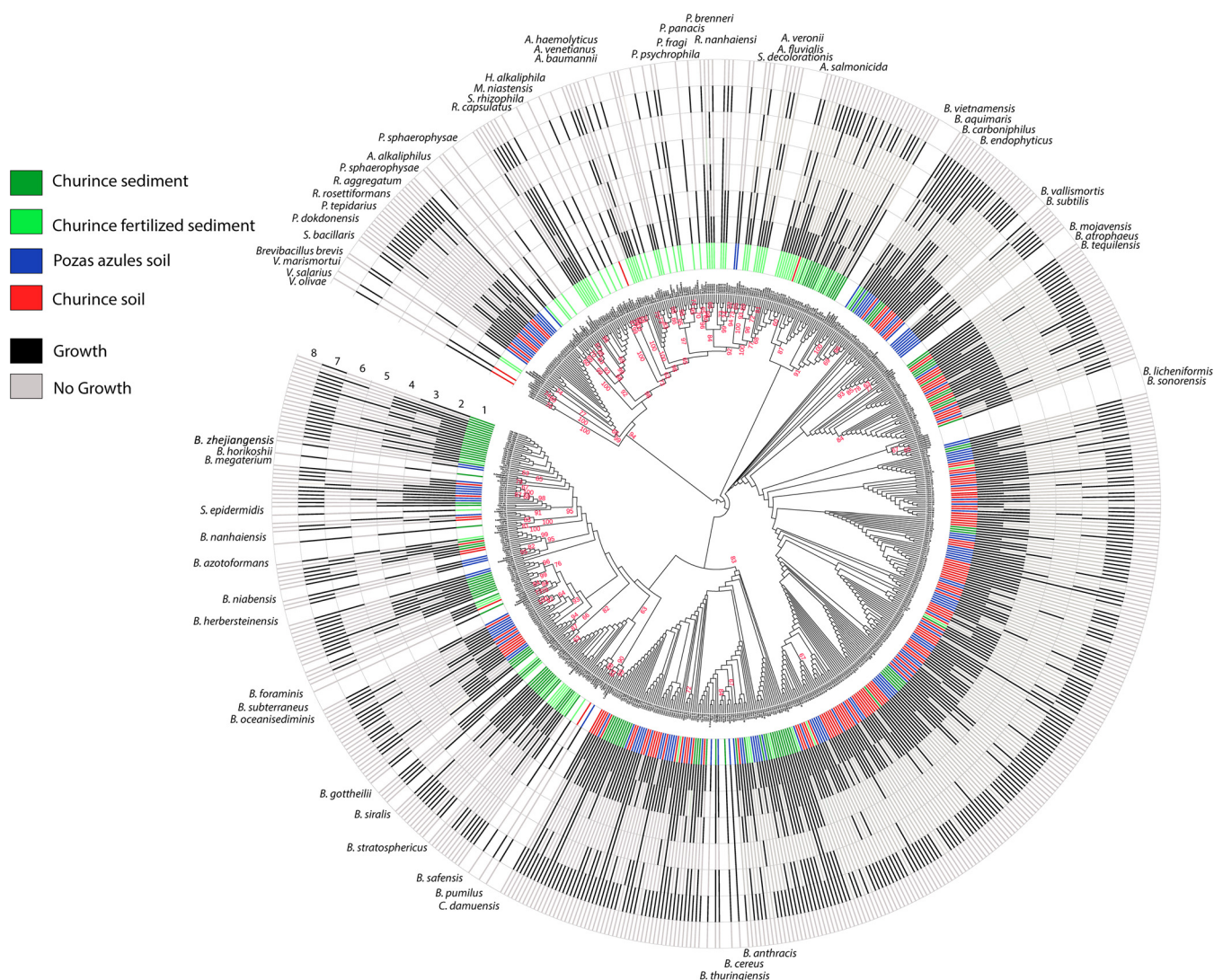


FIG 2 Distribution of phosphorus utilization capabilities among isolates of different taxonomic groups from soil and sediment communities. Phylogeny based on the 16S rRNA gene. The site of isolation is shown in the innermost circle, labeled 1 with the following colors: blue, Pozas Azules soil; red, Churince soil; dark green, Churince sediment; and light green, Churince fertilized sediment. The outer circles indicate the isolates' ability to grow with a given P source (represented in dark gray); light gray indicates lack of growth of the isolate. The circle numbers refer to P source evaluated: 2, potassium phosphate; 3, calcium phosphate; 4, phosphite; 5, 2-phosphonoacetaldehyde; 6, (2-aminoethyl)phosphonic acid; 7, DNA; and 8, P free.

and the different P substrates). Two distinct habitats were uncovered: habitat 1, containing sequences obtained predominantly from soil and fertilized sediment and present in both the basal and the most recent phylogenetic branches; and habitat 2, mostly con-

taining sequences obtained from sediment (Fig. 4). This result suggests that bacteria have different niche adaptations that influence patterns of genotypic differentiation (Fig. 3 and 4). Clearly, soil and sediment act as a filter for different taxonomic groups.

TABLE 4 Differences in trait selection for P utilization, notably phosphite, between soil and sediment *B. cereus* isolates

Phosphorus source	Isolate source (%)	
	Soil (n = 55)	Sediment (n = 39)
Potassium phosphate	93	100
Calcium phosphate	74.5	84.6
(2-Aminoethyl)phosphonic acid	43.6	51.2
Diethyl phosphonoacetaldehyde	10.9	20.5
Phosphite	12.77	71.8
DNA	90.9	92.3

DISCUSSION

Soil and sediment bacteria transform P into different oxidized and reduced forms, just as bacterial communities do in the oceans. Overall, we found that soil and sediment bacterial communities of CCB have a variety of strategies for P scavenging, and they can also use a variety of both oxidized and reduced phosphorus species. Strategies include mineralization of ester phosphates and phosphonates, biosynthesis of different exoenzymes, as well as inorganic P solubilization and phosphite oxidation. Our results indicate that although individual isolates can utilize up to four different P substrates, these capabilities are scattered within and

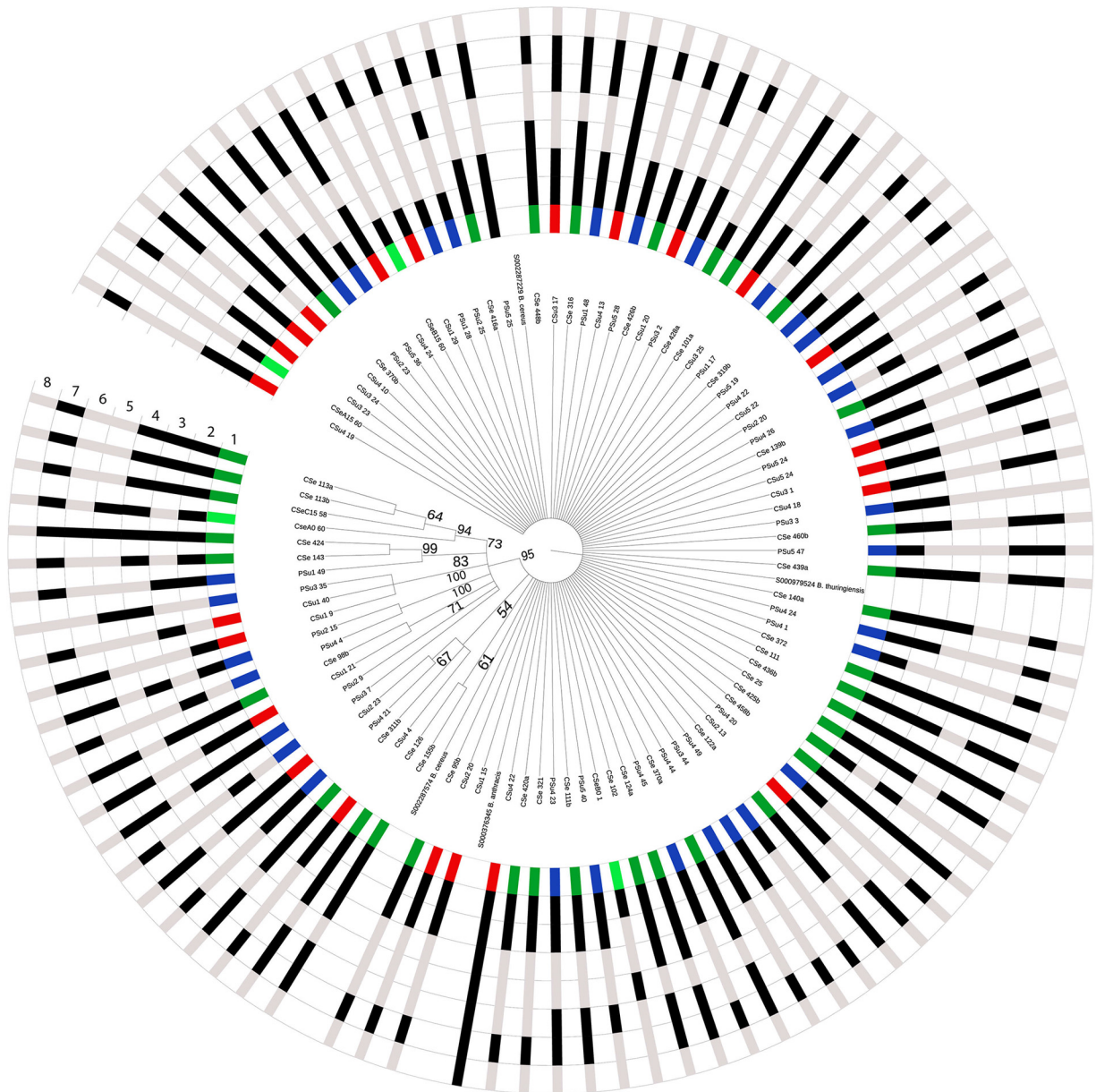


FIG 3 Phosphorus source preferences by bacteria related to *B. cereus sensu lato* species. This is a closeup of the clade that groups *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, and *Bacillus anthracis* in Fig. 2. Phylogeny is based on the 16S rRNA gene. The site of isolation is shown in the innermost circle, labeled 1 and indicated by the following colors: blue, Pozas Azules soil; red, Churince soil; dark green, Churince sediment; and light green, Churince fertilized sediment. The outer circles indicate the isolates' ability to grow with a given P source (represented in dark gray); light gray indicates lack of growth of the isolate. The circle numbers refer to P source evaluated: 2, potassium phosphate; 3, calcium phosphate; 4, phosphite; 5, 2-phosphonoacetaldehyde; 6, (2-aminoethyl)phosphonic acid; 7, DNA; 8, P free.

across different taxonomic groups, with diversity in the strategies used between individual isolates. Only 11 of the 1,160 tested isolates were capable of using every substrate evaluated.

Exoenzyme expression was expected to reflect the quality of available organic matter. Our results (Table 3) showed that sediments exhibited the largest phosphomonoesterase activity (often referred to as alkaline phosphatase), suggesting that monoesters (inositol phosphates, sugar phosphates, phosphoproteins, etc.) could be a preferred scavenging option in sediment. In soil sites, in contrast, phosphodiesterase activity seems to be more abundant, suggesting a preference of soil microorganisms for diesters (such

as nucleic acids and phospholipids). It is in soils where there is the least amount of DOP (Table 2), so it was expected that all enzymes would be expressed at higher levels in soils than in sediments; that seemed to be the case for phosphonatas and phosphodiesterases (in Pozas Azules). It is noticeable that in Pozas Azules, soil phosphodiesterases played a prominent role. This is in agreement with the number of isolates from this site that exhibited a preference to grow on DNA as a sole source of P (Fig. 1). On the other hand, phosphonata was detected only in soil. Since isolates from all sites exhibited similar capabilities to use phosphonates, we suggest that in sediments, there were other alternatives for P utilization,

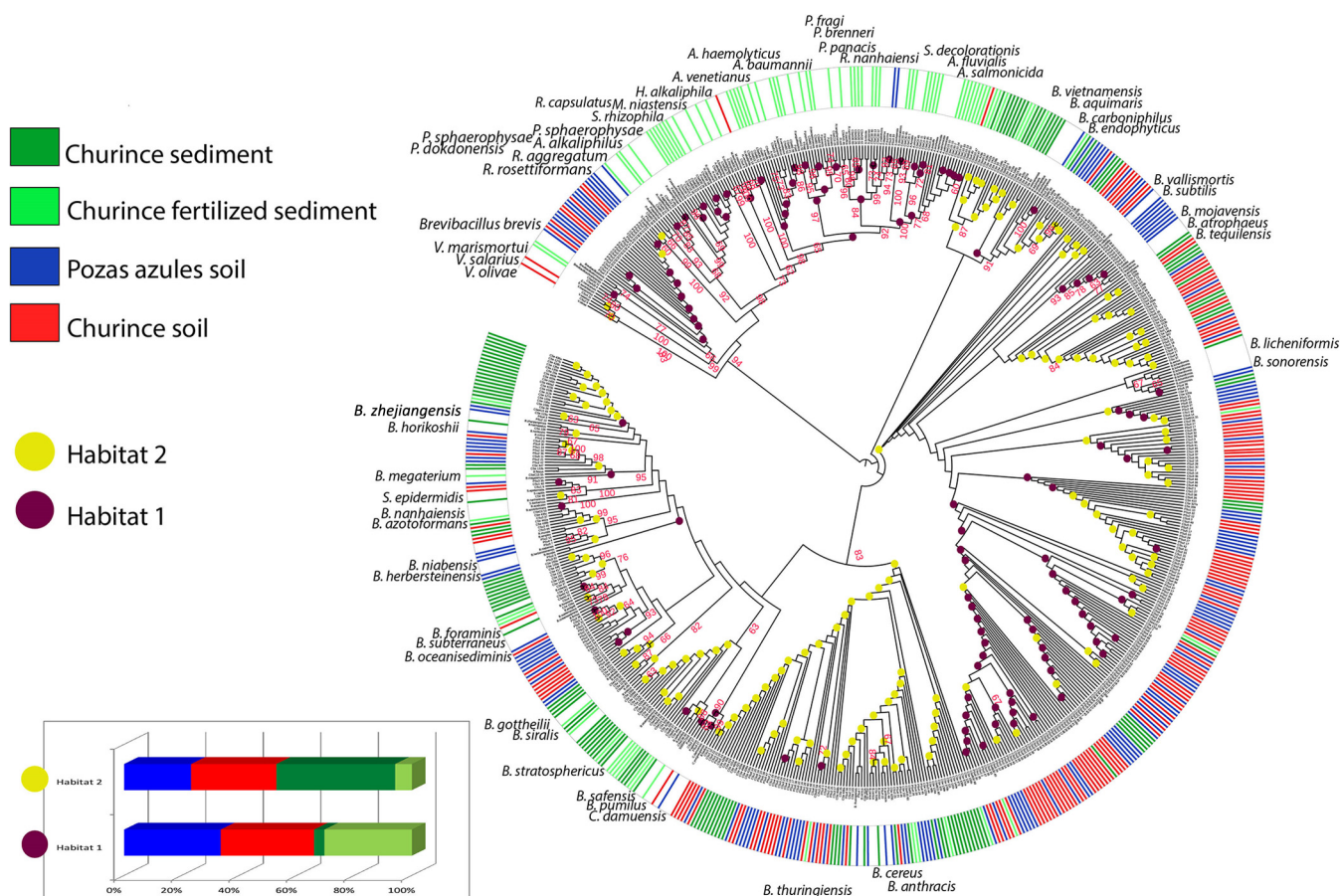


FIG 4 Assortment of genotypes according to ecological similarity. The analysis was done with AdaptML (51). The 16S rRNA gene sequences are associated with colored bars in the outer ring that represent the sites of isolation (sediment or soil). The predictive model projected two habitats (1 and 2), shown in the inner circles on the phylogenetic branches as dots colored in yellow or purple, which reflect trends in distribution. Taxonomic assignments are shown on the outside based on type strain's sequences included in the analysis. Shown with bars at the left is the distribution of each population among isolation sites for each predicted habitat. Notice that habitat 2 groups most of the sediment isolates (dark green).

and phosphonates were not being expressed. In fact, it is in sediments that dissolved C, N, and P occurred at a higher concentration (see reference 47 for a detailed analysis of the correlation between nutrients and enzymes in soil and sediments). Phosphorus concentration is known to regulate the expression of numerous genes involved in P uptake and utilization; however, not all P-scavenging enzymes are regulated by P availability. A recent paper from our group showed that in *B. coahuilensis* alkaline phosphatase activity was regulated by P concentration in one strain, but in another strain, expression was constitutive (60).

Among the P substrates tested in our experiment, potassium phosphate and DNA were the substrates on which the highest percentage of isolates grew (Fig. 1 and 2). The fact that DNA was the preferred P source for isolates from soil and unamended sediment, but not for the isolates from P_i -fertilized sediment, suggests that the addition of P_i enriched for bacteria that are capable of profiting from this easily metabolized and rarely available P substrate. This inference is consistent with differences in the bacterial community composition, as in fertilized sediment, we recovered *Actinobacteria* and *Proteobacteria* at high frequencies, while we typically obtained an overrepresentation of *Firmicutes* (*Bacillus*) from both soil and sediments.

In ultraoligotrophic environments, DNA released, either by cannibalistic behavior (61), natural cell death, or phages, represents a P-rich resource (62). However, bacterial P acquisition from DNA requires the biosynthesis of phosphodiesterase enzymes. The ability of the microbial community to synthesize phosphodiesterase was documented in all four sites we sampled in CCB (Table 2). DNA is also an N-rich resource (63); thus, microbial investment in DNA mineralization allows the acquisition of both P and N. Our results suggest that this mechanism for P acquisition might be an important way by which microorganisms acquire and recycle P. Although N is also often limiting for growth in this ultraoligotrophic system (46), it has been documented that DNA is not utilized as a source of nitrogen (63).

In contrast to the ubiquity of phosphodiesterases in isolates able to use DNA, only a low percentage of isolates was able to grow in media with phosphonate substrates (2-PA and 2-AEP). However, we did identify isolates with the ability to grow either in 2-PA or 2-AEP in almost all genotypic clusters (Fig. 2). For microorganisms from severely P-limited ecosystems, like CCB, it is an advantage to be able to obtain P from even somewhat unusual forms, such as phosphonates.

Phosphonate degradation has been reported to occur via the

phosphonate pathway in marine bacteria (64), as well as in soil bacteria (65). This pathway is present in diverse bacteria, including representatives of *Proteobacteria*, *Planctomycetes*, *Cyanobacteria* (65), and *Firmicutes* (11). We observed phosphonate activity in soil, but we could not detect this activity in sediments. These results are consistent with the idea that microbial degradation of phosphonates is especially favored under conditions of phosphate limitation, as we also observed lower DOP concentrations in soil than in sediments (Table 3). This implies, of course, that phosphonate is available in soil. In general, when P utilization preference is examined, the absolute concentration of a given substrate is meaningful only in relation to the most readily metabolized form, usually phosphate. If phosphate is available, enzymes to obtain alternative P sources are usually not expressed.

Regarding phosphonate utilization, three other phosphonate-degradative pathways have been reported in various bacterial species that rely on different key enzymes: phosphonopyruvate hydrolase, phosphonoacetate hydrolase, and carbon-phosphorus lyase (C-P lyase) (13). The first two pathways are highly substrate dependent, while C-P lyase is not substrate dependent. Our results suggest that the microbial degradation pathway for phosphonates plays out differently in soil (via phosphonate [Phn]) and sediment (via C-P lyase). These results suggest that different bacteria found in the soil and sediment of CCB can grow under conditions in which the only source of P is 2-PA or 2-AEP.

We also identified isolates that could grow using phosphite as a sole P source. Phosphite (H_2PO_3^- [Phi]) is a reduced form of inorganic phosphate (HPO_4^{2-} [P_i]), where Phi has a substitution of oxygen by hydrogen; as a result, the two compounds behave quite differently in living organisms (66). Phi cannot enter into the same metabolic pathways as P_i , because most enzymes involved in phosphoryl transfer reactions discriminate between Phi and P_i (67). The oxidation of Phi to P_i in soil is largely due to soil microbial activity (68) by microbes that use Phi for the production of energy and P_i (13). Phosphite and phosphonates have the same valence (+3) (versus +5 for P_i [13]), and the same gene cluster that is required to degrade phosphonates, *phn*, is also required to oxidize phosphite to phosphate (69). This suggests that there should be close associations between the bacterial taxa that can metabolize Phi and phosphonates. Indeed, our Spearman rank correlation results indicated a significant correlation between Phi and 2-PA and between Phi and 2-AEP (see Tables S2 and S3 in the supplemental material) for CH soil and PA soil, while in sediments, we observed a strong correlation only between Phi and 2-AEP (see Tables S4 and S5 in the supplemental material). Our results support the idea that there is a connection between the use of phosphonates and phosphite, possibly explained by the relationship between the genes involved in phosphonate degradation and phosphite oxidation, as suggested in previous studies (65, 68, 69). However, a diversity of pathways is suggested from this study, as not all strains able to use Phi could use phosphonate; the sources of the Phi are enigmatic. It is suggested that both Phi and phosphonate are produced as antibiotics (4), but there is still work to do to understand how these are produced and why these substrates that are costly to process are preferred by some organisms.

Our description of the different strategies of P acquisition in bacterial isolates from an oligotrophic environment, particularly one limited in P_i , may help in understanding the functioning of microbial communities in P_i -limited environments. The dispersion of traits related to P acquisition within and across taxonomic

groups is suggestive of niche-partitioning strategies that also explain how genetic diversity is maintained. Lateral transfer of genes involved in substrate acquisition has been widely described for carbon utilization, including genes that encode enzymatic activities to scavenge for carbon sources and transporters (70).

It has been suggested that phosphate transporter genes, phosphonate utilization genes, and alkaline phosphatase-coding genes have been transferred between bacterial lineages (71–74). It is thus possible that lateral gene transfer during bacterial evolution in this ultraoligotrophic terrestrial environment has played an important role in allowing bacteria to sample and retain diverse genes for P acquisition, resulting in a complex redox cycle for P analogous to that shown for the oceans.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Pamela Chavez, Alberto Morón, and Rodrigo Velázquez-Durán for assisting with soil sampling and chemical analysis, and we thank CONANP and Rancho Pozas Azules (PRONATURA) for permission to collect soil.

Y.T.-T., G.O.-Á., and F.G.-O. designed the study; Y.T.-T., M.D.R.-T., and A.I. performed the research; Y.T.-T., M.D.R.-T., and F.G.-O. analyzed the data; Y.T.-T., M.D.R.-T., G.O.-Á., F.G.-O., J.J.E., and V.S. interpreted the data; Y.T.-T. wrote the first draft of the manuscript; and all authors contributed substantially to revisions. All authors edited and approved the final manuscript.

This work was financed by CONACYT grant 220536 (CB-2013-01) to G.O.-Á. and a grant to F.G.-O. from the National Autonomous University of Mexico (PAPIIT DGAPA-UNAM: Análisis de la vulnerabilidad de la dinámica de nutrientes en un ecosistema árido de México, IN204013). V.S. and Y.T.-T. acknowledge support from Alianza WWF-FCS. Y.T.-T. acknowledges the postdoctoral fellowship financed through an IDETEC Sagarpa project to G.O.-Á. and CONACYT scholarship grants to M.D.R.-T.

FUNDING INFORMATION

This work, including the efforts of Gabriela Olmedo-Álvarez, was funded by CONACYT (220536 (CB-2013-01)). This work, including the efforts of Felipe García-Oliva, was funded by PAPIIT-DGAPA-UNAM (IN204013).

REFERENCES

- Huang J, Su Z, Xu Y. 2005. The evolution of microbial phosphonates degradative pathways. *J Mol Evol* 61:682–690. <http://dx.doi.org/10.1007/s00239-004-0349-4>.
- Elser JJ, Bracken MES, Cleland EE, Gruner DS, Harpole WS, Hillbrand H, Ngai JT, Seabloom EW, Shurin JB, Smith JE. 2007. Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems. *Ecol Lett* 10:1135–1142. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01113.x>.
- Benitez-Nelson C. 2015. Ocean chemistry. The missing link in oceanic phosphorus cycling? *Science* 348:759–760. <http://dx.doi.org/10.1126/science.aab2801>.
- Karl DM. 2014. Microbially mediated transformations of phosphorus in the sea: new views of an old cycle. *Annu Rev Mar Sci* 6:279–337. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-marine-010213-135046>.
- Van Mooy BA, Krupke A, Dyhrman ST, Fredricks HF, Frischkorn KR, Ossolinski JE, Repeta DJ, Rouco M, Seewald JD, Sylva SP. 2015. Phosphorus cycling. Major role of planktonic phosphate reduction in the marine phosphorus redox cycle. *Science* 348:783–785. <http://dx.doi.org/10.1126/science.aaa8181>.
- Cotner JB, Biddanda BA. 2002. Small players, large role: microbial influences on biogeochemical processes in pelagic aquatic ecosystems. *Ecosystems* 5:105–121. <http://dx.doi.org/10.1007/s10021-001-0059-3>.
- van der Heijden MGA, Bardgett RD, van Straalen NM. 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol Lett* 11:296–310. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01139.x>.

8. Steenbergh AK. 2012. The microbial control of phosphorus fluxes in marine sediments. PhD thesis. Utrecht University, Utrecht, the Netherlands.
9. Perroni Y, García-Oliva F, Tapia-Torres Y, Souza V. 2014. Relationship between soil P fractions and microbial biomass in an oligotrophic grassland-desert scrub system. *Ecol Res* 29:463–472. <http://dx.doi.org/10.1007/s11284-014-1138-1>.
10. Elser JJ, Watts J, Schampel JH, 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* 9:295–303. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00873.x>.
11. Alcaraz LD, López-Ramírez V, Moreno-Letelier A, Herrera-Estrella L, Souza V, Olmedo-Álvarez G. 2011. Genomics of bacteria from an ancient marine origin: clues to survival in an oligotrophic environment. In Dar JA, Dar MA (ed), *Earth and environmental sciences*. InTech, Rijeka, Croatia.
12. Adams MM, Gomez-García MR, Grossman AR, Bhaya D. 2008. Phosphorus deprivation responses and phosphonate utilization in a thermophilic *Synechococcus* sp. from microbial mats. *J Bacteriol* 190:8171–8184. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.01011-08>.
13. White AK, Metcalf WW. 2007. Microbial metabolism of reduced phosphorus compounds. *Annu Rev Microbiol* 61:379–400. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093357>.
14. Martínez A, Osburne MS, Sharma AK, DeLong EF, Chisholm SW. 2012. Phosphite utilization by the marine picocyanobacterium *Prochlorococcus* MIT9301. *Environ Microbiol* 14:1363–1377. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02612.x>.
15. Waring BG, Weintraub SR, Sinsabaugh RL. 2014. Ecoenzymatic stoichiometry of microbial nutrient acquisition in tropical soils. *Biogeochemistry* 117:101–113. <http://dx.doi.org/10.1007/s10533-013-9849-x>.
16. Karl DM, Bailiff MD. 1989. The measurement and distribution of dissolved nucleic acids in aquatic environments. *Limnol Oceanogr* 34:543–558. <http://dx.doi.org/10.4319/lo.1989.34.3.0543>.
17. Keil RG, Kirchman DL. 1991. Contribution of dissolved free amino acids and ammonium to the nitrogen requirements of heterotrophic bacterioplankton. *Mar Ecol Prog Ser* 73:1–10. <http://dx.doi.org/10.3354/meps073001>.
18. Turner BL, Cade-Menun BJ, Condon LM, Newman S. 2005. Extraction of soil organic phosphorus. *Talanta* 66:294–306. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2004.11.012>.
19. Turner BL, McKelvie ID, Haygarth PM. 2002. Characterisation of water extractable soil organic phosphorus by phosphatase hydrolysis. *Soil Biol Biochem* 34:27–35. [http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00144-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00144-4).
20. Turrión MB, Lafuente F, Aroca MJ, López O, Mulas R, Ruipérez C. 2010. Characterization of soil phosphorus in a fire-affected forest *Cambisol* by chemical extractions and ³¹P-NMR spectroscopy analysis. *Sci Total Environ* 408:3342–3348. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.03.035>.
21. Blackburn GM. 1981. Phosphonates as analogues of biological phosphates. *Nature* 351:515–516.
22. Wanner BL, Metcalf WW. 1992. Molecular genetic studies of a 10.9-kb operon in *E. coli* for phosphonate uptake and biodegradation. *FEMS Microbiol Lett* 100:133–140. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb14031.x>.
23. Hilderbrand RL. 1983. The role of phosphonates in living systems. CRC Press, Boca Raton, FL.
24. Kononova SV, Nesmeyanova MA. 2002. Phosphonates and their degradation by microorganisms. *Biochemistry* 67:184–195.
25. Quinn JP, Kulakova AN, Cooley NA, McGrath JW. 2007. New ways to break an old bond: the bacterial carbon-phosphorus hydrolases and their role in biogeochemical phosphorus cycling. *Environ Microbiol* 9:2392–2400. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01397.x>.
26. Alcaraz LD, Olmedo G, Bonilla G, Cerritos R, Hernandez G, Cruz A, Ramírez E, Putonti C, Jiménez B, Martínez E, López V, Arvizu JL, Ayala F, Razo F, Caballero J, Siefert J, Eguiarte L, Vielle JP, Martínez O, Souza V, Herrera-Estrella A, Herrera-Estrella L. 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. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0800981105>.
27. SMN, CONAGUA. 2013. Normales climatológicas por estación. Servicio Meteorológico Nacional, CONAGUA, Mexico City, Mexico.
28. McKee JW, Jones NW, Long LE. 1990. Stratigraphy and provenance of strata along the San Marcos fault, central Coahuila, Mexico. *Geol Soc Am Bull* 102:593–614. [http://dx.doi.org/10.1130/0016-7606\(1990\)102<0593:SAPOSA>2.3.CO;2](http://dx.doi.org/10.1130/0016-7606(1990)102<0593:SAPOSA>2.3.CO;2).
29. IUSS Working Group WRB. 2007. World reference base for soil resources 2006. First update 2007: a framework for international classification, correlation and communication. World Soil Resources Reports No. 103. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. http://www.fao.org/fileadmin/templates/nr/images/resources/pdf_documents/wrb2007_red.pdf.
30. Perroni Y, García-Oliva F, Souza V. 2014. Plant species identity and soil P forms in an oligotrophic grassland-desert scrub system. *J Arid Environ* 108:29–37. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaridenv.2014.04.009>.
31. López-Lozano NE, Eguiarte LE, Bonilla-Rosso G, García-Oliva F, Martínez-Piedragil C, Rooks C, Souza V. 2012. Bacterial communities and the nitrogen cycle in the gypsum soil of Cuatro Ciénegas Basin, Coahuila: a Mars analogue. *Astrobiology* 12:699–709. <http://dx.doi.org/10.1089/ast.2012.0840>.
32. Lee ZM, Steger L, Corman JR, Neveu M, Poret-Peterson AT, Souza V, Elser JJ. 2015. Response of a stoichiometrically imbalanced ecosystem to manipulation of nutrient supplies and ratios. *PLoS One* 10:e0123949. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0123949>.
33. Lilienfein J, Qualls RG, Uselman SM, Bidgham SD. 2004. Adsorption of dissolved organic and inorganic phosphorus in soils of weathering chronosequence. *Soil Sci Soc Am J* 68:620–628. <http://dx.doi.org/10.2136/sssaj2004.6200>.
34. Jones DL, Willett VB. 2006. Experimental evaluation of methods to quantify dissolved organic nitrogen (DON) and dissolved organic carbon (DOC) in soil. *Soil Biol Biochem* 38:991–999. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.08.012>.
35. Murphy J, Riley JP. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal Chim Acta* 27:3136.
36. Vance ED, Brookes AC, Jenkinson DS. 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol Biochem* 19:703–707. [http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717\(87\)90052-6](http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717(87)90052-6).
37. Joergensen RG. 1996. The fumigation-extraction method to estimate soil microbial biomass: calibration of the k_{EC} value. *Soil Biol Biochem* 28:25–31. [http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717\(95\)00102-6](http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717(95)00102-6).
38. Brookes P, Landman A, Pruden G, Jenkinson D. 1985. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: a rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. *Soil Biol Biochem* 17:837–842. [http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717\(85\)90144-0](http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717(85)90144-0).
39. Joergensen RG, Mueller T. 1996. The fumigation-extraction method to estimate soil microbial biomass: calibration of the k_{EN} value. *Soil Biol Biochem* 28:33–37. [http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717\(95\)00101-8](http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717(95)00101-8).
40. Anderson JPE, Domsch KM. 1978. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soil. *Soil Biol Biochem* 10:215–221. [http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717\(78\)90099-8](http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717(78)90099-8).
41. Coleman DC, Anderson RV, Cole CV, Elliott ET, Woods L, Campion MK. 1978. Trophic interactions in soils as they affect energy and nutrient dynamics. V. Phosphorus transformations. *Microb Ecol* 4:381–387.
42. Lathja K, Driscoll CT, Jarrell WM, Elliott ET. 1999. Soil phosphorus. Characterization and total element analysis, p 115–142. In Robertson GP, Coleman DC, Bledsoe CS, Sollins P (ed), *Standard soil methods for long-term ecological research*. Oxford University Press, New York, NY.
43. Tabatabai MA, Bremner JM. 1969. Use of *p*-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol Biochem* 1:301–307. [http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717\(69\)90012-1](http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717(69)90012-1).
44. Eivazi F, Tabatabai MA. 1977. Phosphatases in soils. *Soil Biol Biochem* 9:167–172. [http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717\(77\)90070-0](http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717(77)90070-0).
45. Eivazi F, Tabatabai MA. 1988. Glucosidases and galactosidases in soils. *Soil Biol Biochem* 20:601–606. [http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717\(88\)90141-1](http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717(88)90141-1).
46. Verchot L, Borelli T. 2005. Application of *para*-nitrophenol (*p*NP) enzyme assays in degraded tropical soils. *Soil Biol Biochem* 37:625–633. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.09.005>.
47. Tapia-Torres Y, Elser JJ, Souza V, García-Oliva F. 2015. Ecoenzymatic stoichiometry at the extremes: how microbes cope in an ultra-oligotrophic desert soil. *Soil Biol Biochem* 87:34–42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.04.007>.
48. Cerritos R, Vinuesa P, Eguiarte LE, Herrera-Estrella L, Alcaraz-Peraza LD, Arvizu-Gómez JL, Olmedo G, Ramírez E, Siefert JL, Souza V. 2008. *Bacillus coahuilensis* sp. nov, a moderately halophilic species from a desiccation lagoon in the Cuatro Ciénegas Valley in Coahuila, Mexico. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:919–923. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.64959-0>.

49. Hulett FM, Bookstein C, Jensen K. 1990. Evidence for two structural genes for alkaline phosphatase in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 172:735–740.
50. Hoffman CS, Winston F. 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* 57:267–272. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90131-4](http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119(87)90131-4).
51. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463–5467. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>.
52. Ewing B, Green P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities. *Genome Res* 8:186–194.
53. Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* 59:307–321. <http://dx.doi.org/10.1093/sysbio/syq010>.
54. Olsen GJ, Overbeek R, Larsen N, Marsh TL, McCaughey MJ, Maciukenas MA, Kuan WN, Macke TJ, Xing Y, Woese CR. 1992. The Ribosomal Database Project. *Nucleic Acids Res* 20:2199–2200. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/20.suppl.2199>.
55. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF. 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 75:7537–7541. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01541-09>.
56. Letunic I, Bork P. 2011. Interactive Tree Of Life v2: online annotation and display of phylogenetic trees made easy. *Nucleic Acids Res* 39:W475–W478. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkr201>.
57. Hunt D, David LA, Gevers D, Preheim SP, Alm EJ, Polz MF. 2008. Resource partitioning and sympatric differentiation among closely related bacterioplankton. *Science* 320:1081–1085. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1157890>.
58. StatSoft. 2000. Statistica version 6.0 for Windows. StatSoft, Tulsa, OK.
59. Aitkin M, Anderson D, Francis B, Hinde J. 1989. Statistical modelling in GLIM. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.
60. Gómez-Lunar Z, Hernández-González I, Rodríguez-Torres MD, Souza V, Olmedo-Álvarez G. 2016. Microevolution analysis of *Bacillus coahuilensis* unveils differences in phosphorus acquisition strategies and their regulation. *Front Microbiol* 7:58. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.00058>.
61. González-Pastor JE, Hobbs EC, Losick R. 2003. Cannibalism by sporulating bacteria. *Science* 301:510–513. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1086462>.
62. Tani K, Nasu M. 2010. Roles of extracellular DNA in bacterial ecosystem, p 25–37. *In* Kikuchi Y, Rykova E (ed), *Extracellular nucleic acids*, vol 25. *Nucleic acids and molecular biology*. Springer, New York, NY.
63. Jørgensen NOG, Kroer N, Coffin RB, Yang XH, Lee C. 1993. Dissolved free amino acids, combined amino acids, and DNA as sources of carbon and nitrogen to marine bacteria. *Mar Ecol Prog Ser* 98:135–148. <http://dx.doi.org/10.3354/meps098135>.
64. Martinez A, Tyson GW, DeLong EF. 2010. Widespread known and novel phosphonates utilization pathways in marine bacteria revealed by functional screening and metagenomic analyses. *Environ Microbiol* 12:222–238. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02062.x>.
65. Panas P, Ternan NG, Dooley JSG, McMullan G. 2006. Detection of phosphonoacetate degradation and *phnA* genes in soil bacteria from distinct geographical origins suggest its possible biogenic origin. *Environ Microbiol* 8:939–945. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00974.x>.
66. McDonald AE, Grant BR, Plaxton WC. 2001. Phosphite (phosphorous acid): its relevance in the environment and agriculture and influence on plant phosphate starvation response. *J Plant Nutr* 24:1505–1519. <http://dx.doi.org/10.1081/PLN-100106017>.
67. Plaxton WC. 1998. Metabolic aspects of phosphate starvation in plants, p 229–241. *In* Lynch JP, Deikman J (ed), *Phosphorus in plant biology: regulatory roles in molecular, cellular, organismic, and ecosystem processes*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD.
68. Adams F, Conrad JP. 1953. Transition of phosphite to phosphate in soils. *Soil Sci* 75:361–371. <http://dx.doi.org/10.1097/00010694-195305000-00004>.
69. Ohtake H, Wu H, Imazu K, Anbe Y, Kato J, Kuroda A. 1996. Bacterial phosphonate degradation, phosphite oxidation and polyphosphate accumulation. *Resour Conserv Recycling* 18:25–134. [http://dx.doi.org/10.1016/S0921-3449\(96\)01173-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0921-3449(96)01173-1).
70. Martiny AC, Treseder K, Pusch G. 2013. Phylogenetic conservatism of functional traits in microorganisms. *ISME J* 7:830–838. <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2012.160>.
71. Imazu K, Tanaka S, Kuroda A, Anbe Y, Kato J, Ohtake H. 1998. Enhanced utilization of phosphonate and phosphite by *Klebsiella aerogenes*. *Appl Environ Microbiol* 64:3754–3758.
72. Moreno-Letelier A, Olmedo G, Eguiarte LE, Martínez-Castilla L, Souza V. 2011. Parallel evolution and horizontal gene transfer of the *pst* operon in *Firmicutes* from oligotrophic environments. *Int J Evol Biol* 2011:781642. <http://dx.doi.org/10.4061/2011/781642>.
73. Martiny AC, Coleman ML, Chisholm SW. 2006. Phosphate acquisition genes in *Prochlorococcus* ecotypes: evidence for genome-wide adaptation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:12552–12557. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0601301103>.
74. Villarreal-Chiu JF, Quinn JP, McGrath JW. 2012. The genes and enzymes of phosphonate metabolism by bacteria, and their distribution in the marine environment. *Front Microbiol* 3:19. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2012.00019>.